



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

***RUI FILIPE SANTA BÁRBARA SEQUEIRA***

# **METASTIZAÇÃO E CANCRO ORAL**

## **FISIOPATOLOGIA E IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

**ÁREA CIENTIFICA DE PATOLOGIA GERAL**

**COIMBRA  
JULHO DE 2010**



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**RUI FILIPE SANTA BÁRBARA SEQUEIRA**

# **METASTIZAÇÃO E CANCRO ORAL**

## **FISIOPATOLOGIA E IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

**MONOGRAFIA COM CONTRIBUIÇÃO PESSOAL**

**TRABALHO FINAL DO 5º ANO DE  
MEDICINA DENTÁRIA COM VISTA À  
ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS  
DE MESTRADO INTEGRADO EM  
MEDICINA DENTÁRIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROF.<sup>a</sup> DOUTORA MARÍLIA DE ASSUNÇÃO RODRIGUES FERREIRA  
DOURADO**

**COIMBRA  
JULHO DE 2010**

## **Agradecimentos**

À Prof. Doutora Marília Dourado, pela indispensável orientação na realização desta monografia, incansável apoio e sábios conselhos.

Aos meus mestres, pelos sábios conselhos e inúmeros conhecimentos transmitidos ao longo da minha formação.

Aos meus pais, irmão e avó, pelo amor, paciência e constante apoio.

Aos meus colegas e amigos por tornaram esta “viagem” muito mais interessante, obrigado pela amizade.

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>ALDH</b>	Enzima aldeído-desidrogenase	<b>MMP</b>	Metaloproteinases da matriz (do inglês: Matrix Metalloproteinase)
<b>CO</b>	Cancro Oral	<b>MSI</b>	Instabilidade de microssatélite (do inglês: Microsatellite instability)
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr Barr (do inglês: Epstein-Barr Vírus)	<b>NF-Kb</b>	Factor de transcrição nuclear Kb (do inglês: Nuclear factor-kappa B)
<b>EGF</b>	Factor de crescimento epidérmico (do inglês: Epidermal Growth Factor)	<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>EGFR</b>	Receptor para o factor de crescimento epidérmico (do inglês: Epidermal Growth Factor Receptor)	<b>pRb</b>	Proteína do Retinoblastoma
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América	<b>VEGF</b>	Factor de crescimento do endotélio vascular (do inglês: Vascular Endothelial Growth Factor)
<b>GST</b>	Glutathione S-transferase	<b>VEGFR</b>	Receptor do factor de crescimento do endotélio vascular (do inglês: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)
<b>HPV</b>	Vírus do papiloma humano (do inglês: Human Papilloma Virus)	<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>LOH</b>	Perda de heterozigotia (do inglês: Loss of Heterozygosity)	<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C

## Lista de Figuras

<b>Nome</b>	<b>Página</b>
Representação esquemática da cavidade oral e dos locais onde o cancro oral se desenvolve mais frequentemente	8
Mapa da distribuição geográfica da incidência do cancro oral	10
Etapas da carcinogénese	12
Modelo da carcinogénese oral baseado na teoria da evolução por etapas	14
Metastização e cancro oral	20
Alterações que levam à ocorrência de metastização	21
Sinalização celular mediada por factores de crescimento. Vias de transdução de sinal activadas por interacção do ligando (EGF) com o receptor (EGFR)	29

## Lista de Tabelas

<b>Nome</b>	<b>Página</b>
Agentes carcinogénos e factores de risco para o cancro oral	13

## Índice

<b>Resumo (Abstract)</b>	<b>1</b>
<b>1. Introdução</b>	
<b>1.1. Cancro</b>	<b>5</b>
<b>2. Cancro Oral</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Epidemiologia</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Carcinogénese Oral</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. Agentes Carcinogénicos/Factores de Risco e Cancro Oral</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.1. Tabaco e Álcool</b>	<b>14</b>
<b>2.2.1.2. Nutrição</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.3. Vírus</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1.4. Predisposição Genética</b>	<b>19</b>
<b>3. Metastização</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Angiogénese</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Adesão Celular</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Receptor do Factor de Crescimento da Epiderme/Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)</b>	<b>28</b>
<b>4. Novas Abordagens/Implicações Terapêuticas No Cancro Oral</b>	<b>31</b>
<b>5. Conclusão</b>	<b>33</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>35</b>

## Resumo

O cancro é a segunda causa de morte a nível mundial. Sabe-se que este resulta da perda dos mecanismos da regulação da homeostasia celular levando à proliferação celular descontrolada e/ou resistência das células à morte por apoptose. Quer a teoria da célula estaminal cancerígena, quer a da carcinogénese por etapas (iniciação, promoção e progressão), em que células mais diferenciadas acumulam alterações genéticas ou epigenéticas, que provocam a desregulação de genes que codificam proteínas envolvidas no crescimento, na divisão, na diferenciação e na morte celular por apoptose, tem sido aceites e defendidas para explicar o seu aparecimento.

O cancro oral (CO) encontra-se entre os 10 mais diagnosticados no mundo, sendo o carcinoma espinhocelular oral responsável por mais de 90% dos casos. Apesar dos avanços terapêuticos alcançados, a taxa de sobrevivência aos 5 anos não se alterou nos últimos 30 anos e é de aproximadamente 50%. A alta mortalidade desta patologia deve-se à sua grande capacidade invasiva e destrutiva dos tecidos vizinhos, com alterações profundas de funções como, por exemplo, a deglutição e a respiração, e à alta capacidade de se disseminar e metastizar, principalmente, para os nódulos linfáticos locoregionais e por vezes, também, para órgãos distantes, da sua origem primária.

O CO apresenta uma incidência anual de 275.000 casos, sendo que dois terços dos casos ocorrem em países em vias de desenvolvimento. À semelhança de outros cancros, o risco de vir a sofrer de CO aumenta com a idade e, na maioria dos casos, ocorre em pessoas com idade superior a 50 anos.

Actualmente é sabido que o cancro oral resulta de uma conjugação de vários factores, num processo multifásico. Existe uma forte componente individual e susceptibilidade genética, que estando estreitamente associada à exposição crónica a diversos factores de risco exógenos, como a alimentação, o tabagismo, o alcoolismo crónico, agentes infecciosos, como os vírus do papiloma humano, serotipo 16 (HPV-16), factores ocupacionais, entre outros, podem levar ao desenvolvimento do processo maligno.

A realidade com que os clínicos se deparam, é a grande facilidade com que se desenvolvem metástases e a grande probabilidade de estas ocorrerem na fase inicial da doença. A ocorrência de metástases é um dos melhores indícios que o clínico possui para determinar a agressividade e conseqüente sobrevivência do doente. Aproximadamente 30% dos doentes com cancro oral apresentam metástases, clinicamente detectáveis, quando é realizado o diagnóstico e, dos restantes cerca de 25% irão desenvolver-las num período de dois anos, por via sanguínea mas principalmente por via linfática. A metástase depende principalmente da alteração de dois processos fisiológicos, a angiogénese e os mecanismos de adesão celular.

Vários estudos clínicos têm relacionado o aumento da expressão do VEGF-A em muitos casos de cancro, incluindo o CO, e o envolvimento positivo dos nódulos linfáticos em tumores sólidos. Os resultados não são claros, embora esta parece ser uma forte possibilidade de explicação do envolvimento positivo dos nódulos linfáticos no CO.

Por outro lado a degradação da membrana basal é um passo fundamental para o processo de metastização, no CO. É imprescindível que as células tumorais possam aceder à corrente sanguínea, e para isso é importante a degradação da membrana basal, e como tal o papel das MMPs.

Por fim, o aumento do EGFR é comum no cancro oral, e está associado a estádios avançados e à alta incidência de metástases no pescoço. O aumento da expressão de EGFR está associado à desregulação das vias que controlam os processos biológicos e, como tal é naturalmente aceite a sua influência na agressividade dos processos malignos, e consequentemente a um pior prognóstico da doença.

O tratamento do CO nem sempre é satisfatório. Nos estádios precoces (I e II) o CO é tratado com recurso à cirurgia ou à radioterapia. Por outro lado nos estádios avançados (III e IV) o tratamento passa pela cirurgia associada à radioterapia. Hoje em dia existe um crescente corpo de evidência experimental que sugere que as estratégias anti-angiogénicas vão contribuir para o futuro do tratamento do cancro. Outras modalidades terapêuticas a serem estudadas, passam pela terapia alvo para a inibição do EGFR, também a terapia genica e a imunoterapia são áreas que necessitam de uma maior investigação.

Esta revisão permite-nos concluir que apesar do grande esforço realizado, ao longo dos anos, para conhecer os mecanismos associados à carcinogénese oral e à metastização, estes são dois processos ainda pouco claros, o que nos leva a afirmar que é necessário um maior investimento na investigação desta entidade patológica o que, por seu lado, permitirá um diagnóstico mais precoce e que, no futuro, as opções e as intervenções terapêuticas se façam de uma forma mais dirigida e eficaz, contribuindo para a melhor da qualidade de vida dos doentes.

**Palavras-chave:** Cancro Oral, carcinogénese, metastização

## Abstract

Cancer is the second most common cause of death in the world. It is known that cancer arises from the loss of regulation mechanisms of cell homeostasis, leading to uncontrolled cell proliferation and/or resistance to cell death by apoptosis. Either cancer stem cell theory or multistage theory (initiation, promotion and progression), in which more differentiated cells accumulate genetic or epigenetic changes, leading to deregulation of protein encoding genes involved in growth, division, differentiation and cell death by apoptosis, have been accepted and defended to explain its origin.

Oral cancer (OC) is one of the 10 most diagnosed cancers in the world, and oral squamous cell carcinoma is responsible for more than 90% of the cases. Despite the achieved therapeutic advances, the five year survival rate has not changed in the past 30 years and is approximately of 50%. The high mortality of this disease occurs due to its huge invasive and destructive capacity of surrounding tissues, with major functional changes such as swallowing and breathing, and due to the high capacity of spreading and metastasizing itself mainly, into local lymph nodes and sometimes also into distant organs from its primary origin.

OC has an annual incidence of 275.000 cases, of which two thirds occur in developing countries. Like other cancers, the risk of having OC increases with age and, in most of the cases occurs in people over 50.

Nowadays it is known that oral cancer arises from a set of factors, in a multi stage process. There is a strong individual and genetic susceptibility, which is closely related to chronic exposure to several exogenous risk factors such as food, smoking, chronic alcoholism, infectious agents, like human papillomavirus serotype 16 (HPV- 16), occupational factors, among others, and which may lead to the development of a malignant process.

The reality that clinicians have to face is the ease with which metastases can be developed and the high probability of these occurring in the initial phase of the disease. The occurrence of metastasis is one of the best evidences that the clinician has to determine the aggressiveness and consequent patient's survival. Approximately 30% of patients with oral cancer have clinically detectable metastases, when the diagnosis is made and for the rest around 25% of them will develop this disease in a period of two years by blood spread but mainly by lymphatic spread. Metastasis largely depends on the alteration of two physiological processes, angiogenesis and cell adhesion mechanisms.

Several clinical studies have connected the increased expression of VEGF-A in many cancers, including OC, and the positive involvement of lymph nodes in solid tumors. The results are unclear, although this seems to be a strong possibility to explain the positive involvement of lymph nodes in OC.

On the other hand the degradation of basement membrane is a key step in the metastization process, in OC. It is essential that tumor cells can enter the bloodstream, and

for that it is important the degradation of basement membrane, and as such the role of MMPs.

At last, but not least the increase of EGFR is common in oral cancer and is associated with advanced stages, and with the high incidence of metastases in the neck. EGFR increased expression is associated with deregulation of pathways that control biological processes and as such it is normal its influence in the aggressiveness of malignant processes, and consequently with a worse prognosis.

OC treatment is not always satisfactory. In the early stages (I and II) OC is treated with surgery or radiotherapy. However, at advanced stages (III and IV) the treatment is made with surgery associated to radiotherapy. Presently there is a increasing body of experimental evidence suggesting that anti-angiogenic strategies will contribute for the future of cancer treatment. Further therapeutic modalities to be studied, are targeted therapies with EGFR inhibitors, Gene therapy and immunotherapy are also areas that need further research.

This review allowed us to conclude that despite the great effort made over the years to understand the mechanisms associated with oral carcinogenesis and metastasis, are still unclear processes, which leads us to state the necessity of a greater investment in researching this pathology. This will allow that, in the future diagnostic and therapeutic interventions options will be made in a more directed and efficient way, contributing for a better patients quality of life.

**Keywords:** Oral cancer, carcinogenesis, metastization

## 1. Introdução

### 1.1. Cancro

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o cancro é a segunda causa de morte a nível mundial, no entanto prevê-se que esta situação possa sofrer uma alteração, nos próximos anos, passando o cancro a ser a principal causa de morte <sup>1</sup>. Calcula-se que tenham ocorrido 7.9 milhões de óbitos no mundo em 2007, devido ao cancro. Em 2008, as estimativas feitas pela OMS apontavam para que, aproximadamente, 1/8 das mortes a nível global se devessem ao cancro e, segundo a mesma fonte, aproximadamente 30% das mortes poderiam ter sido evitadas <sup>1</sup>.

Segundo o “Health statistics – Atlas on mortality in the European Union”, publicado em 2009 pelo Eurostat, as neoplasias malignas são responsáveis por 243 óbitos por cada 100.000 habitantes do sexo masculino, enquanto no sexo feminino os valores rondam as 137 mortes por cada 100.000, dentro da União Europeia <sup>2</sup>.

