

Eosinofilia tecidual na região do fronte invasivo do carcinoma de células espinocelulares de boca: correlação com parâmetros clínico-patológicos

Alfredo Maurício Batista De-PAULA^a, Sérgio Vitorino CARDOSO^a,

Ricardo Santiago GOMEZ^b

^aDepartamento de Diagnostico Oral, Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, 39401089 Montes Claros - MG, Brasil

^bDepartamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270901 Belo Horizonte - MG, Brasil

De-Paula AMB, Cardoso SV, Gomes RS. Tissue eosinophilia in invasive front of oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters. Rev Odontol UNESP. 2006; 35 (3): 163-69.

Resumo: Introdução Tem sido reconhecido que muitos cânceres são acompanhados por um infiltrado de células inflamatórias de intensidades variáveis. Atenção tem sido direcionada para o possível papel de eosinófilos no comportamento biológico de lesões neoplásicas malignas. **Objetivo** Avaliar a influência da quantificação de eosinófilos localizados no infiltrado inflamatório da região do fronte invasivo de amostras de carcinoma espinocelular de boca (CEC), categorizados de acordo com o tamanho das lesões primárias; a ocorrência de metástases regionais e com a severidade morfológica da região do fronte de invasão das lesões. **Material e método** Amostras de 38 espécimes de CEC foram investigadas nesse estudo. O sistema de gradação de malignidades para a região do fronte invasivo empregado no estudo foi idealizado por Bryne et al.⁹. Para a contagem de eosinófilos, foi utilizada uma lente ocular com um retículo milimetrado de 25 pontos. Doze campos microscópicos corados em H&E foram avaliados de forma aleatória, em um aumento de 400x. Apenas as regiões localizadas no fronte invasivo de cada lesão primária e que apresentavam um evidente componente inflamatório foram selecionadas para análise. A avaliação morfométrica empregada foi baseada no método de Fisher et al.²⁹. **Resultado** Concordância entre patologistas quanto a gradação da severidade morfológica do fronte de invasão revelou valores de kappa de 0,81 e 0,71 para os exames intra e interobservador, respectivamente. Foi encontrada uma menor quantificação de eosinófilos nas lesões de maiores tamanhos clínicos. Os demais resultados não demonstraram a presença de correlações estatisticamente significativas. **Conclusões** O tamanho clínico das lesões primárias e a ocorrência de metástases cervicais não parecem ser influenciados pela severidade da gradação morfológica da região do fronte invasivo do CEC. Uma menor quantificação de eosinófilos nas lesões de maiores tamanhos clínicos parece demonstrar uma provável ação inibitória da atividade quimiotática e, conseqüentemente, das atividades antineoplásicas realizadas pelos eosinófilos contra o crescimento de células epiteliais malignas. Estudos futuros sobre a participação de eosinófilos no processo da carcinogênese bucal e de suas citocinas produzidas propiciarão um melhor entendimento sobre o comportamento biológico do CEC.

Palavras-chave: *Carcinoma espinocelular; boca; metástase; estadiamento de neoplasias.*

Abstract: Introduction It has been long recognized that many cancers are accompanied by infiltrates of inflammatory cells of varying intensity. Attention has been directed to the possible role of eosinophils in the biologic behavior of malignant neoplastic lesions. **Objective** To evaluate the influence of number of eosinophils in samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) with different morphological and clinical parameters. **Material and method** Tumor tissues of 38 cases of OSCC were investigated in this study. The malignancy grading system of tumour invasive front (Bryne et al.⁹) was used. An ocular grid in twelve high-power fields in each specimen of primary tumor was used in haematoxylin and eosin stained slides for eosinophils counting. These counting was made in the inflammatory infiltrated in the most invasive areas of the tumour parenchyma. The

