

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC AL INVAZIVITĂȚII ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE LINGUALE

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
MĂRGĂRITESCU CLAUDIU

STUDENT DOCTORAND:
CIUCĂ I. FELICIA ILEANA (MĂRĂȘESCU)

CRAIOVA 2019

CUPRINS

INTRODUCERE	1
--------------------	----------

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. ETIOPATOGENIA CANCERELOR ORALE	1
--	----------

CAPITOLUL II. PATOGENIA CANCERELOR ORALE	1
---	----------

CAPITOLUL III. PROCESUL DE INVAZIVITATE TUMORALĂ, PARTICULARITĂȚILE SALE ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ALE CAPULUI ȘI GÂTULUI	2
--	----------

CONTRIBUȚII PROPRII

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII	2
---	----------

CAPITOLUL IV. MATERIAL ȘI METODE	2
---	----------

CAPITOLUL V. REZULTATE	4
-------------------------------	----------

CAPITOLUL VI. DISCUȚII	6
-------------------------------	----------

CAPITOLUL VII. CONCLUZII	8
---------------------------------	----------

BIBLIOGRAFIE	9
---------------------	----------

CUVINTE CHEIE:

**carcinom scuamos, limbă, patogenie, progresie, invazivitate, prognostic,
histopatologie, imunohistochimie**

INTRODUCERE

Carcinomul scuamos oral este cea mai frecventă formă de cancer al capului și gâtului și în același rând este și o cauză majoră de morbiditate și mortalitate prin cancer afectând la nivel mondial, în anul 2016 mai mult de 1 milion de oameni. Localizarea orală a carcinomului scuamos și mai ales cea linguală este de departe asociată cu cel mai mare risc de deces și asta atât datorită particularităților morfofuncționale ale acestor zone, cât și stadiului avansat loco-regional de prezentare la doctor a acestor bolnavi. Datorită bogăției de vase de sânge și vase limfatice, carcinoamele scuamoase linguale sunt predispuse la metastazare, chiar și în stadii precoce ale bolii, motiv pentru care și prognosticul acestora este unul sever. Între cei mai importanți factorii de agresivitate ai unor astfel de cancer au fost înscrși: gradul histologic de malignitate, mărimea leziunilor, profunzimea invaziei și patternurile de invazivitate, prezența precoce a metastazelor limfoganglionare.

Studiul nostru și-a propus o investigație amănunțită din punct de vedere epidemiologic, clinico-imagistic, histopatologic, imunohistochimic și statistic a unui număr de 57 de bolnavi diagnosticați cu carcinoame scuamoase linguale între anii 2015 – 2017.

Profilul epidemiologic al bolnavi investigați arată prevalența carcinoamelor scuamoase orale în decada a VII-a de viață (49,13%), la bărbați (raportul bărbați/femei fiind de 1:1,37), cel mai adesea cu originea în porțiunea mobilă a limbii (2/3 din cazuistica investigată). Studiul clinic a scos în evidență evoluția în general asimptomatică a unor astfel de cazuri, iar când acestea devin simptomatice, durerea (54,38%) și ulcerarea (43,86%) au fost simptomele dominante. În plus circa o treime din acești bolnavi au prezentat metastaze decelabile clinic la momentul diagnosticului.

Histopatologic am evidențiat prezența mai multor subtipuri, respectiv: convențional, acantolitic, bazaloid, sarcomatoid și verucos, tipul convențional predominând în mai mult de jumătate din cazuri (54,4%). Particular acestei localizări, studiul histopatologic a reliefat profil agresiv al unor astfel de tumori, majoritatea acestor cazuri fiind diagnosticate în stadii avansate pTNM (III-II), ca forme moderat diferențiate histologic, cu scoruri de risc histologic Brandwein-Gensler moderat, dar și cu metastaze limfoganglionare, cu invazie perineurală și margini de rezecție invadate în circa o treime din cazurile investigate.

Studiul imunohistochimic a scos în evidență potențialul crescut de invazivitate al acestei localizări particulare a carcinoamelor scuamoase orale, markerii de tipul CXCR4, MMP-9, D2-40, CD10 și F-actină putând fi considerați markeri de tip prognostic. La nivel molecular un astfel de imunoprofil evidențiază potențialul intrinsec invaziv, capacitatea proprie de motilitate și conlucrarea celulelor tumorale, mai ales a celor de la frontul de invazie, cu celule stromale pentru extinderea locoregională a carcinoamelor scuamoase linguale. În plus fiecare dintre acești markeri sunt și pot fi ținte moleculare ale unui tratament mult mai eficient decât cel clasic, crescând semnificativ rata de supraviețuire a unor astfel de bolnavi canceroși.

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA CANCERELOR ORALE - prezintă cele mai noi date despre incidența, mortalitatea, precum și distribuția geografică, distribuția în funcție de vârstă, sex și localizare topografică a acestor cancere

CAPITOLUL II. PATOGENIA CANCERELOR ORALE - oferă mai întâi date generale despre procesul de carcinogeneză orală, moeculele și mecanismele molecular intrinseci ce stau la baza inițierii, creșterii și progresiei unor astfel de cancere. Astfel sunt discutate în

subcapitole distincte: (1) alterările expresiei oncogenelor/oncoproteinelor; (2) alterările expresiei genelor supresoare tumorale; (3) rolul infecției cu HPV în carcinogeneza orală; (4) rolul imortalizării în carcinogeneza orală; (5) rolul angiogenezei în carcinogeneza orală.