Em 2008, o Instituto Nacional de Estatística, reportou que o cancro representava em Portugal a segunda causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares, tendo sido responsável por cerca 23% do total dos óbitos ocorridos no nosso país <sup>3</sup>.

A primeira relação conhecida, e documentada, entre um factor causal, tanto ambiental como ocupacional, e o surgimento de um processo maligno remonta ao ano de 1775, quando o cirurgião Sir. Percivall Pott descreveu pela primeira vez a associação entre o “cancro do limpa-chaminés” (cancro escrotal) e o contacto quase permanente com a fuligem, por parte deste grupo profissional <sup>4-5</sup>.

Actualmente, sabe-se que o cancro resulta da perda dos mecanismos de regulação da homeostasia celular traduzida por uma proliferação celular descontrolada e/ou resistência das células à morte por apoptose <sup>6-8</sup>. O seu desenvolvimento está associado a alterações genéticas e epigenéticas e à expressão anómala de genes que, quando estimulados ou reprimidos, influenciam o crescimento, a diferenciação e a resistência à morte celular. Alterações genéticas como amplificações, deleções, translocações cromossómicas e mutações pontuais produzem a activação/expressão de oncogenes ou a inibição de genes supressores tumorais. Por outro lado, a hiper ou hipometilação das regiões promotoras dos genes e a acetilação/desacetilação das histonas constituem modificações epigenéticas, responsáveis por alterações dos níveis de expressão de genes <sup>9</sup>.

Cerca de 5% de todos os cancros estão relacionados com factores genéticos conhecidos, sendo a grande maioria resultante da acção de carcinogénios ambientais, como os poluentes atmosféricos, o fumo do tabaco, substâncias da dieta e as radiações, entre outros <sup>10-11</sup>. Por outro lado, as interacções complexas entre os carcinogénios ambientais e os genes poderão explicar porque razão somente alguns indivíduos desenvolvem cancro, após a exposição a um carcinogénio conhecido, o que ajuda a perceber a importância da individualidade genética nesta doença <sup>12-13</sup>.

Consequentemente o estilo de vida adoptado pode propiciar, ou não, o aparecimento de uma lesão maligna da cavidade oral. Tendo em conta que a taxa de sobrevivência aos 5

anos, para o cancro oral, é muito baixa e que cerca de 30% das mortes por cancro poderiam ser evitadas <sup>1</sup>, é importante adoptar uma atitude mais activa em termos preventivos, a começar pela adopção de um estilo de vida equilibrado, optar por comportamentos de promoção da saúde, tais como eliminar os hábitos tabágicos e alcoólicos, optar por uma alimentação equilibrada, e correctos hábitos higiénicos. A correcta escovagem dos dentes pelo menos duas vezes por dia, o uso de fita dentária ou escovilhão devem ser escrupulosamente cumpridos. A falta de higiene propicia o surgimento de um ambiente intraoral mais agressivo e, conseqüentemente, uma maior incidência de cancro oral, nestes doentes <sup>14</sup>.

Outra teoria, mais moderna, que explica a origem do cancro é a teoria da célula estaminal. Foi durante os anos 40 do século XIX que uma equipa de patologistas alemães, liderada por Johannes Muller, ao examinar secções de tecido usando grandes ampliações, deu origem aos primórdios do que é hoje a patologia. Três dos discípulos de Muller, Rudolf Virchow, Julius Cohnheim e Wilhelm Waldeyer dedicaram-se mais exclusivamente ao estudo do cancro <sup>15</sup>. Podemos hoje concluir que é da sua responsabilidade a origem do que mais tarde seria a teoria da célula estaminal como teoria explicativa da origem do cancro.

Como se sabe, existem 3 tipos de células estaminais: as células estaminais embrionárias, as germinativas e as somáticas ou adultas. As células estaminais embrionárias, as que surgem das primeiras cinco ou seis divisões do óvulo fecundado, são as precursoras de todas as células dos órgãos adultos. As células estaminais germinativas são os óvulos e os espermatozóides, as responsáveis pela reprodução. E por fim as células estaminais somáticas, ou adultas, são as que apresentam um potencial mais limitado, visto produzirem células que se diferenciam em células funcionalmente maduras, e que são responsáveis pela renovação tecidual normal <sup>16</sup>.

Nos últimos anos, fruto de múltiplos estudos científicos, o conhecimento da biologia das células estaminais, o reconhecimento do seu papel na ontogénese e na homeostasia dos organismos adultos sofreu um enorme impulso <sup>17</sup>. É consensual a existência de células estaminais como constituintes do tecido adulto normal. Estas são responsáveis pela renovação tecidual normal <sup>16</sup>. A existência destas células, indiferenciadas, é importante para a sobrevivência dos indivíduos, e para que os órgãos se possam manter saudáveis, com uma taxa de renovação celular viável, para os órgãos e conseqüentemente para os indivíduos <sup>18</sup>, contudo o seu papel está longe de estar completamente esclarecido.

Nos anos 60 do século XX, propôs-se que as células estaminais específicas de um tecido, com diferenciação comprometida com determinado tecido, podem estar na origem do cancro e cerca de dez anos mais tarde sugeriu-se que o cancro resultaria da interrupção da maturação das células estaminais <sup>19</sup>. De acordo com esta teoria, o cancro surge da expansão anormal da população de células estaminais neoplásicas, células semelhantes às células progenitoras que se encontram em locais errados no tecido adulto <sup>16</sup>. As células malignas partilham com as células estaminais normais a capacidade de rápida divisão celular, de auto-renovação, de invasão, de migração bem como a capacidade de crescer em locais distantes ao seu local de origem <sup>16 20-21</sup>.

Além da capacidade proliferativa ilimitada, as células estaminais cancerígenas apresentam mecanismos de resistência à apoptose, expressão activa de telomerase e fenótipo invasivo, características que podem ser resultantes de mutações genéticas e alterações epigenéticas. Por seu lado, algumas células neoplásicas apresentam em comum com as células estaminais algumas características. Com efeito, a capacidade de ancoragem independente, até há pouco considerada marcador de transformação celular, é hoje reconhecida como uma propriedade de células estaminais de tecidos normais. Deste modo, a teoria de que os cancros surgem da transformação de células estaminais, e das suas descendentes imediatas, que adquirem a capacidade de auto-renovação por mutações é bastante apelativa <sup>17 22-25</sup>.

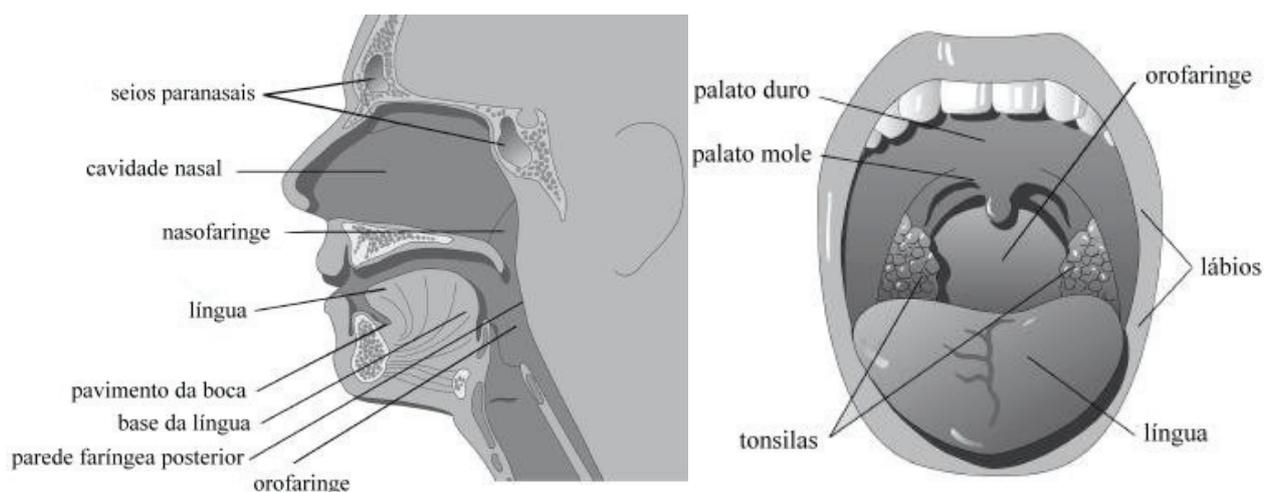
Um argumento favorável a esta teoria está relacionado com a ideia de que uma alteração celular para levar à formação de um cancro tem de ocorrer numa célula com potencial para se dividir, e que não se vá “perder” durante o turnover celular, permanecendo no organismo. Estas são características das células estaminais ou dos tecidos menos diferenciados, as quais podem gerar uma linhagem de células com o defeito que se irá manter no tecido, e conseqüentemente levar à formação de uma neoplasia, que irá apresentar vários graus de diferenciação e um potencial de crescimento ilimitado <sup>16</sup>. Preconiza-se que as células estaminais mais antigas, aquelas que mais se auto-renovaram, estão mais susceptíveis a acumular mutações genéticas iniciadoras de cancro <sup>20</sup>.

Assim, em resumo, o cancro pode surgir quer de células estaminais cancerígenas, quer de células mais diferenciadas que acumulam alterações genéticas ou epigenéticas que provocam a desrepressão de genes que codificam proteínas envolvidas no crescimento, na divisão, na diferenciação e na morte celular por apoptose <sup>20</sup>. A teoria da célula estaminal, até à data, não passa disso mesmo de uma teoria. É importante não esquecer que se a participação das células estaminais no turnover celular normal é um processo que ainda não é completamente compreendido, em situações que não são normais/fisiológicas, como é o caso dos processos de malignização, o conhecimento dos mecanismos, por detrás desta transformação celular, é ainda menor <sup>15</sup>.

Independentemente das causas que lhe dão origem, o cancro apresenta-se, claramente, como uma nova estrutura com “novas funções”: autonomia de crescimento e capacidade de metastização, ou seja independência em relação ao organismo que o sustenta <sup>26</sup>. É no sentido mais amplo da expressão uma “nova forma de vida” que surge por mecanismos múltiplos e complexos, muitos dos quais ainda não totalmente conhecidos mas onde a genética, por um lado, e o meio ambiente, por outro, têm uma participação decisiva.

## 2. Cancro Oral

Cancro Oral (CO), é a designação habitual de um subgrupo de doenças malignas da cabeça e do pescoço, que se pode desenvolver em vários locais da orofaringe e da cavidade oral, como os lábios, a língua, as glândulas salivares, a gengiva, o pavimento da boca e a mucosa bucal <sup>27</sup>, como representado na figura 1, sendo um dos 10 mais diagnosticados em todo o mundo <sup>28-29</sup>.



**Figura 1: Representação esquemática da cavidade oral e dos locais onde o cancro oral se desenvolve mais frequentemente.** O cancro oral pode desenvolver-se em vários locais da orofaringe e da cavidade oral, como nos lábios, língua, glândulas salivares, gengiva, pavimento da boca e mucosa bucal.

(Reproduzido e adaptado de: <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Headneck/Aboutheadneckcancers/Headneckcancers.aspx>, consultado em 21/05/2010)

O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinhocelular, que corresponde a 90-95% dos cancros diagnosticados <sup>28-29</sup>, razão pela qual quando se faz referência ao CO, a designação é usada como sinónimo de carcinoma espinhocelular oral.

Apesar dos avanços terapêuticos conseguidos, tanto a nível cirúrgicos como nos protocolos de quimioterapia e radioterapia, o prognóstico é mau uma vez que o diagnóstico, na maioria dos casos, é feito numa fase avançada da doença, o que se traduz por uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de aproximadamente 50%, ou seja não sofreu melhorias significativas nos últimos 30 anos <sup>28 30</sup>.

O sucesso terapêutico, com recurso à cirurgia, à quimioterapia convencional e radioterapia, é possível com taxas superiores a 80% nos estádios precoces da doença. Nas suas fases mais avançadas o tratamento cirúrgico é muitas vezes agressivo, e afecta profundamente a qualidade de vida dos doentes, quer a nível funcional quer estético, e tanto a quimioterapia como a radioterapia são geralmente pouco eficazes <sup>31</sup>.

De um modo geral os carcinomas da língua têm um comportamento biológico e clínico muito agressivo, com significativa tendência à recidiva pós-cirúrgica, e para desenvolver

metástases, para os nódulos linfáticos regionais. Entre os cancros orais são os que detêm as piores taxas de sobrevivência <sup>32</sup>. Contrariamente, os carcinomas do lábio tendem a ser menos agressivos, com baixo potencial metastático, e consequentemente melhor prognóstico <sup>32</sup>.

A alta mortalidade desta patologia deve-se, principalmente, à sua grande capacidade invasiva e destrutiva dos tecidos vizinhos, altamente característica dos carcinomas espinhocelulares, bem como à sua alta capacidade para se disseminar e metastizar para os nódulos linfáticos locoregionais e órgãos distantes da sua origem primária <sup>33</sup>. São estas características que fazem com que haja um fraco prognóstico para os doentes portadores destas lesões.

Com este trabalho pretende-se fazer uma revisão sobre os diversos aspectos da carcinogénese oral, bem como de mecanismos envolvidos na metastização e no tratamento do CO, de forma a contribuir para um melhor conhecimento desta doença.

## **2.1. Epidemiologia**

O CO está entre os dez cancros mais comuns em todo o mundo com uma incidência anual de 275.000 casos, sendo que dois terços dos casos ocorrem em países em vias de desenvolvimento <sup>31</sup>.

As áreas geográficas de maior incidência são o sul e o sudoeste Asiático (em países como o Sri Lanka, a Índia e o Paquistão), zonas da Europa Ocidental (Hungria e Eslovénia, por exemplo), zonas da América Latina (Brasil, Uruguai) e regiões do Pacífico (Papua-Nova Guiné, Malanésia) <sup>31</sup> como se pode observar na figura 2.