morphometric analysis employed was based in the method of Fisher et al.²⁹. **Result** Agreement between pathologists for grading of invasive front showed kappa values of 0.81 and 0.71 for intra and interobserver exams, respectively. Our results did not show a statistically meaningful correlation among the clinical and morphological variables (size of the lesions, cervical metastasis and grading of tumour invasive front). It was found a statistically meaningful association between the eosinophils counting was statistically associated to the size of the lesions. It was found the smaller number of eosinophils counts in the bigger size lesions (T3/T4). **Conclusions** Clinical size of the lesions and cervical metastasis of the OSCC do not seem to be directly influenced by morphological grading of the tumour invasive front. A smaller eosinophils counting in bigger size lesions may demonstrate an inhibitory action of the chemotactic activity and/or their antineoplastic activities. Futures advances in the understanding of molecular control of these cells and its cytokines produced may bring a better understanding of biologic behavior of the OSCC.

Keywords: *Squamous cell carcinoma; oral cavity; eosinophils; metastasis; neoplasm staging.*

Introdução

O surgimento e o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca (CEC) requerem a contribuição de diversos fatores biológicos, normais e/ou alterados. A etiopatogênese do CEC lesão revela participação de fatores de riscos ambientais relacionados ao estilo de vida, tais como o tabagismo e aqueles relacionados com a susceptibilidade genética dos indivíduos acometidos¹⁻⁴.

A cinética pela qual passam as células neoplásicas malignas em seu processo múltiplo de desenvolvimento resulta de complexas interações biomoleculares entre o tecido neoplásico maligno e os tecidos normais e inflamados adjacentes à lesão, em uma região conhecida como frente de invasão. Os aspectos morfológicos demonstrados na região do frente invasivo resultam de um grupo de eventos intracelulares determinados por diversos produtos gênicos responsáveis pela progressão e pela disseminação das células neoplásicas malignas. As interações moleculares encontradas nas regiões do frente invasivo do CEC são consideradas importantes para a predição do comportamento clínico da lesão⁵⁻¹⁴.

Eosinófilos representam um grupo de leucócitos polimorfonucleares circulantes no sangue e que podem migrar para o interstício^{18,32-34}. Diversos estudos têm sugerido que a presença expressiva de eosinófilos no estroma do hospedeiro, assim como das citocinas produzidas por essas células, parece desempenhar funções importantes nos processos interativos entre os tecidos normais e neoplásico em diversas regiões do corpo humano, inclusive na boca. Durante essa interação, ocorreria a modulação da resposta imunológica para uma provável permissão de vantagens seletivas para o crescimento e o desenvolvimento de células neoplásicas malignas iniciadas¹⁵⁻²⁸.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a presença e a quantificação de eosinófilos encontrados no infiltrado inflamatório localizado nas proximidades do parênquima neoplásico maligno do CEC podem influenciar a ocorrência de metástases regionais no tamanho clínico das lesões primárias

e na agressividade morfológica da região do frente invasivo das lesões. Dessa forma, procurou-se contribuir para um maior entendimento sobre a complexa rede de interações celulares envolvidas no desenvolvimento da carcinogênese bucal e de sua influência sobre o comportamento clínico da lesão.

Material e método

Trinta e cinco amostras de arquivo de CEC do Serviço de Patologia Bucal da Universidade Federal de Minas Gerais, confirmadas microscopicamente, foram avaliadas de forma retrospectiva. Os registros médicos dos pacientes selecionados para este estudo foram obtidos nos serviços de cirurgia de cabeça e pescoço de hospitais públicos e privados da cidade de Belo Horizonte - MG. As amostras utilizadas foram obtidas exclusivamente de pacientes tratados cirurgicamente, sendo desconsideradas as amostras coletadas de pacientes portadores da doença submetidos aos procedimentos de rádio e/ou quimioterapia. Somente os pacientes que consentiram para a participação neste estudo, a partir da assinatura do termo de consentimento em suas fichas clínicas, tiveram seus dados analisados.