CAPITOLUL III. PROCESUL DE INVAZIVITATE TUMORALĂ, PARTICULARITĂȚILE SALE ÎN CARCINOAMELE SCUAMOASE ALE CAPULUI ȘI GÂTULUI prezintă mai întâi date cu caracter general privind creșterea și progresia cancerelor, apoi se discută ținând despre tipurile principale de patternurile ale creșterii invazive tumorale și în final sunt prezentate datele cu privire la particularitățile procesului de invazivitate la nivel molecular în carcinoamele scuamoase ale capului și gâtului.

OBIECTIVELE STUDIULUI

1. Evaluarea caracteristicilor epidemiologice, clinico- imagistice și histopatologice ale carcinoamelor scuamoase linguale din punct de vedere al prognosticului, pentru o perioadă de timp de 3 ani, prin cuantificarea următorilor parametri:

- epidemiologici: sexul și vârsta pacienților, localizarea tumorilor, mediul de proveniență, factorii de risc;
- clinico-imagistici: simptomatologie, semne clinice, perioada de latență a bolii, aspectele imagistice ale invazivității loco-regionale folosind investigații de tip computer tomograf și respectiv rezonanță magnetică nucleară;
- histopatologici: subtipul histologic potrivit clasificării OMS (2005); gradul de diferențiere; aprecierea patternului de invazie tumorală; prezența/absența invaziei perineurale; cuantificarea infiltratului inflamator; aprecierea scorului de risc histopatologic; aprecierea statusului marginilor de rezecție; aprecierea stadiului pTNM de boala conform recomandările OMS (2005);

2. Stabilirea imunoprofilului invaziv al acestor tumori prin investigarea:

- Influenței interacțiunii stromă-componentă parenchimoasă din carcinoamele scuamoase orale asupra procesului de invazivitate, respectiv anticorpii CD10;
- Investigarea potențialului intrinsec de invazie locală al celulelor carcinoatoase linguale cu ajutorul markerilor: CXCR4, MMP2, MMP9 și podoplanina;
- Stabilirii gradului de implicare în procesul de tranziție epitelio-mezenchimală (TEM) a factorilor de transcripție mezenchimală cu ajutorul markerului Snail;
- Investigarea unor markeri responsabili de motilitatea intrinsecă a celulelor canceroase, respectiv a markerului F-actină;

3. conturarea unui profil invaziv statistic specific al carcinoamelor scuamoase linguale în baza analizei statistice a rezultatelor obținute prin studiile mai sus amintite.

CAPITOLUL IV- Material și Metode - oferă date despre materialul studiat și metodele utilizate în cercetare.

MATERIALUL CERCETAT- din cazistica Laboratorului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Urgență, Nr. 1, Craiova și a fost reprezentat de blocurile de parafină arhivate. Studiul s-a întins pe durata a 3 ani, cazurile fiind selectate în intervalul de timp 2015-2017 un număr de 57 de cazuri de tumori linguale ce au constituit obiectul studiului histopatologic.

METODE UTILIZATE

Studiul epidemiologic a urmărit colectarea următoarelor date despre bolnavii incluși în studiu: sexul, vârsta, localizarea tumorilor, mediul de proveniență și factori de risc.

Studiul clinico- imagistic a urmărit istoricul bolii, rezultatele examenului clinic general și local (tumefacție, asimetrie linguală, aspectul macroscopic al tumorilor, prezența metastazelor limfo-ganglionare), rezultatele investigațiilor de tip computer tomograf și rezonanță magnetică nucleară cu privire la mărimea tumorilor și extensia lor loco-regională.

ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ a urmărit următoarele variabile morfologice: subtipul histopatologic, gradul de diferențiere; aprecierea patternului de invazie tumorală potrivit clasificării Bryne M et al., prezența/absența invaziei perineurale, cuantificarea infiltratului inflamator, aprecierea scorului de risc histopatologic potrivit criteriilor lui Brandwein-Gensler și colab., prezența/absența invaziei vasculare și/ sau invaziei limfatice, aprecierea statusului marginilor de rezeecție și aprecierea stadiului pTNM de boala conform recomandările OMS (2005).

STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC a investigat reactivitate tumorală pentru o serie de markeri adresați studiului: (1) influenței interacțiunii stromă-componentă parenchimotoasă din carcinoamele scuamoase orale asupra procesului de invazivitate, respectiv anticorpul CD10; (2) investigarea potențialului intrinsec de invazie locală al celulelor carcinoatoase linguale cu ajutorul markerilor: CXCR4, MMP2, MMP9 și podoplanina; (3) stabilirii gradului de implicare în procesul de tranziție epitelio-mezenchimală (TEM) a factorilor de transcripție mezenchimală cu ajutorul markerului Snail; (4) investigarea unor markeri responsabili de motilitatea intrinsecă a celulelor canceroase, respectiv a markerului F-actină.

Am utilizat reacții simple pentru care am folosit ca metodă de lucru - tehnica LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin2 System) și kitul firmei Dako (Redox, Romania - K0675), iar dezvoltarea s-a realizat cu cromogen DAB (culoare brună). Imunomarcajul anticorpilor mai sus specificați a fost cuantificat semicantitativ folosind scorul IRS- Remmele & Stegner (1987), obținut prin înmulțirea rezultatelor scorului cantitativ bazat pe numărarea celulelor marcate (scor 1= <25% celule marcate); scor 2= 26-49% celule marcate; scor 3= 50-74% celule marcate și scor 4= > 75% celule marcate) cu cele ale intensității marcajului (scor 1= slabă; scor 2= moderată și scor 3= puternică).