Na União Europeia, o risco de desenvolver cancro oral é de 1,85% para os homens e de 0,37% para as mulheres, tendo o CO sido responsável em 2004 por 67.000 novos casos de cancro. A incidência é maior na Europa Ocidental, quando comparada com a da Europa do Norte ou Sudeste Europeu. Em Portugal, na Espanha, na Alemanha, no norte de Itália e na Suíça as taxas de incidência são intermédias e no Reino Unido o CO é pouco frequente. Na população masculina, os países que apresentam a menor incidência de CO, são o Chipre e a Grécia, e os que apresentam a maior incidência são a França e a Hungria <sup>31</sup>. Em Portugal em 2008 o cancro do lábio, da cavidade oral e da faringe representavam 4% de todos os cancros diagnosticados no sexo masculino, sendo o nono mais prevalente, enquanto no sexo feminino não se encontra entre os 11 mais prevalentes <sup>3</sup>.

À semelhança de outros cancros, o risco de vir a sofrer de CO aumenta com a idade e, na maioria dos casos, ocorre em pessoas com idade superior a 50 anos. Contudo cerca de 6% dos casos desenvolvem-se em pessoas jovens, com idade inferior a 45 anos, principalmente em países da União Europeia e alguns estados dos Estados Unidos da América (EUA) <sup>31</sup>.



**Figura 2: Mapa da distribuição geográfica da incidência do cancro oral.** As áreas/países com elevada incidência, representadas a vermelho, encontram-se no Sul e Sudeste Asiático, zonas da Europa Ocidental e Oriental, América Latina e Caraíbas e ainda algumas regiões no Pacífico (Reproduzido e adaptado de Warnakulasuriya S, 2009)

As diferenças geográficas, na maioria das vezes, são acompanhadas de diferenças profundas na dieta das populações. Estudos revelaram que as populações que ingerem maiores quantidades de frutos, vegetais frescos e de fibras, têm menor probabilidade de desenvolver CO, relativamente às populações com dieta pobre naqueles alimentos, o que sugere que a dieta é um factor importante na etiologia do CO <sup>34</sup>.

Podemos, em resumo, dizer que existe um vasto conjunto de factores associados a diferenças geográficas, familiares, individuais e dietéticas que, em conjunto, são determinantes para o desenvolvimento do CO <sup>34</sup>. Deste modo, a sua prevenção passa pelo conhecimento dos factores de risco a que a população está exposta, e pela implementação de campanhas de estímulo a uma dieta equilibrada, e de prevenção de outros factores de risco tais como o tabagismo e o alcoolismo <sup>31</sup>.

## 2.2. Carcinogénese Oral

Num organismo normal, saudável, as células dividem-se, amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo. Desta maneira a homeostasia do organismo é mantida. As alterações genéticas, muitas vezes acumuladas, da célula podem afectar o seu potencial de crescimento e/ou de resistência à morte por apoptose. Por outro lado, o conhecimento cada vez maior das vias de transdução de sinal tem demonstrado que muitos aspectos da função celular, incluindo a proliferação e a morte, são controlados pelo balanço positivo ou negativo, dos sinais recebidos do microambiente em que se encontra a célula e que podem induzir modificações – estimulação ou repressão – de genes, conferindo-lhe características que podem facilitar o crescimento/resistência à morte. As modificações podem provocar danos em um ou mais genes numa única célula, que neste último caso, a transformam e imortalizam <sup>6 35</sup>.

Os oncogenes, presentes em todas as células, sendo designados proto-oncogenes, têm funções que contribuem para a homeostasia celular. As alterações destes genes podem induzir modificações na célula, conferindo-lhes características neoplásicas <sup>36</sup>. Por outro lado, os genes supressores tumorais estão geralmente inactivos nas células cancerígenas, o que se traduz pela perda de funções normais como a replicação de ADN, pela perda de controle do ciclo celular, da adesão e da interacção com as células do sistema imunitário <sup>36</sup>.

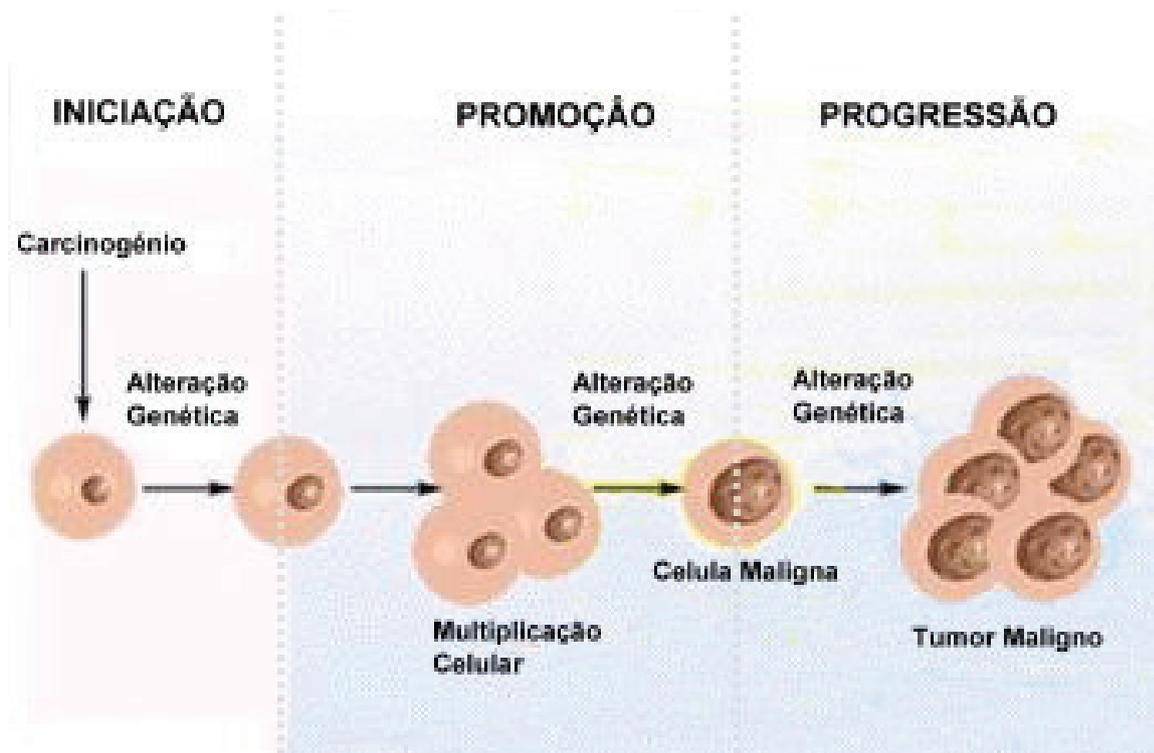
A carcinogénese em geral, e a oral em particular, é um processo multifactorial, que evolui por múltiplas etapas, estando habitualmente dividida em três fases, como a seguir se descreve, e se representa na figura 3.

**Iniciação:** envolve a exposição a um carcinogéneo e a sua interacção com o ADN da célula o que provoca uma alteração permanente, geralmente num único gene. A célula iniciada pode ser eliminada, permanecer latente no organismo ou vir a adquirir outras alterações, noutros genes, na dependência de novos estímulos.

**Promoção:** é a fase mais longa. Está associada à proliferação e acumulação das células iniciadas, submetidas à exposição de agentes promotores. Como estes agentes não são mutagénicos, os seus efeitos ainda podem ser reversíveis numa fase inicial, mas em fases mais avançadas a célula adquire múltiplas alterações, ligadas à activação de vários oncogenes, o que lhe confere o fenótipo neoplásico maligno.

**Progressão:** fase em que ocorrem novas alterações genéticas que conduzem à aquisição irreversível do fenótipo maligno, e muitas vezes também invasivo <sup>27</sup>.

Modernamente associa-se a teoria das células estaminais ao desenvolvimento do cancro. Como já referido anteriormente, de acordo com esta teoria o cancro surge da expansão anormal da população de células estaminais neoplásicas com capacidade de auto-renovação, característica comum às células estaminais normais <sup>20-21</sup>. Assim, o CO pode surgir quer de células estaminais cancerígenas, quer de células mais diferenciadas que acumularam alterações genéticas ou epigenéticas que provocam a desrepressão de genes que codificam proteínas envolvidas no crescimento, na divisão, na diferenciação e na morte celular por apoptose <sup>20</sup>.



**Figura 3: Etapas da carcinogênese.** A carcinogênese decorre em múltiplas etapas. Na primeira, a Iniciação ocorre a exposição única a um agente carcinogénico, físico, químico, ou outro, o que induz mutação no ADN. A célula fica mais vulnerável a futuras agressões e alterações genéticas e é designada célula iniciada. A Promoção, fase seguinte, implica a exposição repetida da célula iniciada a um agente promotor, não necessariamente carcinogénico, que promove a sua multiplicação e crescimento. A célula adquire múltiplas alterações ligadas à activação de vários oncogenes o que, em divisões sucessivas, lhe confere o fenótipo neoplásico maligno. Por fim, a Progressão é a fase em que a célula prolifera, adquire novas mutações e, de forma irreversível, as características de malignidade. (Reproduzido e adaptado de: [www.livercancer.com/cancer\\_carcinogenesis.html](http://www.livercancer.com/cancer_carcinogenesis.html), acedido em 17.05.2010)

### 2.2.1 Agentes Carcinogéneos/Factores de Risco e Cancro Oral

Actualmente é sabido que o cancro oral resulta de uma conjugação de vários factores, num processo multifásico. Existe uma forte componente individual e susceptibilidade genética, que estando estreitamente associada à exposição crónica a diversos factores de risco exógenos, como a alimentação, o tabagismo, o alcoolismo crónico, agentes infecciosos, como os vírus do papiloma humano, serotipo 16, (HPV-16) factores ocupacionais, entre outros, podem levar ao desenvolvimento de processos malignos <sup>4</sup>, alguns cuja acção está já identificada e outros ainda em investigação, como se representa na tabela 1.

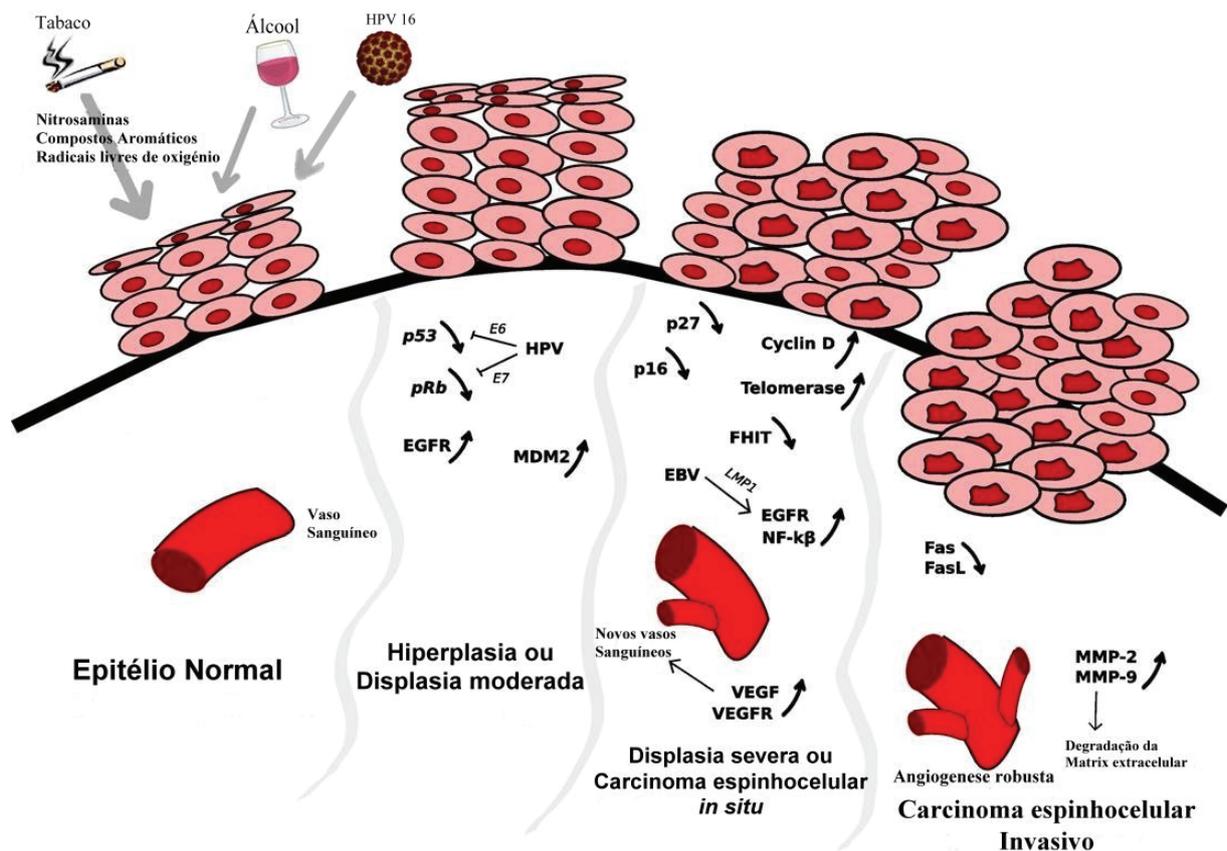
**Tabela 1: Agentes carcinogénos e factores de risco para o cancro oral**

<i>Reconhecidos</i>	<i>Fortemente sugestivos</i>	<i>Possíveis</i>	<i>Especulativos</i>
Fumo do cigarro / tabagismo	Luz solar (lábio)	Vírus	Colutórios
Mascar tabaco	Radiação	Deficiências imunitárias	Doença periodontal
Abuso de álcool		Dentição	Familiar
Mascar "betel quid"		Etnia	

(Reproduzido e adaptado de Warnakulasuriya S, 2009)

A exposição aos agentes cancerígenos determina, progressivamente, uma exaustão dos mecanismos de defesa adaptativos celulares. Com isso, o processo de reparação dos danos no ADN falha permitindo que se acumulem alterações genéticas, que podem induzir a apoptose ou mais frequentemente a proliferação e transformação neoplásica <sup>37</sup>.