As amostras foram separadas em grupos de acordo com: a ocorrência ou ausência de metástases cervicais perceptíveis clinicamente, independente do número e localização dos nodos metastáticos (Grupo 1: N0 e Grupo 2: N1, N2 ou N3); o tamanho clínico das lesões (Grupo 1: T1/T2, para lesões de até 4 centímetros, e Grupo 2: T3-T4, para lesões maiores que 4 centímetros); e finalmente, quanto à severidade morfológica do frente de invasão das lesões, sendo formados três grupos: Grupo F1: lesões cujos valores finais para a severidade da gradação morfológica do frente invasivo se enquadraram no intervalo entre 4 e 8 (bom prognóstico); Grupo F2: lesões que obtiveram valores situados no intervalo entre 9 e 12 (prognóstico moderado); Grupo F3: lesões com resultados situados no intervalo entre 13 e 16 (prognóstico ruim).

Todas as amostras coletadas foram fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina, submetidas a cortes microscópicos de 5 µm, desparafinizadas e coradas em H&E. Durante a avaliação microscópica das lesões, somente aquelas que apresentavam uma visível infiltração neoplásica nos tecidos inflamados adjacentes foram consideradas (Figura 1). A gradação da severidade morfológica da região do fronte invasivo foi realizada de acordo com os critérios de Bryne et al.⁹. Nesse sistema, a gradação a malignidade é baseada em quatro parâmetros morfológicos identificados no parênquima maligno e na sua relação com o estroma normal circunvizinho à lesão. Cada parâmetro é graduado em um intervalo de 1 a 4 pontos, de acordo com os critérios estabelecidos por Anneroth et al.²⁸. O valor total de cada caso é definido como a soma dos pontos atribuídos a cada um dos quatro parâmetros avaliados isoladamente. Dessa forma, a gradação mínima apresenta um valor de 4 pontos e a máxima de 16 pontos. Quanto maior a gradação encontrada, maior será considerada a severidade morfológica da lesão.

A gradação das amostras foi realizada de forma independente por 2 patologistas bucais (De-Paula, AMB e Cardoso, SV) em 20 casos de CEC escolhidos aleatoriamente. Três semanas depois, para uma nova calibração dos mesmos patologistas, os critérios de gradação foram rediscutidos e os casos de CEC foram novamente graduados.

Eosinófilos foram identificados nos cortes histológicos corados em H&E. As células que apresentavam uma intensa eosinofilia citoplasmática e núcleo celular com aspecto morfológico bi, tri ou, algumas vezes, tetralobulado foram consideradas. A análise morfométrica das lesões foi realizada de acordo com critérios definidos por Fisher et al.²⁹. A quantificação foi realizada de forma semiquantitativa, a partir da contagem de 12 campos microscópicos escolhidos de forma aleatória, nas áreas localizadas nas regiões do fronte de invasão entre o parênquima neoplásico maligno do CEC e o estroma inflamado do hospedeiro. Eosinófilos localizados dentro das porções mais invasivas do parênquima neoplásico (em ex-

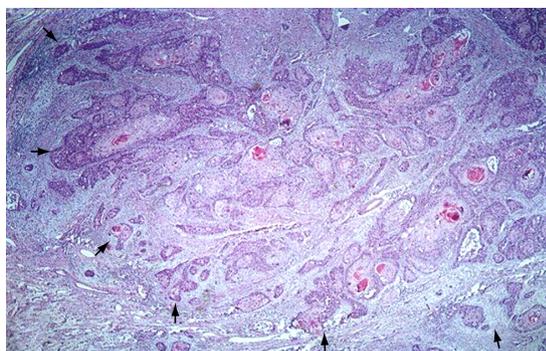


Figura 1. Aspectos morfológicos do CEC. As setas apontam para as regiões do fronte de invasão (Coloração H&E; Aumento de 40x).

citose) também foram considerados. Para essa contagem, foi utilizado um microscópio óptico (ZEISS®, Standard 20), com uma ocular Kpl (10x), contendo um retículo de integração de 25 pontos (ZEISS®), num aumento final de 400x. Após a contagem dos eosinófilos, foram obtidos os valores médios absolutos e as medianas.