În studiul imunohistochemic am utilizat anticorpi concentrați ale căror principale caracteristici sunt redate în tabelul de mai jos:

<i>Anticorp</i>	<i>Clona/ Producător</i>	<i>Diluția</i>	<i>Demascare antigenică</i>	<i>Control pozitiv</i>
CD10	Șoarece, Monoclonal, 56C6, DakoCytomation	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Limfoganglion
CXCR4	Iepure, Policlonal, Thermo scientific	1:500	0.1 M citrat, pH 6	Carcinomscuamos
MMP2	Iepure, Policlonal, Santa Cruz Biotechnology(sc-8835-R)	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Țesut de granulație
MMP9	Șoarece, Monoclonal 7 Biotechnology (sc-13520 B)	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Țesut de granulație
Podoplanină	Șoarece, Monoclonal D2-40, Dako	1:100	0.1 M citrat, pH 6	Limfoganglion
F Actină	Șoarece, Monoclonal, LifeSpan Biosciences	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Prostată
Snail	Iepure, Policlonal, Abcam	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Cracinommamar

Anticorpi utilizați în studiul carcinoamelor scuamoase linguale

Pentru analiza statistică au fost utilizate testele t Student, Anova, chi pătrat și Pearson utilizând softul SPSS 10, iar imaginile au fost achizitionate cu ajutorul microscopului Nikon Nikon Eclipse 55i și softul Image-Pro Plus.

CAPITOLUL V- Rezultate

Analiza epidemiologică a relevat distribuția largă a cazusiticii din decada a III-a până în decada a VIII-a. Maximum incidenței a fost înregistrat în decada a VII-a cu un număr de 28 de bolnavi, reprezentând aproximativ jumătate din cazusitică (49,13%), urmată de decada a VI-a cu 14%, și respectiv decada a V-a cu 12,28% din bolnavii investigați. Vârsta medie pe întreg lotul studiat a fost de $55,81 \pm 14,98$, iar mediana de 63 de ani. S-a observat prevalența cazuisticii îndeosebi la sexul masculin, 33 dintre bolnavii fiind bărbați, ceea ce a reprezentat 57,89% din numărul total de bolnavi diagnosticați cu carcinom scuamos lingual. Marea majoritate a cazurilor studiate au afectat porțiunile mobile ale limbii, respectiv 38 de cazuri, ceea ce a reprezentat 66,66% din cazuistica investigată. Baza limbii a fost afectată în doar 19 cazuri, reprezentând circa 1/3 din cazuistică, situându-se pe locul doi după afectarea marginilor linguale (35,1%). Totodată am consemnat prevalența cazusiticii mai ales la bolnavii provenind din mediul rural, respectiv aceștia au fost în număr de 35 de cazuri, care au reprezentat 61,40% din cazusitica investigată. Cel mai frecvent factor de risc asociat de bolnavii incluși în lotul de studiu a fost alcoolul, acesta fiind recunoscut anamnestic în 17 cazuri, reprezentând aproape 30% din cazuistica investigată. Pe locul doi s-a situat asocierea alcoolului cu fumatul, pusă în evidență în 13 cazuri, reprezentând circa 23% din totalul bolnavilor incluși în lotul de studiu.

Studiul clinico-imagistic. Rezultatele studiului clinic indică durerea ca fiind cel mai frecvent simptom recunoscut de bolnavii incluși în studiu. Astfel acest simptom a fost raportat la 31 de bolnavi, reprezentând circa 54% din cazuistica investigată. Pe locul doi s-au situat cazurile în care bolnavii au raportat leziuni ulcerative persistente, inițial asimptomatice, ulterior dureroase și în circa 50% din cazuri asociate și cu sângerări. Din datele anamnestice culese doar în 31 de cazuri (54,38% din cazuistica investigată) am putut stabili cu o oarecare acuratețe perioada de latență a bolii. Astfel am găsit o durată medie de circa 9-14 luni de zile de la debutul simptomatologiei și prezentarea bolnavilor la medic pentru diagnostic. În 19 din cele 57 de cazuri investigate bolnavii au prezentat diseminare limfoganglionară decelabilă clinic încă de la momentul diagnosticului, ceea ce a însemnat circa 33,33% din cazuistica investigată. În aceste cazuri s-au depistat limfonoduli cu dimensiuni mai mari de 1cm, cu consistență crescută și aderenți la planurile adiacente. Dintre investigațiile imagistice cel mai des utilizată a fost investigația de tip computer tomograf (CT), din cei 57 de bolnavi au putut beneficia de acest tip de investigație doar 27 de bolnavi (47,37%). În toate aceste cazuri s-a evidențiat tumora primară linguală, iar completarea examinării după injectarea soluției de contrast a permis o estimare mai bună a limitelor leziunii și estimarea diseminărilor limfoganglionare.

Studiul histopatologic. Raportat la criteriile OMS (2005) de clasificare a tumorilor capului și gâtului [Johnson N et al., 2005] cele 57 de cazuri de carcinom scuamos studiate au putut fi încadrate în următoarele varietăți histopatologice: carcinom scuamos convențional, carcinomul scuamos verucos, carcinomul scuamos acantolitic, carcinom scuamos bazaloid și carcinom scuamos sarcomatoid. Cel mai frecvent subtip histopatologic de carcinom scuamos lingual întâlnit în cadrul cauzisticii noastre a fost subtipul convențional diagnosticat în 31 de cazuri, reprezentând circa 54,4% din totalul cazurilor

investigate. Pe locul doi la o oarecare distanță s-a situat subtipul acantolitic cu un număr de 14 cazuri, reprezentând circa 24,56% din cazuistica investigată.