À medida que as células acumulam alterações moleculares tornam-se funcionalmente independentes do epitélio oral envolvente. As suas vias de sinalização são alteradas favorecendo a capacidade proliferativa e a sobrevivência celular bem como a gradual acumulação de diversas alterações moleculares, características próprias de malignidade, como representado na figura 4.



**Figura 4: Modelo da carcinogénese oral baseado na teoria da evolução por etapas.** A acção dos diferentes factores de risco, externos e internos, origina alterações que conduzem à transformação de um epitélio normal em epitélio maligno. Os mecanismos moleculares subjacentes ao aparecimento e progressão do cancro da cavidade oral são múltiplos e ocorrem em diferentes etapas. Estes mecanismos são resultantes da acumulação de alterações moleculares como o aumento da expressão de Ciclina D1, mutações do gene supressor tumoral p53, aumento da expressão do receptor para o factor de crescimento da epiderme (EGFR) e do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF), diminuição da expressão de Fas/FasL e aumento da expressão de Metaloproteínas da Matriz (MMP), entre outras alterações locoregionais. (Reproduzido e adaptado de Tsantoulis PK *et al*, 2007)

### 2.2.1.1 Tabaco e Álcool

O tabagismo e o alcoolismo crónicos são os principais factores de risco para o cancro da cavidade oral. Apenas 15 a 20% dos doentes, com esta patologia maligna, não referem estes hábitos de consumo excessivo. Apesar de serem factores de risco independentes, quando associados têm um efeito sinérgico, ou seja: o risco de desenvolver CO aumenta cerca de sete vezes com o tabagismo crónico, e até quinze vezes quando este está associado ao consumo exagerado e crónico de álcool<sup>27 35 38</sup>.

Calcula-se que o tabaco seja factor causal de cerca de 60% de todos os cancros<sup>39</sup>, estimando-se que este seja responsável por 40-45% de todas as mortes por cancro no sexo

masculino, nos países industrializados, e responsável por 90 a 95% das mortes por cancro do pulmão <sup>40</sup>.

Estudos epidemiológicos demonstraram que fumadores crónicos têm um risco muito mais elevado de vir a desenvolver neoplasias malignas, quando comparados com fumadores esporádicos. Este risco permanece por aproximadamente 10 anos, após a cessação tabágica, e decresce cerca de 40% a partir dessa altura. Conclui-se, portanto, que os ex-fumadores continuam, sempre, a ter um risco muito mais elevado, quando comparados com não-fumadores <sup>41</sup>. É, pois, importante não esquecer que 50% da população já foi fumadora <sup>39</sup>.

O fumo do tabaco é composto por milhares de substâncias, mais de 4.000, incluindo agentes iniciadores como o benzopireno, dibenzopireno e dibenzoantraceno e agentes promotores como nafatalenos, benzopiraleno e derivados fenólicos, múltiplas substâncias mutagénicas e nitrosaminas, entre outras <sup>4</sup>. Muitas dessas substâncias, que são carcinogénicas, tem de sofrer activação metabólica, para poderem exercer a seu efeito. Esta activação metabólica leva à formação de aductos de ADN, que são centrais para o processo de carcinogénese <sup>42</sup>. Se os aductos de ADN escaparem aos mecanismos de reparação celular e persistirem podem levar à mutação permanente, que se ocorrer numa região crítica, pode levar à activação de um oncogene ou à inactivação de um gene supressor tumoral <sup>42</sup>.

A associação da nicotina com as nitrosaminas específicas do tabaco podem ligar-se directamente a receptores, levando à activação de vias de sinalização intracelular, como a AKT e do factor de transcrição nuclear NF-Kb, que podem por sua vez levar à diminuição da apoptose, ao aumento da angiogénese bem como ao aumento das transformações celulares <sup>42</sup>.

A acção cancerígena do fumo do cigarro pode ser potenciada quando, no cigarro, ao tabaco se misturam fragmentos de noz de areca. Este tipo de consumo constitui um verdadeiro problema de saúde pública em países como a Índia, o Paquistão e o Bangladesh, onde a incidência e prevalência do cancro da cavidade oral é significativa, e directamente associada a este hábito <sup>36 43</sup>.

Por outro lado, o álcool que é um factor de risco muito importante para o cancro do esófago, da laringe, da faringe, da mama e do fígado, também o é para o CO <sup>44</sup>. O acetaldeído, o primeiro metabolito do etanol, é carcinogénico. Devido à baixa actividade da enzima aldeído-desidrogenase (ALDH) na boca pode ocorrer, aí, acumulação de acetaldeído capaz de provocar a quebra da dupla cadeia de ADN, e formar complexos com diferentes moléculas, principalmente com proteínas, o que compromete o metabolismo celular <sup>41</sup>. Por outro lado, verificou-se que o consumo crónico e excessivo de álcool provoca diminuição da espessura epitelial e, também, que o processo de maturação epitelial é influenciado pela ingestão de álcool, por acção directa do acetaldeído <sup>41</sup>. Sabe-se ainda que o consumo de álcool modifica a capacidade antioxidante do organismo, reduzindo tanto a actividade das defesas enzimáticas como das não-enzimáticas o que, conseqüentemente, poderá condicionar um estado de stresse oxidativo <sup>44-45</sup>. Neste caso as espécies reactivas,

em excesso, podem interagir com as macro-moléculas celulares, nomeadamente com os lípidos, as proteínas e o ADN, promovendo a lesão oxidativa irreversível e interferindo com as funções vitais da célula e com vias de sinalização celular, altamente sensíveis a alterações da homeostasia redox. Uma e outras poderão conduzir a alterações nos mecanismos de sinalização celular, à instabilidade genética e à lesão celular que podem estar implicadas na iniciação e na promoção do cancro <sup>46-48</sup>.

Também, as glândulas salivares podem sofrer alterações em consequência do consumo exagerado de álcool. A sua morfologia e função alteram-se, o que se traduz pelo aumento de volume, devido à fibrose e infiltração gorda, e pela diminuição do fluxo salivar <sup>45</sup>.

Contudo, apesar de se estimar que aproximadamente 75% dos casos de cancro oral são devidos à associação do uso do tabaco com o consumo de álcool <sup>49</sup>, não existe evidência experimental quanto ao facto do etanol puro ser um carcinogéneo. Admite-se que o álcool funciona como um potenciador de outras substâncias com potencial carcinogénico, um fenómeno designado por co-carcinogenese <sup>49</sup>.

Em vários estudos (Du, *et al*; Howie, *et al*), o álcool é indicado como um factor que aumenta a penetração de produtos carcinogéneos através da mucosa oral <sup>50</sup>. Nesses estudos foi sugerido que baixas concentrações podem ser mais eficazes do que as altas, uma vez que as altas concentrações de etanol podem actuar como um fixador, o que confirma as dúvidas quanto ao potencial carcinogénico do etanol puro, referido anteriormente <sup>51-52</sup>.

Outro mecanismo que pode explicar o efeito do álcool, relaciona-se com a alta quantidade de calorias, que as bebidas alcoólicas possuem, o que provoca a redução do apetite. Esta situação potencia o aparecimento de desequilíbrios dietéticos em doentes com graves problemas de alcoolismo, acabando por originar um marcado défice nutricional <sup>40</sup> o que fragiliza o organismo, e consequentemente, leva à debilidade do sistema imunitário.

### **2.2.1.2. Nutrição**

Em 2003 a Organização Mundial de Saúde (OMS), reportou no seu relatório mundial sobre o cancro, que 35% a 55% dos casos de cancro humano podia ser atribuído a deficiências ou desequilíbrios dietéticos <sup>53</sup>. O mesmo é aplicável ao cancro oral <sup>54</sup>. Parece haver evidência suficiente que nos permite associar a maior incidência do cancro oral com regiões com maiores variações e desequilíbrios nutricionais <sup>54</sup>.

A noção de que a dieta, por um lado a ingestão de micronutrientes como vitaminas, ácido fólico,  $\beta$ -carotenos, cálcio, selenium, isotiocianatos, indóis, fenóis, esteróides vegetais, etc, e por outro a ingestão de macronutrientes como as fibras, gorduras, e proteínas e o estado nutricional, estão relacionados com o risco de desenvolver cancro não é nova <sup>55-56</sup>

Sabemos que a alimentação pode propiciar o desenvolvimento de cancro de duas formas distintas: através do efeito directo de substâncias carcinogénicas presentes nos alimentos como por exemplo aflotoxinas, amins heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc... e/ou indirectamente através de aditivos, que muitas vezes têm origem na

produção agrícola ou industrial, ou através de substâncias provenientes da síntese *in vivo* de produtos com efeito carcinogénico <sup>11 55</sup>. Por exemplo, os nitratos usados como fertilizantes químicos, especialmente para os vegetais, quando em grande quantidade, podem ser metabolizados ao longo do tubo digestivo, a reacção entre os nitritos e as aminas, principalmente as aminas secundárias, na presença de um pH suficientemente baixo, como o que ocorre especialmente no estômago, pode originar formação de nitrosaminas <sup>57</sup>, com acção cancerígena reconhecida.

Contudo o efeito da dieta no surgimento do cancro, parece ser modesto quando comparado com o efeito do tabagismo e do alcoolismo <sup>54</sup>.

Alguns estudos, realizados nos EUA, sugerem que a associação da obesidade com alguns tipos de cancro pode levar ao aumento da mortalidade. No entanto o facto de, a obesidade estar normalmente associada a diabetes mellitus e a doenças cardiovasculares, impossibilita provar que *per se* a obesidade é um factor envolvido na maior mortalidade dos doentes com cancro <sup>4</sup>. As alterações do meio hormonal, que ocorrem nestes doentes, são possíveis factores que potenciam o desenvolvimento de processos cancerígenos, mas que não estão completamente esclarecidos. Nunca foi demonstrado que o excesso de peso ou a obesidade, possa isoladamente, iniciar a transformação cancerígena contudo, indirectamente, contribui para a génese do cancro, pela acumulação progressiva de compostos carcinogénicos no tecido adiposo <sup>4</sup>.

Outro mecanismo, que pode provocar a transformação maligna das células, é a acumulação de dano oxidativo. Este processo pode lesar o ADN, tanto pode ser causado por uma alimentação incorrecta como por um estilo de vida pouco saudável. Um nível correcto de antioxidantes é fundamental na defesa contra os radicais livres, e consequentemente contra o desenvolvimento de células cancerígenas <sup>11</sup>. Parece que para além da capacidade antioxidante, a existência de polimorfismos na actividade da enzima detoxificante GST (Glutathione S-transferase), bem como de outros genes responsáveis pelo metabolismo podem também modular o risco de desenvolvimento de cancro. Estes processos também são modulados pelos níveis plasmáticos dos micronutrientes, como sejam a vitamina C e E,  $\beta$ -carotenos, folato e zinco <sup>11</sup>.

### **2.2.1.3. Vírus**

Mais recentemente tem-se dado uma certa ênfase à importância dos agentes biológicos como sendo responsáveis por processos malignos na cavidade oral. São propostos alguns mecanismos pelos quais os microorganismos podem levar ao desenvolvimento de neoplasias, entre eles a metabolização de procarcinogénios, a indução de inflamação crónica, e a influência directa dos microorganismos no ciclo celular <sup>58</sup>.

De entre os microorganismos, com potencial oncogénico, destacamos os vírus, pela importância que cada vez mais lhes é atribuída na carcinogénese oral.

Estima-se que os vírus sejam responsáveis por cerca de 16% das neoplasias no mundo inteiro <sup>4</sup>. Entre os vírus com potencial oncogénico nos países ocidentais, destacam-se o

vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da Hepatite B e C (VHB e VHC), e o vírus Epstein-Barr <sup>4</sup>. Uma vez que o equilíbrio celular pode sofrer alterações profundas em consequência de infecções virais, tem sido atribuído a estas infecções um papel de relevo na fisiopatologia do cancro, e na carcinogénese oral em particular, sobretudo em idades mais precoces, facto que poderá explicar a incidência tendencialmente aumentada desta neoplasia maligna nas populações mais jovens <sup>38</sup>.

O HPV é um vírus de ADN, pequeno, sem envelope da família *Papovaviridae*, com tropismo para células epiteliais, que pode induzir hiperplasia em epitélios estratificados escamosos. Estão identificados mais de 100 tipos diferentes de HPV, alguns referidos como de “baixo risco”, associados ao desenvolvimento de lesões benignas, outros de “alto risco” associados ao desenvolvimento de lesões malignas <sup>38</sup>. Após a infecção pelo HPV são possíveis três situações distintas: um estado latente sem lesão diagnosticável; estado sub-clínico, em que são necessárias técnicas e métodos específicos para detectar as lesões; e por último um estado de doença clínica de gravidade variável que pode ir do papiloma ao cancro invasivo. Este é resultante de uma infecção transformante em que o ADN viral integrado no genoma, da célula hospedeira, vai modificar todos os seus mecanismos homeostáticos o que, em última análise, se traduz por alterações funcionais e morfológicas, características da célula cancerosa <sup>59</sup>.