As análises estatísticas dos resultados encontrados para a quantificação de eosinófilos e de sua correlação com as variáveis clínicas (tamanho das lesões e ocorrência de metástases cervicais) e morfológicas (gradação da severidade morfológica do fronte invasivo) foram obtidas com o emprego dos testes de Mann-Whitney ou T de student e da Análise de Variância ou de Kruskal-Wallis, respectivamente. Utilizou-se o software de estatística SPSS®, versão 13.0 para Windows®. Um intervalo de confiança acima de 95% ($p < 0,05$) foi considerado significativo. A análise de reprodutibilidade interexaminador e intra-examinador do sistema de gradação morfológico do fronte de invasão foi realizada com o emprego do teste estatístico de Kappa.

Resultado

Os dados relativos às análises epidemiológica, clínica e morfológica das amostras utilizadas neste estudo se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das amostras de acordo com as variáveis idade, sexo, localização e gradação clínica e morfológica

Parâmetro	N	%
Idade		
< 61	17	49
≥ 61	18	51
Sexo		
Feminino	09	26
Masculino	26	74
Localização		
Língua	15	43
Assoalho bucal	13	37
Outras regiões	07	20
Tamanho das Lesões (T)		
T1-T2	15	43
T3-T4	20	57
Ocorrência de metástases cervicais		
Ausente	23	66
Presente	12	34
Gradação morfológica do fronte de invasão		
F1 (valores entre 4-9)	06	17
F2 (valores entre 9-12)	20	57
F3 (valores entre 3-16)	09	26

N = número de casos.

Os resultados dos exames de concordância intra e inter-observadores realizados pelo teste estatístico de Kappa demonstraram valores de 0,82 e 0,71, respectivamente. Tais resultados revelam um ótimo grau de reprodutibilidade do sistema de gradação.

A presença de eosinófilos foi notada no infiltrado inflamatório próximo do fronte invasivo, assim como no parênquima neoplásico maligno do CEC, de todas as amostras selecionadas neste estudo (Figura 2). Os valores mínimos e máximos para a média da contagem de eosinófilos foram de 0,1 a 52,9, respectivamente. Os resultados revelados pelos testes estatísticos demonstraram a presença de uma relação de significância estatística ($p < 0,05$) entre o parâmetro clínico, o tamanho das lesões e a contagem de eosinófilos. Foi observada uma diminuição do número de eosinófilos nas lesões de maior tamanho clínico (T3/T4) (Tabela 2).

Discussão

As regiões mais avançadas do CEC, conhecidas como fronte invasivo, revelam freqüentemente a presença de células neoplásicas malignas com um menor grau de diferenciação e com um maior grau de dissociação, comparadas às demais regiões da mesma lesão. A gradação da severidade das alterações morfológicas encontradas nessas regiões tem sido utilizada para o estadiamento morfológico

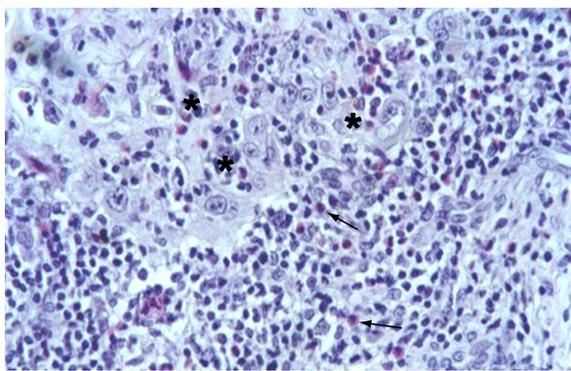


Figura 2. Aspectos citomorfológicos de eosinófilos localizados na interface entre o tecido conjuntivo fibroso inflamado e o parênquima neoplásico maligno. As setas e os asteriscos demonstram a presença de eosinófilos localizados no estroma e no parênquima das lesões, respectivamente (Coloração H&E; Aumento de 400x).