Folosind criteriile Broder [Broders AC, 1941] de clasificare microscopică a cancerelor cele 57 de cazuri de carcinoame scuamoase linguale studiate de noi am găsit că cea mai mare parte a cazurilor studiate au aparținut categoriei de carcinoame scuamoase moderat diferențiate- G2, respectiv 25 din cele 57 de cazuri, ceea ce a reprezentat 44% din cazuistica studiată. Raportat la criteriile lui Bryne et al.(1989) de gradare a malignității în raport cu subtipul de invazie tumorale în țesutul gazdă noi am consemnat că cele mai multe cazuri de carcinom scuamos lingual investigate au fost incluse în tipul- 3 de pattern de invazie, respectiv 24 de cazuri, reprezentând circa 42,1% din totalul cazusiticii analizate. În baza densității infiltratului inflamator de la interfața tumoră- țesut gazdă, a patternului invaziei neoplazice și prezența sau absența invaziei perineurale am trecut la stabilirea scorului Brandwein-Gensler de risc histologic [Brandwein-Gensler și colab., 2005] pentru cazusitica investigată și am consemnat prevalența scorurilor Brandwein-Gensler de grad moderat, calculat în 28 de cazuri, reprezentând aproape jumătate din cazusitica investigată. În baza criteriilor OMS ale grading-ului pTNM al tumorilor cu localizare la nivelul cavității orale am realizat pentru cazuistica studiată de noi că cel mai frecvent diagnosticat stadiu pTNM a fost stadiul III cu un număr de 23 de cazuri, ceea ce a reprezentat circa 40,35%.

Analiza imunohistochimică. Evaluarea impactului interacțiunii stromă- componentă parenchimotoase asupra invazivității cu markerul CD10 a evidențiat faptul că imunoreactivitatea tumorală a fost variabilă, reactivitatea cea mai slabă fiind epistată în formele bine diferențiate în timp ce cea mai mare reactivitate tumorală am evidențiat-o în cazurile de carcinom scuamos lingual moderat diferențiate (IRS= 3.34 ± 1.64), patternul general al reacțiilor fiind unul difuz, ceva mai intens la periferia proliferărilor tumorale și la nivelul frontului de invazie. Patternul subcelular al reacțiilor a fost preponderant membranar, dar pe alocuri a fost și citoplasmatic. La nivelul țesutului tumoral am înregistrat reactivitate pentru CXCR4 în toate cazurile investigate (100%), dar scorurile IRS au variat între 1 și 9, valoarea medie IRS a fost de 4.54 ± 1.90 . Maximum de reactivitate (IRS=9) am observat-o în două cazuri de CSO cu grad de diferențiere G1 și respectiv G2, dezvoltate la nivelul porțiunii mobile a limbii, la o femeie cu vârsta de peste 60 de ani și cu stadiul III pTNM, respectiv la un barbat de peste 60 de ani și cu stadiul 4 pTNM. Patternul reactivității tumorale a fost unul preponderent citoplasmatic și membranar. Reactivitate tumorală pentru MMP-2 am consemnat-o în 46 de cazuri (85,18%), scorul mediu IRS înregistrat fiind de 1.18 ± 1.41 , cu valori variind între 0 și 4 (înregistrat într-un singur caz la o persoana de peste 60 de ani, de sex feminin, în porțiunea mobilă a limbii, cu grad de diferențiere G2 și aflată în stadiul IV pTNM). Patternul reacțiilor tumorale pentru MMP-2 a fost unul heterogen, variind de la citoplasmatic, prezent îndeosebi în formele bine diferențiate, la unul citoplasmatic vizibil mai ales în formele moderat diferențiate și respectiv la unul nuclear prezent numai în formele slab diferențiate tumoral. La nivel tumoral reactivitatea pentru MMP-9 a fost mai mare comparativ cu cea înregistrată pentru MMP-2, valoarea media a IRS pentru cazuistica investigată fiind de 4.02 ± 2.16 . Scorurile IRS pentru markerul investigat a variat între 0 și 9. Reactivitatea tumorală a fost mai mare în formele moderat și slab diferențiate comparativ cu cele bine diferențiate, în primele reactivitatea fiind mai evidentă citoplasmatic iar pentru ultimele la nivel membranar. La nivelul specimenelor tumorale,

reactivitatea cea mai mare pentru CXCR4 am consemnat-o în cazurile de carcinom scuamos moderat diferențiat (IRS= 5.96±2.44), patternul subcelular al reacțiilor fiind unul preponderent membranar și mai rar citoplasmatic. În plus, în astfel de cazuri reactivitatea a fost consemnată mai ales la nivelul frontului de invazie, reacțiile fiind difuze la nivelul celulelor din componența proliferărilor neoplazice de la acest nivel. La nivelul țesutului tumoral reactivitatea pentru F-actină a fost de departe cea mai mare comparativ cu D2-40 și CD10. În mod asemanător formele bine diferențiate de carcinom scuamos lingual au prezentat cea mai scăzută reactivitate (IRS= 2.63±1.01), reacțiile pentru F-actină fiind difuze la nivelul proliferărilor neoplazice (Fig. 5.82), ceva mai intens spre frontul de invazie. Reactivitatea a fost prezentă în celulele de la periferia proliferărilor, lipsind de la nivelul perlelor keratozice. În țesutul tumoral reactivitatea pentru Snail a fost de departe cea mai redusă comparativ cu cea a celorlalți markeri investigați. Cea mai scăzută reactivitate am consemnat-o în formele bine diferențiate de carcinom scuamos lingual (IRS= 0.27±0.42), reacțiile pentru acest marker fiind prezentă la nivelul perlelor keratozice și în celulele de la periferia proliferărilor carcinomatoase. Reactivitatea cea mai mare am consemnat-o în formele slab diferențiate (IRS= 1.85±1.12), patternul predominant fiind unul citoplasmatic, iar reactivitatea a fost mai evidentă mai ales în frontul de invazie.