O comportamento da infecção pelo HPV, particularmente pelos serotipos 16 e 18 (HPV-16 e HPV-18) está relacionado, de uma maneira particular, com duas formas diferentes de transcrição de oncogenes virais: - Uma a transcrição E1-E2 que assegura a repressão dos oncogenes E6-E7, e a manutenção das funções das proteínas p53 e da proteína retinoblastoma (pRB); Outra se não ocorrer transcrição de E1-E2, neste caso os oncogenes E6-E7 são naturalmente expressos, assim como as oncoproteínas E6 e E7, o que é traduzido pela inibição das funções da p53 e pRB, respectivamente. A oncoproteína E6 é responsável por silenciar e degradar, na via da ubiquitina proteasoma, a p53, que é uma proteína com uma importante função de regulação do ciclo celular, nomeadamente na fase G1, e de supressão tumoral podendo igualmente induzir a apoptose <sup>12</sup>. Já a oncoproteína E7 tem efeito semelhante mas sobre a pRb, que regula a passagem de fase G1/S do ciclo celular, e que é também uma proteína com função de supressão tumoral <sup>12</sup>. Este mecanismo tem sido defendido por vários autores como sendo responsável pela carcinogénese induzida por HPV <sup>56 59-60</sup>.

O HPV é o agente etiológico mais importante do carcinoma do colo do útero onde, em mais de 90% dos casos, é possível identificar ADN viral, integrado no genoma da célula. No CO o seu papel tem sido equacionado e estudado desde, pelo menos, 1985. Apesar de ainda não existirem dados concretos, e definitivos, quanto à sua verdadeira participação na fisiopatologia desta doença, há fortes indícios que associam a infecção por HPV, serotipo 16 (HPV-16) ao CO, ao que não serão indiferentes as profundas modificações nos hábitos e costumes sociais das últimas décadas <sup>27 60</sup>.

Estudos sobre a prevalência do HPV no cancro oral, têm demonstrado resultados bastante variáveis, estando presente em algumas amostras e ausente noutras. Esta variação, nos resultados, poderá ser causada quer por variações no tamanho da amostra ou na população estudada ou até devido à sensibilidade das técnicas empregues <sup>12</sup>.

#### **2.2.1.4. Predisposição Genética**

A instabilidade genómica reflecte-se na propensão e na susceptibilidade do genoma para adquirir múltiplas alterações, tais como a perda da heterozigotia (LOH) e a instabilidade microsatélite (MSI) em sequências repetidas <sup>61</sup>.

Estas alterações genéticas podem ser divididas em duas categorias: as dominantes que ocorrem em proto-oncogenes e também em genes supressores tumorais; e as recessivas que são comuns em genes supressores tumorais, causam perda da função <sup>62</sup>. A instabilidade genética, hereditária ou adquirida, torna, assim, a pessoa mais susceptível ao cancro da cavidade oral. Vários estudos epidemiológicos têm vindo a salientar o maior risco para o CO, em doentes com história familiar desta doença <sup>61</sup>. As alterações genéticas e epigenéticas mais frequentes no CO (figura 4), incluem alterações em genes supressores tumorais, tais como FHIT (perda de heterozigotia [LOH] na região cromossómica 3p14), p16 (promotor da hipermetilação ou LOH para 9p21) e p53 (inactivação/perda ou mutação para 17p) <sup>63</sup> e a elevada expressão da ciclina D1 assim como a activação de telomerasas <sup>64</sup>.

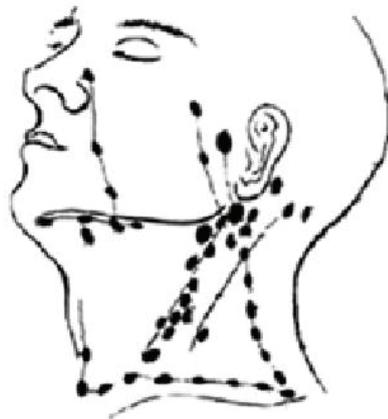
Depois de tudo o que foi dito, podemos, em resumo, afirmar que existem diferentes factores responsáveis pela carcinogénese oral, de origem genética, infecciosa e ambiental que podem variar de acordo com os estilos de vida, as diferenças geográficas, culturais, étnicas e socio-económicas. Como outros <sup>38</sup>, podemos afirmar que uma melhor definição da etiologia e das alterações celulares e moleculares, relevantes à evolução do cancro, permitirá que este seja precocemente diagnosticado, adequadamente tratado e controlado e poderá, ainda, permitir uma intervenção preventiva eficaz, no futuro.

### 3. Metastização

A evolução do cancro é avaliada segundo critérios clínicos patológicos e moleculares que acompanham a progressão tumoral e a metastização<sup>65</sup>.

A realidade com que os clínicos se deparam, é a grande facilidade com que se desenvolve a metástase, e a grande probabilidade de estas ocorrerem na fase inicial do curso da doença. Esta característica toma uma maior dimensão, se pensarmos que a ocorrência de metástases é um dos melhores indícios que o clínico possui para determinar a agressividade e conseqüente sobrevivência do doente. Se pensarmos que aproximadamente 30% dos doentes com cancro oral apresentam metástases clinicamente detectáveis quando é realizado o diagnóstico, e que dos que não apresentam metástases cerca de 25% as vão desenvolver, num período de dois anos<sup>66</sup>, podemos ver o quão importante é a prevenção da ocorrência de metástases no cancro oral.

O CO caracteriza-se por um elevado grau de invasão e metastização para os nódulos linfáticos do pescoço e da cabeça, como representado na figura 5, sendo pouco frequente a metastização à distância. Neste caso, o esófago e os pulmões são os órgãos mais afectados<sup>67</sup>.



**Figura 5: Metastização e cancro oral.** Representação da rede linfática na cabeça e pescoço. O grau de envolvimento dos nódulos linfáticos cervicais é o factor de prognóstico mais importante. Deste modo o estudo da metastização para os nódulos linfáticos regionais, tem sido uma matéria de grande interesse para melhorar o prognóstico (Reproduzido e adaptado de Erdem NF *et al.* 2007)

O facto de a taxa de sobrevivência do cancro oral, aos cinco anos, se situar num valor que ronda os 50% permite concluir que o controlo da metastização, principal indicador de prognóstico, é de grande importância para melhorar a sobrevivência destes doentes<sup>67-69</sup>.

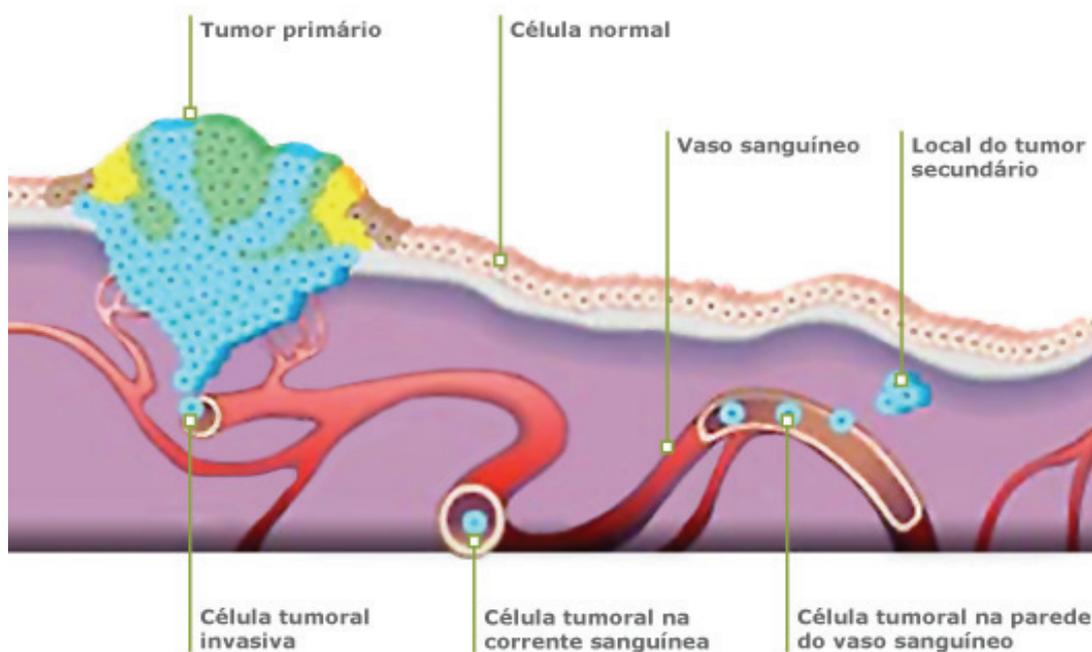
A metástase é um foco de células malignas, relacionado com um cancro primário, que se desenvolve à distância deste e que, microscopicamente, reproduz as características morfológicas do cancro primitivo<sup>70</sup>. O processo de metastização evolui em várias etapas

que incluem a proliferação, a perda de adesão celular, a angiogénese, a invasão, a migração e a proliferação celular à distância <sup>71</sup>, como podemos ver na figura 6.

As duas principais vias de metastização são linfática que dá origem a metástases para os nódulos linfáticos locais e regionais e a via sanguínea, que dá origem a metástases à distância <sup>65</sup>.

A metástase, tal como o próprio processo cancerígeno, e a sua manutenção, depende principalmente de dois processos fisiológicos a angiogénese, pela qual é criada uma rede vascular capaz de suprir as necessidades das células tumorais, e os mecanismos de adesão celular. São estes dois mecanismos, ou melhor as alterações a estes mecanismos, induzidas pelo processo de malignização, que vão permitir que o foco de células malignas primário, se desenvolva e tenha capacidade para sobreviver e crescer no organismo do hospedeiro, e também vão permitir a formação de metástases <sup>7</sup>.

Se por um lado é muito provável que um doente desenvolva metástases por outro este



**Figura 6: Alterações que levam à ocorrência de metastização.** Existem alguns predicados fundamentais para que o surgimento de uma metástase seja possível, primeiro é necessário que uma célula ou um grupo de células consiga abandonar o tumor primário, é fundamental que estas células tenha capacidade para invadir o tecido do hospedeiro, e sejam capazes de sobreviver para que posteriormente possam proliferar. Para começar a célula tem de entrar na circulação, para tal é importante que consiga invadir a membrana basal que envolve os vasos sanguíneos, e a partir deste momento poder entra em circulação. Depois é fundamental que a célula possa aderir à superfície endotelial das células em órgãos distantes, para que deste modo se dê a migração da mesma através das junções interendoteliais, de seguida deve ocorrer a degradação da membrana basal periendoelital e da matriz extracelular, para que por fim possa ocorrer a migração e a proliferação, e com estas a estabilização da metástase. (Reproduzido de <http://bajap.no.comunidades.net/>, consultado em 2010/05/15).

processo é altamente competitivo e selectivo. Não deixa de ser curioso o facto de que apenas uma ínfima percentagem, menos de 0,01%, de todas as células malignas em circulação pertencentes ao tumor, é que vão ter as condições necessárias para que se possam desenvolver metástases <sup>72-73</sup>.

É sabido que as células tumorais se disseminam, de forma homogénea por todos os órgãos mas que apresentam preferência pelo órgão onde proliferam, esta situação deve-se possivelmente à presença de factores de crescimento locais ou hormonais presentes nos órgãos alvo, onde ocorre a proliferação celular <sup>33</sup>.

As células tumorais são menos dependentes, ou mesmo independentes, dos factores de crescimento exógenos. Em muitos casos a independência é o resultado da produção autócrina e/ou modificação da resposta a vários factores, traduzindo-se por um crescimento acelerado e anárquico <sup>65</sup>.

Neste processo de crescimento rápido e anárquico as células perdem também a capacidade de adesão entre si e à matriz extracelular (MEC) ficando independentes do microambiente envolvente, o que facilita a sua libertação e entrada em circulação, podendo originar metástases à distância <sup>74</sup>, como já tinha sido referido, e representado anteriormente na figura 6.

### **3.1. Angiogenese**

Para o desenvolvimento e manutenção de uma massa tumoral, cada vez maior, é necessária a existência de uma vasta rede de novos vasos sanguíneos, capaz de fornecer os nutrientes necessários à manutenção do tumor. O microambiente tumoral, em especial a hipóxia, pode induzir a angiogénese facilitando o suprimento alimentar ao tumor mas, associadamente, aumentando o risco de metastização por via sanguínea <sup>65</sup>.

A angiogenese é um processo fisiológico que leva ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, que tem papel crucial durante a embriogenese, em processos fisiológicos como a gravidez e a cicatrização de feridas. É um processo regulado com rigor e com duração limitada <sup>75</sup>. Torna-se igualmente importante em situações patológicas como as doenças inflamatórias e particularmente no cancro, onde um processo de angiogenese descontrolada, com consequente formação de neovasos, pode estar associado à exacerbação e à progressão da doença <sup>76</sup>.

Em condições normais há um equilíbrio entre as moléculas com potencial proangiogénicas e as moléculas com potencial antiangiogénicas. Quando se dá o desequilíbrio desta situação normal, com predominância de moléculas com potencial proangiogénico, dá-se a formação de novos vasos pelo processo de angiogénese <sup>75</sup>.

A primeira vez que foi feita a relação entre metastização, crescimento tumoral e angiogenese, foi nos anos 70 por Folkman <sup>77</sup>. Algumas observações realizadas posteriormente permitiram concluir a existência de limitação do tamanho dos tumores na ausência de neovascularização, o que acabou por confirmar a análise de Folkman <sup>77</sup>. Actualmente é um dado adquirido que a rede vascular que se desenvolve em redor da

massa tumoral, em resposta a diversos factores de crescimento, é crucial para a proliferação, sobrevivência e metastização do tumor, o que comprova as observações realizadas por Folkman <sup>78</sup>.