de malignidades, em especial do CEC^{6,9,11,12}. Contudo, o principal problema para a implementação da maioria desses sistemas de gradação é o grau de discordância encontrado nos exames intra e interobservadores⁸. O teste estatístico de Kappa é considerado, até o presente momento, o melhor teste para a avaliação de reprodutibilidade. Neste teste, valores de concordância abaixo de 0,6 são considerados inaceitáveis cientificamente¹¹. Nesse estudo, os valores de Kappa encontrados foram de 0,82 e 0,71 nos exames intra e interobservadores, respectivamente. Tais resultados demonstram um ótimo grau de reprodutibilidade do sistema^{6,9,11,12}. A calibração prévia dos pesquisadores e a equivalência dos quatro parâmetros morfológicos avaliados contribuem para um alto grau de concordância^{6,8}.

Eosinófilos desempenham importantes atividades funcionais durante o processo de interação entre o tecido normal do hospedeiro e o tecido neoplásico maligno, promovendo reações de citotoxicidade mediada pela proteína básica principal, Granzima B e Perofrina, ou pela produção e liberação de radicais livres ou, ainda, pela sua atuação como células efetoras de atividades anti-neoplásicas, de forma Th2 dependente. Trabalhos diversos da literatura demonstraram que a presença e o número de eosinófilos nas regiões limítrofes de neoplasias epiteliais malignas humanas, incluindo aquelas encontradas na boca, atuam como fatores importantes para o fenômeno da progressão neoplásica^{16-27,29-31,43}. Goldsmith et al.²¹ demonstraram que o aumento do número de eosinófilos encontrados em amostras de CEC foi considerado como a variável mais influente para um curso clínico menos agressivo para os portadores da doença. Lowe, Fletcher¹⁸ verificaram que, nas lesões que apresentavam uma quantidade expressiva de eosinófilos na interface estroma e parênquima neoplásico maligno, os pacientes apresentaram um maior período de sobrevivência. O trabalho de Hung et al.³⁰ demonstrou uma associação funcional entre eosinófilos, linfócitos TCD4⁺ e macrófagos ativados na montagem de uma resposta imunológica responsável pela destruição de células neoplásicas malignas. Por outro lado, alguns estudos demonstraram o papel de eosinófilos como estimuladores diretos do crescimento de células epiteliais malignas. Wong et al.²⁵ e Todd et al.^{33,34} demonstraram que os eosinófilos eram os principais produtores do fator de crescimento transformante- α (TGF- α), uma citocina que apresenta um papel fundamen-

Tabela 2. Correlação entre a quantificação de eosinófilos e os parâmetros clínicos e morfológicos das amostras de CEC

	Tamanho clínico*			Metástases cervicais*			Gradação do fronte**			
	T1/T2	T3/T4	p	Aus	Pres	p	F1	F2	F3	p
Eosinófilos	21	2,3	$p < 0,05$	5,2	3,3	n.s.	7,7	3,0	3,3	n.s.

n.s. = não significativo. Aus. = ausente. Pres. = Presente; *As médias e medianas foram comparadas pelos testes T de Student ou de Mann-Whitney; **As médias e medianas foram comparadas pelos testes Análise de Variância e de Kruskal-Wallis.

tal para o incentivo da atividade proliferativa de células epiteliais neoplásicas malignas. Ghiabi et al.³² demonstraram resultados semelhantes em áreas próximas do epitélio neoplásico maligno bucal. Todd et al.³⁴ também verificaram que a presença de um maior número de eosinófilos estava associada a epitélios com alta atividade proliferativa. Dessa forma, pela avaliação desses resultados contraditórios, fica evidente que complexas interações celulares e moleculares entre as células do infiltrado inflamatório e o parênquima neoplásico maligno são determinantes para a montagem ou não de uma efetiva resposta anti-neoplásica.