CAPITOLUL VI- Discuții

În anul 2012, la nivel mondial, rata standardizată cu vârsta a incidenței cancerului oral a fost estimată la 2,7 noi cazuri la 100000 de locuitori cu diferențe notabile legate sex, vârstă și regiune geografică [Shield KD et al., 2017]. Îngrijorător este însă faptul că în ultimii ani s-a observat o creștere alarmantă a incidenței cancerului lingual la tineri și mai ales în rândul persoanelor de sex feminin din rasa albă [Ng JH et al., 2017; Patel SC et al., 2011; Saba NF et al., 2011]. Datele din literatură indică faptul că în stadiile inițiale cancerelor orale indiferent de localizare evoluează asimptomatic, ele fiind descoperite accidental în cursul examinărilor efectuate în serviciile de stomatologie [Scully C, Bagan J, 2009]. În stadii avansate cancerelor orale sunt diagnosticate cel mai frecvent sub aspectul clinic de ulceratii dureroase [McGurk M, Scott SE, 2010; Pentenero M et al., 2011]. Strict în localizarea linguală cel mai frecvent întâlnit aspect clinic este cel de ulceratie extinsă în suprafață, urmat apoi de cel vegetant. La momentul diagnosticului se pare că circa 40% din bolnavi au și interesare limfoganglionară loco-regională. Mai mult, dacă tumorile primare au mai mult de 4 cm în diametru, diseminarea limfoganglionară este prezentă în 90% din cazuri. Investigația de tip CT reprezintă metoda standard pentru decelarea tumorilor primare și a invaziei lor osoase. Totuși are limitele sale în decelarea tumorilor mici și bine diferențiate, chiar și în cazul examinării cu substanță de contrast [Blatt S et al., 2016]. Performanțele pot fi îmbunătățite cu ajutorul CT cu substanță de contrast, care permite o mai bună evaluare a infiltrării neoplazice a țesuturilor adiacente și îndeosebi a musculaturii și totodată permite diferențierea între recidivele locale și modificările tisulare nespecifice post radio- și chimioterapie [Blatt S et al., 2016; Trojanowska A, 2011]. Referitor la localizarea linguală o serie de studii au arătat că investigația RMN poate preciza cu mare acuratețe profunzimea invaziei cancerelor linguale, având o mare valoare în predicția eventualelor diseminări limfoganglionare [Alsaffar HA et al., 2016; Park JO et al., 2011; Singh A et al., 2017].

Majoritatea studiilor indică carcinomul scuamos de tip convențional ca fiind de departe cel mai frecvent neoplasm dezvoltat din epitelul oral, având incriminați ca și factori

etiologici tabagismul și etilismul cronic [Johnson N et al., 2005; Mignogna MD et al., 2004]. Potrivit ultimei clasificări a tumorilor cavității orale [Johnson N et al., 2005] în afara tipului conventional s-au mai descris alte 6 varietăți histopatologice ale carcinomului scuamos: carcinomul verucos, carcinomul bazaloid, carcinomul cu celule fuziforme (sarcomatoid), carcinomul papilar, carcinomul acantolitic și carcinomul adenoscuamos. Managementul bolnavilor cu carcinom scuamos lingual continuă să se bazeze în primul rând pe stadializarea TNM în ciuda numeroșilor parametrii histologici, imunohistochimici și moleculari cu valoare prognostică raportați în literatură [Bello IO et al., 2010; da Silva SD et al., 2011]. Totuși rolul său major, atât prognostic cât și de planificare a terapiei este semnificativ mai ales pentru stadiile avansate ale carcinomului scuamos lingual, în timp ce utilitatea sa pentru formele precoce T1/T2N0M0 este scăzut [Kantola S et al., 2000; Piazza C et al., 2014a; Po Wing Yuen A et al., 2002]. Unii autori tocmai pentru a crește valoarea prognostică a sistemului TNM au propus și încorporarea în sistem a adâncimii invaziei tumorale [Hubert Low TH et al., 2015; Piazza C et al., 2014].