Um tumor com um diâmetro inferior a 5mm pode receber oxigénio e nutrientes por difusão, enquanto que um tumor com um diâmetro superior a 5mm requer a proliferação e a morfogénese de células endoteliais vasculares <sup>75</sup>.

Os responsáveis pela regulação da angiogénese e da neovascularização tumoral com maior importância, são os membros da família dos factores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é uma glicoproteína que existe em 4 isoformas <sup>75</sup>, e os seus receptores (VEGFR), expressos quase exclusivamente pelas células endoteliais <sup>75</sup>, que actuam ao nível do aumento da permeabilidade dos vasos, no crescimento das células endoteliais, bem como na sua proliferação, migração e diferenciação <sup>79</sup>. A família do VEGF não se limita a possuir um potencial angiogénico, possui também uma importante função linfangiogénica, que também é considerada uma das responsáveis pela capacidade de metastização do carcinoma espinhocelular oral <sup>28 80-81</sup>.

O VEGF-A de que existem diferentes isoformas, é um factor angiogénico chave e é muitas vezes usado pelo tumor para alterar o seu fenótipo angiogénico. Uma das características deste factor é a sua capacidade linfoangiogénica, demonstrada experimentalmente, que leva à formação de metástases nos nódulos linfáticos, através da activação do receptor 2 do VEGF (VEGFR-2) associado à proliferação endotelial e à quimiotaxia com o que leva à chamada de macrófagos. Estes por sua vez, produzem localmente outros factores linfoangiogénicos, como o VEGF-C/VEGF-D que contribuem para a ampliação de todo o processo <sup>75 81</sup>.

Vários estudos clínicos têm relacionado o aumento da expressão do VEGF-A como sendo uma característica comum em muitos casos de cancro, como o cancro da mama, do ovário e do pulmão. Várias publicações recentes suportam a sua associação com o envolvimento positivo dos nódulos linfáticos em muitos tumores sólidos <sup>78-79 81-82</sup>, o que o torna um potencial alvo terapêutico <sup>75</sup>.

Num estudo clínico, publicado em 2004 (Uehara, M, *et al*, 2004), foi avaliada a expressão dos níveis de VEGF num grupo de 63 doentes com carcinoma espinhocelular oral, através de análise computadorizada da expressão imunohistoquímica do VEGF. O grupo de estudo era constituído por 11 doentes no estágio I, 17 no estágio II, 9 no estágio III e por fim no estágio IV 26 doentes <sup>78</sup>. Os resultados demonstraram não haver correlação entre a expressão de VEGF e a existência ou ausência de metástases regionais nos nódulos linfáticos. Contudo a expressão de VEGF pode funcionar como um marcador de prognóstico para os doentes com carcinoma espinhocelular oral <sup>78</sup>, uma vez que a expressão média de VEGF, em percentagem, foi superior nos doentes que se encontravam em estádios mais avançados, comparativamente à observada no grupo de doentes que se encontravam em estádios mais precoces da doença <sup>78</sup>.

Também em 2004 foi publicado um estudo realizado por Shintani *et al*, no qual se procedeu a uma análise imunohistoquímica de células recolhidas de 98 doentes com

cracinoma espinhocelular oral, os quais ainda não tinham sido submetidos a nenhum tipo de tratamento <sup>79</sup>. Concluiu-se com este estudo que não existe correlação entre o estágio T dos tumores e a expressão de qualquer dos membros da família VEGF. Concluiu-se também, que o aumento da expressão de VEGF-C e D está, frequentemente, associada a tumores com potencial infiltrativo local e para os nódulos linfáticos. Em relação ao VEGF-A, não foi possível tirar conclusões quanto à influência na linfangiogénese, devido, segundo os autores à grande heterogeneidade do grupo estudado <sup>79</sup>.

O que nos pode levar a questionar até que ponto as outras conclusões, retiradas deste estudo, são plausíveis, uma vez que a heterogeneidade do grupo também pode influenciar a relação entre a expressão de VEGF-C e D. É certo que estatisticamente os valores para o VEGF-C e D são significativos não o sendo no caso do VEGF-A, mas a realidade é que se os grupos são heterogéneos para uma avaliação também o são para a outra.

O VEGF-C apresenta propriedades angiogénicas e linfagiogénicas, nomeadamente devido à activação dos receptores 2 e 3 (VEGFR-2 e VEGFR-3) respectivamente. Tendo em conta que para muitos autores a formação de novos vasos linfáticos tem maior impacto na formação de metástases do que a formação de novos vasos sanguíneos, é lógica a avaliação da expressão do VEGF-C e a sua influência na ocorrência de metástases.

Em 2003 um estudo realizado por Kishimoto et al, fez a correlação entre a expressão de VEGF-C e a previsão da ocorrência de metástases nos nódulos linfáticos na fase inicial do carcinoma espinhocelular oral <sup>83</sup>. Foi efectuada a avaliação imunohistoquímica da expressão de VEGF-C nas células tumorais, num grupo de 62 doentes (25 do sexo feminino e 37 do sexo masculino). Um dos critérios de inclusão neste estudo era a necessidade de que os doentes não tivessem sido sujeitos a qualquer tipo de tratamento prévio, para a doença em causa. Os resultados, obtidos permitiram verificar a existência de uma grande correlação entre a expressão de VEGF-C e a presença de metástases nos nódulos linfáticos, em carcinoma espinhocelular em estádios mais iniciais (T1 ou T2): 88,2% dos doentes com carcinoma espinhocelular em estágio inicial, apresentavam aumento da expressão do VEGF-C e, nos mesmos, verificou-se a ocorrência de metástases.

Pelo contrário, em estádios mais avançados da doença (T3 e T4), não foi encontrada qualquer correlação entre a expressão de VEGF-C e a presença de metástases nos nódulos linfáticos. Importante ainda foi o facto de não ter sido encontrada nenhuma associação entre a expressão de VEGF-C e a idade, o sexo, o tamanho ou a diferenciação do tumor <sup>83</sup>. Este resultado permitiu concluir por um lado que a expressão do VEGF-C não está condicionado por outros factores que não sejam o próprio desenvolvimento da doença e por outro que o VEGF-C pode constituir um bom marcador preditivo, para os doentes com carcinoma espinhocelular oral em fase inicial de desenvolvimento <sup>83</sup>.

A juntar a estes dados a sobrevivência dos doentes avaliados, neste estudo, ao fim de 5 anos foi superior nos doentes que não apresentaram expressão de VEGF-C, comparativamente aos doentes com tumores que demonstraram maior expressão de VEGF-

C, numa razão de 83,3% para 50,7% respectivamente<sup>83</sup>. Esta diferença parece estar relacionada com a maior capacidade de metastização que os tumores com expressão de VEGF-C possuem, o que influencia de forma determinante o curso da doença, sendo que nesses casos a doença é mais agressiva. As conclusões deste estudo são concordantes com as dos estudos realizados pelas equipas de Li *et al*<sup>84</sup> e Sedivy *et al*<sup>85</sup>.

Contrariando as conclusões dos estudos referidos, anteriormente, foi publicado um outro em 2008, por Faustino *et al*, no qual foi feita a avaliação de 87 doentes com carcinoma espinhocelular oral, em estágio inicial da doença (I e II). Os doentes não tinham sido submetidos a nenhum tratamento anti-cancerígeno prévio. Neste estudo foi avaliada a expressão de VEGF-C, por técnicas imunohistoquímicas, nas células malignas por dois operadores experientes e sem conhecimento da análise histológica das células ou do estado do doente<sup>80</sup>.

Ao contrário dos resultados obtidos em 2003 por Kishimoto *et al*, relativos à expressão de VEGF-C no carcinoma espinhocelular oral, Faustino *et al*, não encontraram relação entre a expressão de VEGF-C e a maior incidência de metástases nos nódulos linfáticos. Os autores concluem, neste estudo, que a presença de metástases nos nódulos linfáticos não se consegue antever pela determinação da expressão do VEGF-C, contrariando assim alguns dos estudos publicados sobre esta temática<sup>80</sup>.

Como se pode observar, os resultados e as conclusões dos diferentes estudos quanto à relação entre a expressão de VEGF e a presença, ou a maior propensão para o desenvolvimento de metástases nos nódulos linfáticos da região cervical decorrentes de um carcinoma espinhocelular oral são contraditórios.

Esta situação pode dever-se ao facto de os grupos de estudo não serem homogéneos, como alguns referem, mas também pode ter muito que ver com o tamanho da amostra, algo reduzida, o que pode ser um factor decisivo para que os resultados não sejam concordantes.

### **3.2. Adesão Celular**

Sendo a metastização um processo dinâmico no qual existe uma constante interacção entre o hospedeiro, o microambiente, e as células tumorais, é também um processo multifactorial. Este predicado também é válido para os processos que levam à degradação da membrana basal subjacente às células tumorais<sup>29</sup>. Este fenómeno é fundamental para que ocorra a invasão do tumor primário, mas também para que as metástases se possam alojar nos órgãos para onde as células tumorais se dirigem, e até para a formação de novos vasos sanguíneos. Como já foi anteriormente referido, as células tumorais caracterizam-se pela perda de adesão, entre si e à MEC tornando-se independentes do microambiente envolvente, o que facilita a sua libertação podendo migrar e originar metástases à distância.

As interacções das células com a MEC são fundamentais para o crescimento e sobrevivência dos tecidos normais, uma vez que fornece os elementos estruturais que estabilizam o microambiente celular, através de interacções com diferentes moléculas de

adesão. Uma propriedade, característica, das células neoplásicas é a sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se independentemente das interações que estabelecem entre si e com a MEC <sup>86</sup>.

Para o processo metastático progredir, as células neoplásicas precisam de degradar a membrana basal subjacente e a MEC, o que é realizado pela acção de diversas proteases segregadas por diferentes tipos celulares, como por exemplo as Metaloproteinases da Matriz (MMPs) <sup>87</sup>.

As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco, que colectivamente são capazes de degradar os componentes da MEC <sup>88</sup>. São habitualmente divididas em 6 grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, MMPs transmembranares, matrilisinas e outras MMPs <sup>89</sup>. Possuem a capacidade de degradar quase todos, senão todos, os componentes da membrana basal e da matriz extracelular, tanto em situações fisiológicas como em situações patológicas, de que são exemplos, respectivamente, o desenvolvimento embrionário, a cicatrização, a angiogenese, e a inflamação e a metastização tumoral <sup>90</sup>. A sua acção é crucial durante a progressão do cancro, uma vez que ao participarem na remodelação dos tecidos facilitam a invasão local <sup>27</sup>.

As MMPs são abundantemente expressas em variadas neoplasias malignas, e estão implicadas em todos os estádios da sua progressão. A associação entre as MMPs e a progressão neoplásica está directamente relacionada com a sua capacidade de romper as barreiras físicas, representadas pela membrana basal e MEC <sup>33</sup>, para muitos autores este é o passo inicial e fundamental que permite a ocorrência da formação de metástases <sup>91</sup>. Mas as MMPs também participam na regulação da angiogénese e da proliferação celular, através da modulação de factores de crescimento e citocinas armazenadas na MEC <sup>33</sup>.

As Gelatinases, mais especificamente a MMP-2 e MMP-9, parecem ter uma certa preponderância na metastização. A razão desta preponderância deve-se ao papel de barreira contra a invasão tumoral que é desempenhada pela membrana basal, maioritariamente constituída por colagénio do tipo IV. As Gelatinases são conhecidas precisamente pelo seu papel na degradação do colagénio tipo IV, o que torna as MMP-2 e MMP-9 as principais moléculas a serem estudadas quando o tema é a invasão tumoral. <sup>29 90</sup>

As MMP tanto podem ser produzidas pelas células tumorais, como pelas células estromais. Este fenómeno dá-nos a ideia de que as células tumorais possuem a capacidade de utilizar as MMPs produzidas pelas células estromais, o que nos alerta para o papel activo das células do estroma na invasão tumoral <sup>29</sup>. Ao que parece a MMP-9 pode ser produzida pelas células malignas, enquanto a MMP-2 parece ser derivada do estroma. <sup>90</sup>

Parece ser mais ou menos seguro afirmar que o aumento da expressão das MMPs é uma característica de muitos tumores malignos, e em alguns casos a presença de alguns subtipos de MMPs pode apresentar um significado prognóstico <sup>88</sup>.

Para que ocorra o crescimento do tumor primário, é fundamental que exista um local para onde ele possa crescer, como essa situação quase nunca se verifica, a não ser que este surja numa cavidade anatómica, como por exemplo num seio maxilar, é necessário que o tumor possua “ferramentas” que lhe permitam degradar a matriz que o envolve. Esta

degradação também é relevante, por exemplo, para a formação de vasos sanguíneos, e com estes para um correcto suprimento sanguíneo às células tumorais<sup>90-91</sup>. A degradação da membrana basal é também fundamental para que as células pertencentes ao tumor possam ser lançadas na corrente sanguínea e, conseqüentemente, facilitar o processo de formação de metástases. Portanto, não é de estranhar que o aumento da expressão das MMP se possa correlacionar com um pior prognóstico para o doente e com uma maior probabilidade de ocorrência de metástases. Quanto maior for a actividade destas enzimas, maior será a capacidade do tumor crescer e se espalhar para vários locais do organismo<sup>29</sup>

Em 2000, num estudo realizada na Coreia do Sul, por Hong, SD, *et al*, foi estudada, por imunohistoquímica e por zimografia, a expressão de MMP-2 e MMP-9 em 19 amostras de carcinomas espinhocelulares orais que metastizaram, e em 25 amostras em que a metastização não ocorreu<sup>91</sup>. De entre os resultados, do estudo, foi observado que nos casos em que se verificou a presença de metástases nos nódulos linfáticos não havia aumento significativo da expressão de MMP-2, por outro lado a expressão de MMP-9 demonstrou um aumento significativo na presença de metástases, nos nódulos linfáticos<sup>91</sup>.