Neste estudo, foi encontrada uma diminuição do número de eosinófilos nas lesões de maiores tamanhos clínicos, sugerindo uma diminuição ou um impedimento das atividades anti-neoplásicas executadas por essas células durante a progressão do CEC. Citocinas liberadas a partir de células neoplásicas malignas do CEC promoveriam uma suposta ação inibitória sobre o fenômeno de quimiotaxia, o que resultaria em atividades estimuladoras para o crescimento das lesões^{35,36}. Um adequado deslocamento e a estimulação da atividade citotóxica de eosinófilos proporcionariam uma maior destruição de células neoplásicas malignas e apresentariam, como efeito, atividades inibitórias sobre o crescimento das lesões.

A ocorrência de metástases nodais nos pacientes portadores do CEC parece refletir a agressividade biológica da neoplasia maligna primária, promovendo um impacto significativamente negativo sobre o controle regional e o curso da doença, além de sobre a sobrevivência dos pacientes^{37,38}. Não foi demonstrada a influência de eosinófilos sobre o comportamento metastático das lesões nesse estudo. Goldsmith et al.²¹ demonstraram que uma alta contagem de eosinófilos esteve associada a uma menor incidência de metástases regionais. Um maior número de eosinófilos seria esperado nas lesões de pacientes não portadores de metástases regionais, já que as atividades citotóxicas realizadas por essas células seriam determinantes para a destruição de clones neoplásicos com fenótipos metastáticos. A liberação de fatores imunossupressores e o bloqueio da atividade citotóxica realizada pelos radicais livres poderiam influenciar as atividades funcionais de eosinófilos na região do fronte invasivo das lesões. Além disso, estudos com amostras de CEC demonstraram que o fenômeno metastático é diretamente dependente da expressão de enzimas proteolíticas e de seus receptores³⁹⁻⁴². Assim, a avaliação dessas biomoléculas nessa amostra poderia fornecer importantes informações sobre o comportamento metastático das lesões.

Os resultados encontrados neste estudo também não demonstram uma relação estatisticamente significativa entre a quantificação de eosinófilos nas diferentes gradações morfológicas de malignidade no fronte invasivo do CEC. Esse achado revela que o aumento dos indicadores morfológicos de malignidade avaliados pelo sistema de gradação do fronte invasivo, tais como o grau de ceratinização, o polimorfismo nuclear, o padrão de invasão e o infiltrado inflamatório,

não apresenta, de forma isolada ou em conjunto, uma associação evidente ou uma participação ativa de eosinófilos localizados nessas áreas.

Portanto, neste estudo, eosinófilos não demonstraram nem um papel citoprotetor nem um papel incentivador do processo de formação de metástases regionais ou da severidade morfológica para a região do fronte invasivo do CEC. Estudos futuros se tornam necessários para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de ação de eosinófilos localizados na região do fronte invasivo e sobre seus impactos clínicos no CEC.

Conclusão

É vastamente aceito que o câncer surge como o resultado de acúmulos de alterações genéticas que promovem situações de desequilíbrio sobre o controle do crescimento celular e dos processos de diferenciação terminal. O tamanho clínico das lesões primárias e a ocorrência de metástases cervicais não parecem ser influenciados pela severidade da gradação morfológica da região do fronte invasivo do CEC. Uma menor quantificação de eosinófilos nas lesões de maiores tamanhos clínicos parece demonstrar uma provável ação inibitória da atividade quimiotática e, conseqüentemente, das atividades anti-neoplásicas realizadas pelos eosinófilos contra o crescimento de células epiteliais malignas. Adicionalmente, parece não haver nenhuma contribuição dessas células para os fenômenos de metástase regional e para a severidade morfológica da região do fronte de invasão das lesões. Tornam-se necessários estudos futuros para garantir um maior entendimento sobre a participação de eosinófilos e de suas citocinas produzidas no processo da carcinogênese bucal e sobre o comportamento biológico do CEC.

Agradecimento

CNPq e FAPEMIG.

Referências

1. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000; 36:256-63.
2. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000; 6:65-74.
3. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2001; 37:115-26.
4. Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Mol Pathol.* 2000; 53:165-72.
5. Bãnkfalvi A, Piffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29:291-8.