La baza agresivității cancerelor linguale ar sta degradarea matrice extracelulare, fapt realizat cu concursul matrixmetaloproteinazelor secretate atât de către celulele tumorale cât și de unele din celulele stromale tumorale asociate [Yu T et al., 2011]. În reglarea secreției acestor enzime ar intervenii și chemokina CXCR4, existând numeroase studii care au dovedit ca nivelurile expresiei tumorale ale CXCR4, MMP-2, MMP-9 și MMP-13 în carcinoamele scuamoase orale are fi cuplate [Yu T et al., 2011; Chu CY et al., 2007; Ishikawa T et al., 2006]. În studiul întreprins de către Piatelli A et al. s-a arătat că între expresia stromală a lui CD10 și rata metastazării limfoganglionare, a ratei de recidivă și a gradului histologic de diferențiere ar exista corelații semnificativ statistice [Piatelli A et al., 2006]. Autorii au sugerat că CD10 ar juca roluri importante în diferențiere, creșterea și invazia tumorală, facilitând dezvoltarea metastazelor în carcinoamele scuamoase orale. Studiile din literatură indică variații ale expresiei CXCR4 în carcinoamele scuamoase orale, în procente variind de la 28,6% la 100% [Almofti A et al., 2004; Delilbasi CB et al., 2004; Ishikawa T et al., 2006; Muller A et al., 2006], variații ce pot fi explicate prin utilizare a diferite sisteme de cuantificare a expresiei pentru acest marker și/sau utilizarea diferitelor clone de CXCR4 [Lee JI et al., 2009]. O serie de studii au indicat existența unei corelații directe între nivelul expresiei CXCR4 în tumorile primare și respectiv expresia acestui marker în metastazele limfoganglionare [Ishikawa T et al., 2006; Lee JI et al., 2009; Albert S et al., 2012; Al-Jokhadar et al., 2017]. Majoritatea autorilor nu au găsit corelații semnificative statistice între nivelurile MMP-2 și diferiți parametrii clinic-morfologici, incluzând: sexul, stadiile tumorale, grading-ul nuclear, gradul de diferențiere tumorală, expunerea la fumat [Patel BP et al., 2007; Mishev G et al., 2014; Yorioka CW et al., 2002]. Totuși, majoritatea studiilor indică existența unei corelații pozitive între nivelul expresiei MMP-2 și metastazarea limfoganglionară și prognosticul bolnavilor cu carcinoame scuamoase ale capului și gâtului [Patel BP et al., 2007; De Vicente JC et al., 2001; Hong SD et al., 2000; Kato K et al., 2005; Pu Y et al., 20014]. Marea majoritate a autorilor au observat niveluri crescute ale expresiei MMP-9 în carcinoamele scuamoase de la nivelul capului și gâtului, inclusiv de la nivel oral, dar semnificația prognostică a acestei expresii crescute rămâne un subiect contradictoriu. Se susține idea ca MMP-9 nu este sigurul factor implicat în procesul de invazivitate tumorală de la nivelul capului și gâtului și că el poate juca roluri fluctuante în cadrul acestui process [Vilen ST et al., 2013]. Numeroase studii au arătat o supraexpresie a D2-40 în carcinoamele scuamoase orale și o corelare a expresiei

sale cu gradul diferențierii tumorale, nivelurile maxime ale expresiei înregistrându-se în cazurile cu grad scăzut de diferențiere tumorală [A G D et al., 2017; Inoue H et al., 2012; Patil A et al., 2015; Prasad B et al., 2015]. Marea majoritate a studiilor indică existența unei corelații semnificative între nivelul expresiei D2-40 la nivelul carcinoamelor scuamoase orale și rata metastazării limfoganglionare cervicale [Huber GF et al., 2011; Kreppel M et al., 2012; Chung MK et al., 2010; Yuan P et al., 2006]. Trecerea în revistă a datelor privind expresia F-actinei în carcinoamele scuamoase orale nu a evidențiat nici un studiu care să fi avut ca obiectiv acest lucru. Totuși date indirecte privind participarea copartenerilor acestei proteine citoscheletale la procesul de invazivitate și metastazare din carcinoamele scuamoase orale au fost evidențiate în câteva studii. Astfel în studiul întreprins de către Yamada S et al s-a evidențiat existența unei supraexpresii a cortactinei care s-a corelat înalt semnificativ statistic cu fenotipuri agresive ale carcinoamelor scuamoase orale [Yamada S et al., 2010]. Deși în carcinoamele scuamoase orale, imunoreactivitatea pentru Snail a fost raportată predominant în frontul de invazie, per total rata expresiei sale în astfel de cancere a fost una scăzută [Zidar N et al., 2008]. De asemenea nu s-au observat nici asocierii ale expresiei Snail cu potențialul de metastazare în carcinoamele scuamoase orale [Franz M et al., 2009; Schwock J et al., 2010] deși în carcinoamele scuamoase esofagiene s-a raportat existența de corelații semnificative dintre expresia Snail de la frontul de invazie și rata de metastazare limfoganglionară, precum și cu stadiul tumoral [Usami Y et al., 2008].

Capitolul VII.- Concluzii.

- Profilul epidemiologic al bolnavi investigați arată prevalența carcinoamelor scuamoase orale în decada a VII-a de viață (49,13%), la bărbați (raportul bărbați/femei fiind de 1:1,37), cel mai adesea cu originea în porțiunea mobilă a limbii (2/3 din cazuistica investigată).

- Studiul clinic a scos în evidență evoluția în general asimptomatică a unor astfel de cazuri, iar când acestea devin simptomatice, durerea (54,38%) și ulcerația (43,86%) au fost simptomele dominante. Circa o treime din acești bolnavi au prezentat metastaze decelabile clinic la momentul diagnosticului. În mai puțin de jumătate din cazuri (47,37%) au putut fi efectuate investigații de tip CT, iar în sub 20% de investigații de tip RMN.

- Histopatologic am evidențiat prezența mai multor subtipuri, respectiv: convențional, acantolitic, bazaloid, sarcomatoid și verucos, tipul convențional predominând în mai mult de jumătate din cazuri (54,4%). Raportat la scorul de risc histologic Brandwein-Gensler aproape jumătatea din cazuistică a prezentat scoruri moderate, fiind vorba de forme ceva mai agresive, moderat și slab diferențiate, cu stromă inflamatorie de grad 2 și cu invazie perineurală prezentă. În mai puțin de o treime din cazuri am consemnat prezența metastazelor limfoganglionare, stadiul N cel mai des diagnosticat fiind N1 (53% din cazurile cu disemnare limfatică). Majoritatea bolnavilor au fost diagnosticați în stadii avansate de boală, 40,35% în stadiul III- pTNM și respectiv 33,33% în stadiul II- pTNM.