Em 2005, de Vincent *et al* estudaram um grupo de 68 doentes com carcinoma espinhocelular oral, e avaliaram imunohistoquimicamente a expressão de MMP-2 e MMP-9<sup>29</sup>. Os resultados do estudo permitiram concluir que tanto a MMP-2 como a MMP-9 estão envolvidas nos processos que levam à invasão, por parte do cancro oral, e à ocorrência de metástases nos nódulos linfáticos. Foi ainda possível verificar, com este estudo, que os doentes que não apresentavam metástases nos nódulos linfáticos mas que apresentavam valores elevados de MMP-9 tinham pior prognóstico<sup>29</sup>, devido ao potencial metastático que o aumento da actividade da MMP-9, e conseqüente degradação da matriz extracelular, representa.

Outros estudos mais antigos podem ser referidos, que suportam os resultados dos estudos supracitados Kusugawa *et al* em 1993 concluiu que o carcinoma espinhocelular oral que apresenta capacidade de produzir MMP-2 metastiza com maior probabilidade, para os nódulos linfáticos, do que o que não expressa MMP-2. Miyajina *et al* em 1995 concluiu algo semelhante, mas neste caso em relação ao MMP-9. Por outro lado em 1997 Charous *et al*, chega a uma conclusão contraditória ao dos outros estudos, referindo não haver diferença entre os níveis da expressão de MMP-2 e MMP-9 nos tumores primários e nas metástases, ou seja a ocorrência de metástases não está associada à expressão do MMP-2 e MMP-9, segundo estes autores<sup>91</sup>.

Os resultados obtidos, nos diferentes trabalhos de investigação, nem sempre são concordantes. Em muitos casos a amostragem é insuficiente e, por vezes, sem qualquer representatividade da realidade da população onde se insere, sem significado estatístico, ou não permitindo que se obtenham resultados muito concretos. Parece-nos, contudo, mais do que evidente que a degradação da membrana basal é um passo fundamental para o processo de metastização, no CO. É imprescindível que as células tumorais possam aceder à corrente sanguínea, e para isso é importante a degradação da membrana basal, e como

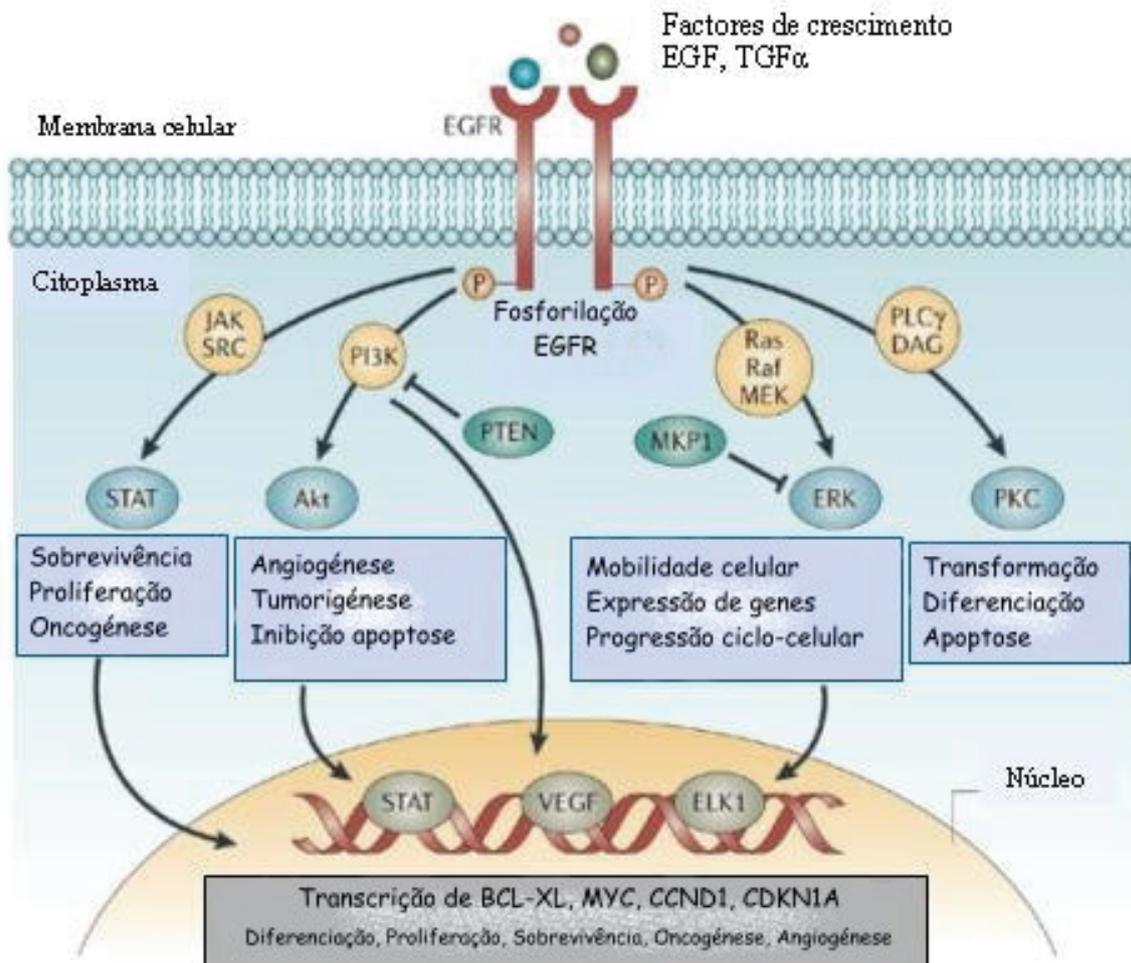
tal o papel das MMPs. Deste modo a modulação da actividade destas enzimas, nomeadamente a utilização de fármacos inibidores da actividade das MMP, poderá constituir uma nova abordagem terapêuticas no cancro, particularmente no caso do CO.

### **3.3. Receptor do Factor de Crescimento da Epiderme**

O factor de crescimento da epiderme (Epidermal Growth Factor), EGF, estimula o crescimento de vários tipos de tecidos epiteliais e possui uma forte actividade mitótica, que é mediada pelo seu receptor celular, (Epidermal Growth Factor Receptor), EGFR<sup>92</sup>. Na figura 7 podemos observar, em esquema, algumas das vias de sinalização intracelular que são activadas quando os ligandos (por exemplo o EGF) se unem ao receptor (EGFR) o que se traduz pela activação do domínio intracitoplasmático de tirosina cinase, iniciando uma cascata de activação de outras proteínas intracelulares que culmina com a transcrição de genes, no núcleo<sup>93</sup>.

O EGFR é um receptor transmembranar, com um domínio extracelular e um domínio intracitoplasmático, com actividade de tirosina cinase, que se apresenta frequentemente sobre expresso nos tumores epiteliais. A expressão do EGFR está relacionada com o prognóstico dos doentes com cancro da cabeça e pescoço, sendo também associada ao desenvolvimento de metástases no cancro oral<sup>50</sup>.

Os processos normais de activação da via do EGFR, como já foi dito, leva ao surgimento de uma cascata de eventos intracelulares. A activação desta cascata leva, em última análise, à transcrição de genes responsáveis pelo crescimento celular, angiogénese, inibição da apoptose, adesão celular e invasão<sup>50</sup>.



**Figura 7: Sinalização celular mediada por factores de crescimento. Vias de transdução de sinal activadas por interacção do ligando (EGF) com o receptor (EGFR).** A ligação do ligando (EGF) ao seu receptor (EGFR) induz a dimerização e autofosforilação do mesmo, com consequente activação do seu domínio intracitoplasmático de tirosina cinase. Uma vez activada, a cinase interage com alvos, proteínas citoplasmáticas com regiões SH2 através das quais se ligam às fosfotirosinas do receptor. Segue-se uma cascata de activação (activação/fosforilação) de outras proteínas intracelulares, factores de transcrição que, activando diversas vias de sinalização, vão induzir a transcrição de genes no núcleo. Estes, como podemos observar na figura, podem ser genes de sobrevivência, de proliferação e de diferenciação celular, da apoptose, envolvidos na migração e invasão celular e ainda na angiogénese. (Adaptado de <http://www.nature.com>; Nyati MK *et al* 2006)

O aumento da expressão de EGFR, e consequente aumento da actividade transcripcional, foi correlacionado com o fraco prognóstico em alguns cancros no Homem, como os cancros da mama, dos ovários, do estômago, dos pulmões, do cólon e do pâncreas, e parece ser um factor preditivo da sobrevivência dos doentes, livres de doença, independente da presença ou do estado de envolvimento dos nódulos linfáticos<sup>92</sup>. O aumento do EGFR é comum no cancro oral (cerca de 30% dos casos) e está associado a

estádios avançados e à alta incidência de metástases no pescoço. Também é verificada a amplificação do gene do EGFR em lesões pré-malignas, através de PCR <sup>35</sup>, o que deverá ser tomado como alerta para a necessidade de uma maior vigilância do doente.

Num estudo retrospectivo, no qual foram avaliados 109 doentes com CO invasivo, tratados entre 1980 e 1997, verificou-se a frequente expressão aumentada de EGFR. O aumento da expressão de EGFR correlacionou-se com uma fraca sobrevivência dos doentes, ou seja, com uma maior agressividade, do cancro <sup>50</sup>.

O aumento da expressão de EGFR está associado à desregulação das vias que controlam os processos biológicos e, como tal é natural a sua influência na agressividade dos processos malignos, e consequentemente a um pior prognóstico <sup>50</sup>. A relação entre o aumento do EGFR e a invasão e a metastização das células cancerígenas pode ser explicado pelo efeito activador que os ligantes do EGFR possuem sobre as colagenases, gelatinases (MMP-9) entre outras, que vai levar ao aumento da degradação da matriz extracelular. Está descrita uma relação directa entre a expressão de EGFR e o aumento da regulação das MMPs <sup>94</sup>. Deste modo, o EGFR poderá, por todas estas razões, constituir um bom alvo terapêutico no CO, à semelhança do que já acontece noutros casos de doença oncológica.

#### 4. Novas Abordagens/Implicações Terapêuticas No Cancro Oral

O tratamento do CO tem vindo a sofrer algumas mudanças, e a evoluir embora sem a rapidez desejada. Descobertas nas áreas da biologia molecular, nas técnicas de diagnóstico, na cirurgia, na radioterapia e na oncologia médica, alteraram vários conceitos tradicionais <sup>95</sup>.

Apesar disso o tratamento do CO nem sempre é satisfatório. Nos estádios precoces (I e II) o CO é tratado com recurso à cirurgia ou à radioterapia isoladamente. Por outro lado nos estádios avançados (III e IV) o tratamento passa pela cirurgia associada à radioterapia <sup>27</sup>.

A cirurgia é o melhor e mais consagrado método para o tratamento inicial e definitivo para a maioria dos CO, com uma longa história de aceitação e eficácia de tratamento com mais de um século <sup>96</sup>.

O uso de radiação ionizante tornou-se uma modalidade importante de tratamento, não cirúrgico do CO. Contudo na maioria dos doentes a radioterapia é usada em conjunto com a cirurgia, sendo usada como um tratamento pós-operatório <sup>96</sup>.

A quimioterapia, por sua vez foi considerada como paliativa para os doentes com CO entre 1950-1970. A resposta a longo prazo não se traduziu num controlo, a longo termo, do CO primário, chegando a ser questionada a sua utilidade <sup>95-96</sup>.

O uso de protocolos que combinam a cirurgia com radioterapia pré ou pós-cirúrgica e/ou quimioterapia adjuvante, apresenta taxas de sobrevivência aos 2 e 5 anos de 20% e 12% respectivamente. Na realidade, a sobrevivência dos doentes com cancro em estádios avançados raramente supera os 30 meses, mesmo nos casos em que se alcança a remissão clínica completa <sup>27</sup>. Por outro lado, a abordagem combinada (cirurgia e radioterapia) permite um maior controlo locorregional. Contudo, os doentes com a doença em estágio avançado vivem agora tempo suficiente para desenvolverem metástases à distância, e os doentes em estádios precoces sobrevivem agora o suficiente para desenvolverem novos cancros primários em localizações secundárias <sup>95</sup>.

Hoje em dia existe uma crescente evidência experimental que sugere que as estratégias antiangiogénicas vão contribuir para o futuro do tratamento do cancro <sup>75</sup>. Os alvos da terapia antiangiogénica são as células endoteliais e eventualmente os leucócitos <sup>77</sup>. O objectivo deste tipo de tratamento passa por estabilizar a doença, em vez de procurar a erradicação do tumor, como acontece com a quimioterapia convencional ou a radioterapia, contudo estas diferentes abordagens podem ser usadas em associação entre si <sup>77</sup>. Outras modalidades terapêuticas a serem estudadas, passam pela terapia alvo dirigida à inibição do EGFR, também a terapia génica e a imunoterapia são áreas que necessitam de uma maior investigação <sup>96</sup>.