6. Bryne M. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18:432-7.
7. Bryne M. Prognostic value of various molecular. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20:413-20.
8. Bryne M. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20:369-72.
9. Bryne M. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992; 166:375-81.
10. Bryne M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchow Arch.* 1995; 427:277-81.
11. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG. The invasive front of carcinomas. The most important part for tumour prognostication? *Anticancer Res.* 1998; 18:4757-64.
12. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 1998; 4:70-7.
13. Noguchi M, Kinjyo H, Kohama GI, Nakamori K. Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93:682-7.
14. Piffkò J, Bàngfalvi À, Öfner M, Rasch, D, Joos U, Schmid KW. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 1997; 182:450-6.
15. Weller PF, Goetzel EJ. The human eosinophil. *Am J Pathol.* 1980; 100:794-80.
16. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer.* 1983; 43:2997-3000.
17. Lowe D, Fletcher CDM, Gower RL. Tumor-associated eosinophilia in the bladder. *J Clin Pathol.* 1984; 37:500-02.
18. Lowe D, Fletcher CDM. Tumor-associated eosinophilia: a review. *Histopathol.* 1984; 8:627-32.
19. Iwasaki K, Toriju M, Fujimura T. Malignant tumor and eosinophils. *Cancer.* 1987; 58:1321-7.
20. Goldsmith MM, Cresson DH, Askin FB. The prognostic significance of stromal eosinophilia in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 96:319-24.
21. Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD, Askin FB. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 106:106-27.
22. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science.* 1992; 257:548-51.
23. Tepper RI. The eosinophil-mediated antitumor activity of interleukin-4. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94:1225-31.
24. Samoszuk M. Eosinophils and human cancer. *Histol Histopathol.* 1997; 12:807-12.
25. Wong DTW, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, et al. Human eosinophils express transforming growth factor- α . *J Exp Med.* 1990; 172: 673-81.
26. Wong DTW, Bowen SM, Elovic A, Gallagher GT, Weller PF. Eosinophil ablation and tumor development. *Oral Oncol.* 1999; 35:496-501.
27. Dorta RG. Eosinofilia tecidual como fator de prognóstico em carcinomas espinocelulares de boca [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2000.
28. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95:229-49.
29. Fisher ER, Rockette H, Jones J, Caplan R, Fisher B, et al. Prognostic significance of eosinophils and mast cell in rectal cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (Protocol R-01). *Human Pathol.* 1989; 20:159-63.
30. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998; 188:2357-68.
31. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol.* 1992; 148:1086-92.
32. Ghiabi M, Gallagher GT, Wong TW. Eosinophils, tissue eosinophilia, and eosinophil-derived transforming growth factor α in hamster oral carcinogenesis. *Cancer Res.* 1992; 52:389-93.
33. Todd R, Chou MY, Matossian K, Gallagher GT, Donoff RB, Wong DTW. Cellular sources of transforming growth factor- α in human oral cancer. *J Dent Res.* 1991; 70:917-23.
34. Todd R, Wong DTW. Epidermal growth factor receptor (EGFR) biology and human oral cancer. *Histol Histopathol.* 1999; 14:491-500.
35. Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods.* 1988; 220:1-17.
36. Resnick MB, Weller PF. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1993; 8:349-55.
37. Mabelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinci A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in

- head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1994; 168:494-8.
38. Shingaki S, Nomura T, Takada M, Kobayashi T, Nakajima T. The impact of extranodal spread of lympho node metastases in patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 28:279-84.
39. Curran S, Murray G. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 1999; 189: 300-8.
40. Johansson N, Kähari VM. Matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol.* 2000; 15:225-37
41. Kurahara SI, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck.* 1999; 21:627-38.
42. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999; 35:227-33.
43. Davoine AF, Sim T, Wierzbicki C, Leong L, Puttagunta T, McGaw DY, et al. Human eosinophils express granzyme B and perforin: potential role in tumour killing in oral squamous cancer. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117 (Supl): S15.