- Imunoreactivitate pentru CD10 a fost mai evidentă în formele moderat și slab diferențiate, îndeosebi la frontul de invazie, dovedind implicarea sa în procesul de invazivitate a carcinoamelor scuamoase linguale, secundar facilitării interacțiunilor dintre celulele tumorale și stroma adiacentă.

- Pentru markerul CXCR4 am consemnat unele din cele mai mari scoruri de imunoreactivitate, fiind pe locul doi după marcajul cu F-actină. La nivel tumoral,

imunomarcajul a fost mai evident pentru ormele moderat și slab diferențiate, mai ales în cazul celor metastazante.

- Deși reactivitatea tumorală pentru MMP-2 a fost una scăzută, inferioară marcajelor cu CXCR4 și MMP-9 am consemnat patternuri diferite de reactivitate în funcție de gradul de diferențiere al carcinoamelor scuamoase linguale studiate. La nivel tumoral imunoreactivitatea pentru MMP-9 a fost superioară celei pentru MMP-2, formele moderat și slab diferențiate având cea mai mare reactivitate.

- Statistic am observat existența unor corelații directe moderate la nivel tumoral între expresiile CXCR4 și MMP9 și respectiv între MMP-2 și MMP-9. Așadar celulele tumorale din carcinoamele scuamoase linguale ar avea un potențial intrinsec de invazivitate conferit de expresia celor 3 markeri îndeosebi la frontul de invazie, mai evidentă în formele moderat și slab diferențiate și respectiv în cazurile metastazante.

- Marcajul cu D2-40 a fost mai evident în celulele tumorale de la periferia proliferărilor tumorale și în frontul de invazie a formelor moderat diferențiate de carcinom scuamos lingual, formele acantolitice și cazurile cu diseminare limfoganglionară prezentând maximum de reactivitate. Pentru markerul F-actină reactivitatea cea mai mare am consemnat-o mai ales în formele acantolitice și în cazurile asociate cu stroma dezmozoplazică și/sau stromă tumorală inflamatorie, reacțiile fiind mai evidente în frontul de invazie.

- Statistic am consemnat existența unei corelații între reactivitatea tumorală pentru fiecare din markerii D2-40, CD10 și F-actină și respectiv gradele de diferențiere și stadiile pTNM ale bolnavilor cu cancer lingual studiați. Astfel reactivitatea cea mai mare a fost consemnată în cazurile cu grad G2-G3 de diferențiere histologică și respectiv la bolnavii aflați în stadiile III-IV pTNM de boală.

- Profilul imunoreactivității investigat de noi scoate în evidență potențialul crescut de invazivitate al acestei localizări particulare a carcinoamelor scuamoase orale, markerii de tipul CXCR4, MMP-9, D2-40, CD10 și F-actină putând fi considerați markeri de tip prognostic.

- La nivel molecular un astfel de imunoprofil evidențiază potențialul intrinsec invaziv, capacitatea proprie de motilitate și conlucrarea celulelor tumorale, mai ales a celor de la frontul de invazie, cu celule stromale pentru extinderea locoregională a carcinoamelor scuamoase linguale.

- În plus fiecare dintre acești markeri sunt și pot fi ținte moleculare ale unui tratament mult mai eficient decât cel clasic, crescând semnificativ rata de supraviețuire a unor astfel de bolnavi cancroși.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG, Bouquot JE, Slootweg PJ. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p.168-75.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organisation histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd edition. Springer, New York; 1997.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol. 1992;166(4):375-81.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. Pathologie. 1987;8:138-140.

Broders AC. The microscopic grading of cancer. Surg Clin North Am 1941; 21: 947-62.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989;18(8):432-7.

Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, Soerjomataram I. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):51-64.

Saba NF, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, Chen A, Grist W, Wadsworth T, Beitler JJ, Khuri FR, Shin DM. Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology.* 2011;81(1):12-20.

Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, Hayes DN, Shores C, Chera BS. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1488-94.

Ng JH, Iyer NG, Tan M-H, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck* 2017;39 (2):297–304.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15(6):388-99.

McGurk M, Scott SE. The reality of identifying early oral cancer in the general dental practice. *Br Dent J.* 2010;208(8):347-51.

Pentenero M, Navone R, Motta F, Marino R, Gassino L, Broccoletti R, Gandolfo S. Clinical features of microinvasive stage I oral carcinoma. *Oral Dis.* 2011;17(3):298-303.

Blatt S, Ziebart T, Krüger M, Pabst AM. Diagnosing oral squamous cell carcinoma: How much imaging do we really need? A review of the current literature. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(5):538-49.

Trojanowska A. Squamous cell carcinoma of the head and neck-The role of diffusion and perfusion imaging in tumor recurrence and follow-up. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2011;16(6):207-12.

Alsaffar HA, Goldstein DP, King EV, de Almeida JR, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Espin-Garcia O, Xu W, Irish JC. Correlation between clinical and MRI assessment of depth of invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;45(1):61.

Park JO, Jung SL, Joo YH, Jung CK, Cho KJ, Kim MS. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging (MRI) in the assessment of tumor invasion depth in oral/oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(5):381-6.