Um factor importante e a ter em conta no tratamento de qualquer doença, e muitas vezes um dos factores determinantes para a escolha/aceitação dos tratamentos pelos doentes, prende-se com a qualidade de vida que é expectável após o mesmo <sup>41 97</sup>. No tratamento do CO esta também tem sido uma grande preocupação, de modo a evitar problemas pós-

operatórios como a ansiedade, a dor, as dificuldades em deglutir e os estados depressivos, mas também os problemas mais específicos, como sejam a xerostomia e a candidíase <sup>41</sup>.

Cerca de 30% dos CO apresentam metástases, quer clinicamente identificáveis quer ocultas, quando é realizada a avaliação inicial. Situação que é agravada substancialmente, quando a localização primária é a língua, devido ao seu rico suprimento sanguíneo e à sua grande drenagem linfática, em que 66% dos doentes apresentam metástases nos nódulos linfáticos quando é realizado o diagnóstico <sup>98</sup>. Estes factos associados aos resultados pouco animadores do tratamento, nestes casos levam-nos a concluir que quanto mais cedo esta doença for detectada e tratada, melhor prognóstico vamos ter.

Uma vez que a grande maioria dos doentes com esta patologia é avaliada por médicos de clínica geral e dentistas generalistas, é importante que estes procedam ao exame de despiste de modo a identificarem potenciais situações de cancro oral e faríngeo <sup>98</sup>. Para tal é necessário que se proceda a um exame sistemático para despiste desta doença, como descrito de seguida <sup>98</sup>.

***Exame extraoral:***

Inspeção da cabeça e pescoço;

Palpação bimanual dos nódulos linfáticos e glândulas salivares.

***Lábios:***

Inspeccionar e palpar as superfícies externas ao lábio e as bordas vermelhas;

Inspeccionar e palpar a mucosa labial interior.

***Mucosa vestibular:***

Inspeccionar e palpar a parte interior da mucosa vestibular.

***Gengiva e crista alveolar:***

Inspeccionar a gengiva maxilar/mandibular e a crista alveolar em ambas as superfícies vestibular e lingual/palatina.

***Língua:***

Com a língua protruída, deve-se inspeccionar a superfície dorsal;

Com a língua elevada, inspeccionar a superfície ventral;

Agarrando a língua com uma gaze e puxando-a para fora para cada um dos lados, inspecciona-se as bordas laterais da língua desde a sua ponta até à região das tonsilas;

Palpar a língua.

***Pavimento da boca:***

Inspeccionar e palpar o pavimento da boca.

***Palato duro:***

Inspeccionar o palato duro.

***Palato mole e orofaringe:***

Deprimindo gentilmente a língua do paciente com um espelho de observação intraoral ou um baixa língua, inspecciona-se o palato mole e a orofaringe.

Quando uma lesão suspeita é identificada, a realização de uma biopsia convencional continua a ser o meio mais preciso para identificar a lesão<sup>98</sup>.

## 5. Conclusão

O cancro é, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a segunda causa de morte a nível mundial, podendo esta situação alterar-se nos próximos anos, passando a ser a principal causa de morte. Em Portugal o cancro é igualmente a segunda causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares.

Definimos Cancro Oral (CO) como sendo a designação habitual de um subgrupo de doenças malignas da cabeça e do pescoço, que em 90-95% dos diagnósticos corresponde ao tipo histológico Carcinoma Espinhocelular.

Actualmente são mais aceites duas teorias para explicar o desenvolvimento do CO, este pode surgir quer de células estaminais cancerígenas, como de células mais diferenciadas que acumularam alterações genéticas ou epigenéticas que condicionam o aparecimento de modificações nas mesmas, quer por desrepressão quer por activação de genes que codificam proteínas envolvidas no crescimento, na divisão, na diferenciação e na morte celular por apoptose. Esta patologia é altamente dependente de uma forte componente individual, variabilidade e susceptibilidade genética, que estando estreitamente associada à exposição crónica a diversos factores de risco exógenos, como a alimentação, o tabagismo, o alcoolismo crónico, agentes infecciosos, como os vírus do papiloma humano serótipo 16 (HPV-16), factores ocupacionais, entre outros, podem levar ao seu desenvolvimento.

O tratamento nem sempre é bem sucedido uma vez que o diagnóstico é feito em fase avançada da doença, o que justifica que se trabalhe no sentido de identificar novos alvos moleculares, diagnósticos e terapêuticos.

O conhecimento mais profundo dos mecanismos moleculares envolvidos no processo da carcinogénese oral, nomeadamente na modulação das diversas vias envolvidas na progressão e na metastização, poderá contribuir para o diagnóstico precoce. A detecção e identificação de marcadores de prognóstico e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, dirigidas a alvos moleculares específicos poderá traduzir-se por uma maior eficácia terapêutica com diminuição dos efeitos secundários à quimioterapia convencional e, conseqüentemente, uma melhor qualidade de vida dos doentes. Alguns desses alvos moleculares são os responsáveis pela modulação de processos como a angiogénese, a adesão celular e a neoformação vascular, que sendo processos fundamentais para a progressão e metastização do cancro, devem ser os principais alvos terapêuticos.

Deste modo, no futuro a utilização de inibidores da actividade das MMP, de anticorpos monoclonais dirigidos a alvos específicos como o VEGF/VEGFR, EGF/EGFR, de vacinas, para estimular a produção de anticorpos, entre outros, poderá constituir uma nova abordagem terapêutica no cancro CO, à semelhança do que já acontece noutros casos

como no cancro colorectal e da mama e, mesmo, nalguns casos de cancros da cabeça e pescoço.

Esta revisão permitimos concluir que apesar do grande esforço realizado, ao longo dos anos, para conhecer os mecanismos associados à carcinogénese oral e à metastização, estes continuam pouco claros, o que nos leva a afirmar que é necessário um maior investimento na investigação desta entidade patológica.

Enquanto não existirem novos métodos de tratamento desta patologia, os esforços de toda a comunidade médica, científica e social deve passar por um maior ênfase na prevenção e no despiste inicial da doença, através da alteração de certos hábitos altamente nocivos, como o tabagismo e o alcoolismo, bem como por um grande enfoque em campanhas de sensibilização e de despiste desta doença. O despiste desta doença deve ser maioritariamente da responsabilidade do médico dentista, uma vez que desempenha a sua actividade com um acesso privilegiado a toda a cavidade oral. Em qualquer situação potencialmente sugestiva de CO, não deve hesitar na realização da biopsia. Contudo a realização de campanhas de sensibilização e rastreio, semelhantes às que se realizam para o cancro da mama, não é de todo descabida, uma vez direccionada para os grupos de risco, ou seja, os grupos de indivíduos que tenha hábitos tabágicos intensos e esteja num escalão etário superior aos 40-50 anos. Sendo um problema de saúde pública, que apresenta uma grande mortalidade e morbilidade, optar por uma prevenção e despiste agressivos para esta doença parece-nos ser a atitude mais acertada.

## Bibliografia

1. Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008.
2. Population and Social Conditions - Statistical books. European Communities, 2009 Luxembourg.
3. População e Sociedade. *Revista de Estudos Demográficos*. Instituto Nacional de Estatística IP ed, 2009 Lisboa.
4. Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 2007;61(10):640-58.
5. Kipling MD, Waldron HA. Percivall Pott and cancer scroti. *Br J Ind Med* 1975;32(3):244-6.
6. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35(14):1886-94.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
8. Bjerkvig R, Johansson M, Miletic H, Niclou SP. Cancer stem cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19(5):279-84.
9. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(39):15472-7.
10. Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38(8):737-46.
11. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med* 2007;10(2):227-32.
12. Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Costa ALL. HPV and oral carcinogenesis: a bibliographic review. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003;69(4):553-9.
13. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008;123(1):1-7.
14. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 2004;39(3):155-65.
15. Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007;17(3):191-203.
16. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51(1):1-28.
17. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66(4):1883-90; discussion 95-6.
18. Mackenzie IC. Stem cell properties and epithelial malignancies. *Eur J Cancer* 2006;42(9):1204-12.
19. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.
20. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:675-99.
21. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 2008;49(2):193-9.
22. Clarke MF. Epigenetic regulation of normal and cancer stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1044:90-3.
23. Armanios M, Greider CW. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:205-8.
24. Payão SLM, Segato R, Santos RR. Controle genético das células-tronco humanas cultivadas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009(31):15-18.
25. Dourado M, Cruz M, Enes M, Pereira M, Sarmiento Ribeiro AB. Células Estaminais – Implicações na Biologia e Terapêutica do Cancro. *Rev Bra Onc Clin*;2010.
26. Bernarda RA. *Cancro – Cronologia, História e Gênese de Ideias*. Coimbra, 1996.
27. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol* 2007;43(6):523-34.

28. Margaritescu C, Pirici D, Simionescu C, Mogoanta L, Raica M, Stinga A, et al. VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2009;50(4):527-48.
29. de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernandez Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41(3):283-93.
30. Sudbo J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin Med Res* 2004;2(4):233-42.
31. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):309-16.
32. Dantas DD, Ramos CC, Costa AL, Souza LB, Pinto LP. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J* 2003;14(1):22-5.
33. Ziober BL, Silverman SS, Jr., Kramer RH. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(6):499-510.
34. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KA, Ogden G, Macpherson LM. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol* 2006;42(6):586-92.
35. Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol* 2004;40(2):110-9.
36. Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, et al. Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol* 2002;38(5):491-9.
37. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82(3):252-64.
38. Venturi BRM, Cabral MG, Lourenço SQC. Oral squamous cell carcinoma – contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development and prognosis of the lesion: a review. *Rev Bras de Otorrinolaringol* 2004;70(3):385-92.
39. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001;411(6835):390-5.
40. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001;65(4):328-39.
41. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol* 2007;43(2):107-15.
42. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004;14(6):473-86.
43. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Oral squamous cell carcinoma: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2006;53:63-9.
44. Carrard VC, Pires AC, Paiva RL, Chaves ACM, Sant M, Filho A. Alcohol and oral cancer: comments and related mechanisms. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2008;54(1):49-56.
45. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J* 2008;53(4):302-5.
46. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007;96(9):2181-96.
47. Goetz ME, Luch A. Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* 2008;266(1):73-83.
48. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
49. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 2005;35(3):169-73.
50. Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol* 2007;43(2):193-8.
51. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000;29(2):80-5.

52. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001;7(6):349-54.
53. Stewart BW, Kleihues P. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press, 2003.
54. Marshall JR, Boyle P. Nutrition and oral cancer. *Cancer Causes Control* 1996;7(1):101-11.
55. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21(6):167-223.
56. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999;20(4):519-27.
57. Radcliffe CE, Akram NC, Hurrell F, Drucker DB. Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of *Streptococcus mutans*. *J Dent* 2002;30(7-8):325-31.
58. Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck* 2009;31(9):1228-39.
59. Zur HH. Virus in human cancer. *Enr J. Cancer* 1999;8:1174-81.
60. Souza TRB, Gonçalves AJ. Human papillomavirus and the detection of viral DNA in oral squamous cell carcinoma. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço* 2009;38(1):62-6.
61. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 2003;39(3):213-21.
62. Wong DT, Todd R, Tsuji T, Donoff RB. Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7(4):319-28.
63. Ratushny V, Astsaturov I, Burtness BA, Golemis EA, Silverman JS. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cell Signal* 2009;21(8):1255-68.
64. Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol* 2005;23(2):346-56.
65. Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L. The basic science of oncology. 4 ed: New Baskerville: Matrix Publishing Services, 2005.
66. Scully C, Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. *BMJ* 2000;321(7253):97-100.
67. Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA, Ichiki AT. Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(9):1725-33.
68. Maekawa K, Sato H, Furukawa M, Yoshizaki T. Inhibition of cervical lymph node metastasis by marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(6):513-8.
69. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol* 2006;42(5):448-60.
70. Manuila L, Manuila A, Lewalle P, Niculin M. Dicionário Médico. Lisboa: Climepsi Editores, 2004.
71. Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ* 2001;65(11):1282-90.
72. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991;51(18 Suppl):5054s-59s.
73. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* 2007;28(3):297-321.
74. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9(2):267-85.
75. Graça B, Lunet C, Coelho AS, Monteiro G, Freire P, Speidel A, et al. Angiogénese e cancro da biopatologia à terapêutica. *Acta Médica Portuguesa* 2004;17:76-93.
76. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005;65(3):671-80.
77. Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev* 2003;27(3):229-38.
78. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40(3):321-5.
79. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40(1):13-20.

80. Faustino SE, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37(4):372-8.
81. Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphibul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, et al. Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134(12):1305-11.
82. Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006;42(4):337-42.
83. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39(4):391-6.
84. Li QL, Chen FJ, Zeng ZY, Yang AK, Wu QL, Zhang HZ, et al. [Expression and clinical significance of VEGF-C and Flt-4 in tongue squamous cell carcinoma]. *Ai Zheng* 2006;25(2):235-40.
85. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Honigschnabl S. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 2003;32(8):455-60.
86. Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L. *The basic science of oncology*. 4 ed: New Baskerville: Matrix Publishing Services, 2005.
87. Makos CP, Psomaderis K. A literature review in renal carcinoma metastasis to the oral mucosa and a new report of an epulis-like metastasis. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(3):653-60.
88. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36(13 Spec No):1621-30.
89. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006;85(1):22-32.
90. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999;35(3):227-33.
91. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36(2):207-13.
92. Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol* 2004;40(5):532-7.
93. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):876-85.
94. P OC, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 2000;86(3):307-17.
95. Ord RA, Blanchaert RH, Jr. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J Am Dent Assoc* 2001;132 Suppl:19S-23S.
96. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):394-401.
97. Rogers SN. Quality of life for head and neck cancer patients--has treatment planning altered? *Oral Oncol* 2009;45(4-5):435-9.
98. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52(4):195-215.