Singh A, Thukral CL, Gupta K, Sood AS, Singla H, Singh K. Role of MRI in Evaluation of Malignant Lesions of Tongue and Oral Cavity. *Pol J Radiol.* 2017;82:92-99.

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13(2):139–42.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol.* 2010;46(9):636-43.

da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, Bradford CR, Rodrigo JP, Rinaldo A, Hier MP, Kowalski LP. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol.* 2011;47(9):783-91.

Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkangas K, Soini Y, Alho OP, Salo T. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer.* 2000;83(5):614-9.

Piazza C, Taglietti V, Paderno A, Nicolai P. End-to-end versus end-to-side venous microanastomoses in head and neck reconstruction. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(1):157-62.

Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, Yuen WF, Wei WI. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck.* 2002;24(6):513-20.

Piazza C, Montalto N, Paderno A, Taglietti V, Nicolai P. Is it time to incorporate 'depth of infiltration' in the T staging of oral tongue and floor of mouth cancer? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;22(2):81-9.

Hubert Low TH, Gao K, Elliott M, Clark JR. Tumor classification for early oral cancer: re-evaluate the current TNM classification. *Head Neck*. 2015;37(2):223-8.

Yu T, Wu Y, Helman JI, Wen Y, Wang C, Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. *Mol Cancer Res*. 2011;9(2):161-72.

Chu CY, Cha ST, Chang CC, Hsiao CH, Tan CT, Lu YC, Jee SH, Kuo ML. Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-derived factor 1 alpha-directed invasion of human basal cell carcinoma cells. *Oncogene*. 2007;26(17):2491-501.

Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006;28(1):61-6.

Piattelli A, Fioroni M, Iezzi G, Perrotti V, Stellini E, Piattelli M, Rubini C. CD10 expression in stromal cells of oral cavity squamous cell carcinoma: a clinic and pathologic correlation. *Oral Dis*. 2006;12(3):301-4.

Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2004;25(1):65-71.

Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*. 2004;40(2):154-7.

Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitzka R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B, Hoffmann TK. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2147-57.

Lee JI, Jin BH, Kim MA, Yoon HJ, Hong SP, Hong SD. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):678-84.

Xia J, Chen N, Hong Y, Chen X, Tao X, Cheng B, Huang Y. Expressions of CXCL12/CXCR4 in oral premalignant and malignant lesions. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:516395.

Albert S, Hourseau M, Halimi C, Serova M, Descatoire V, Barry B, Couvelard A, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, de Gramont A, Raymond E, Faivre S. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral Oncol*. 2012;48(12):1263-71.

Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck*. 2007;29(6):564-72.

Mishev G, Deliverska E, Hlushchuk R, Velinov N, Aebbersold D, Weinstein F, Djonov V. Prognostic value of matrix metalloproteinases in oral squamous cell carcinoma. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2014 2;28(6):1138-1149.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol*. 2002;20(1):189-94.

De Vicente JC, Recio OR, Pendás SL, López-Arranz JS. Oral squamous cell carcinoma of the mandibular region: A survival study. *Head Neck*. 2001;23(7):536-43.

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.

Kato K, Hara A, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H, Toida M, Shibata T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(6):340-6.

Pu Y, Wang L, Wu H, Feng Z, Wang Y, Guo C. High MMP-21 expression in metastatic lymph nodes predicts unfavorable overall survival for oral squamous cell carcinoma patients with lymphatic metastasis. *Oncol Rep*. 2014;31(6):2644-50.

Vilen ST, Salo T, Sorsa T, Nyberg P. Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:920595.

A G D, Janardanan-Nair B, B R V. Podoplanin expression in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Dent*. 2017;9(12):e1418-e1424.

- Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Yoshida N, Ide F, Ohmori Y, Tomomura A, Sakashita H, Kusama K. Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity. *Tumour Biol.* 2012;33(1):183-94.
- Patil A, Patil K, Tupsakhare S, Gabhane M, Sonune S, Kandalgaonkar S. Evaluation of Podoplanin in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Scientifica (Cairo).* 2015;2015:135298.
- Prasad B, Kashyap B, Babu GS, Kumar GR, Manyam R. Expression of Podoplanin in Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Ann Med Health Sci Res.* 2015;5(4):299-304.
- Huber GF, Fritzsche FR, Züllig L, Storz M, Graf N, Haerle SK, Jochum W, Stoeckli SJ, Moch H. Podoplanin expression correlates with sentinel lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer.* 2011;129(6):1404-9.
- Kreppel M, Kreppel B, Drebber U, Wedemayer I, Rothamel D, Zöllner JE, Scheer M. Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. *Oral Dis.* 2012;18(7):692-9.
- Chung MK, Min JY, So YK, Ko YH, Jeong HS, Son YI, Baek CH. Correlation between lymphatic vessel density and regional metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Head Neck.* 2010;32(4):445-51.
- Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer.* 2006;107(3):563-9.
- Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK. Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(4):523-31.
- Zidar N, Gale N, Kojc N, Volavsek M, Cardesa A, Alos L, Höfler H, Blechschmidt K, Becker KF. Cadherin-catenin complex and transcription factor Snail-1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch.* 2008;453(3):267-74.
- Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A, Altendorf-Hofmann A, Koscielny S, Hyckel P, Kosmehl H, Virtanen I, Berndt A. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol.* 2009;131(5):651-60.
- Schwock J, Bradley G, Ho JC, Perez-Ordóñez B, Hedley DW, Irish JC, Geddie WR. SNAI1 expression and the mesenchymal phenotype: an immunohistochemical study performed on 46 cases of oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2010;10:1.
- Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol.* 2008;215(3):330-9.