ADRIANO PIRES CANDIDO

**COMPARAÇÃO ENTRE PRESENÇA E DISTRIBUIÇÃO DE
PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E GRADUAÇÃO
HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE DA FRONTE DE INVASÃO NO
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

São Paulo

2007

Adriano Pires Candido

Comparação entre presença e distribuição de proteínas da matriz extracelular e graduação histológica de malignidade da frente de invasão no carcinoma epidermóide de lábio

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Trierveiler Martins

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candido AP. Comparação entre presença e distribuição de proteínas da matriz extracelular e graduação histológica de malignidade a frente de invasão no carcinoma epidermóide de lábio [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2007.

São Paulo, ___/___/___

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

2)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

3)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

A Deus, que nunca falta a seus filhos nos momentos da existência.

À minha mãe, primeira orientadora da minha vida. Pelo carinho e firmeza em saber me conduzir, mostrando-me que amor, caráter e sinceridade, traduzem-se nos gestos e palavras de um espírito lúcido, conhecedor das suas potencialidades e capaz de influenciar positivamente quem esteja à sua volta. Com todo o meu amor e saudades!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Suzana Catanhede Orsini Machado de Souza pela postura e caráter ímpar e pela firmeza com que conduz as nossas atividades na Disciplina de Patologia Bucal.

À Prof^a Dr^a Marília Trierveiler Martins, pela atenção oferecida, pela oportunidade de engrandecimento e pela orientação, sobretudo por ter me ajudado a superar as dificuldades.

Aos demais professores da Disciplina de Patologia Bucal, por dividirem as suas experiências e pelos momentos de vivência acadêmica.

Ao CAPE, minha porta de entrada nesta Universidade, em especial, à Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães por tudo. Aprendi que o exemplo é uma pregação no silêncio. Isto se materializa, quando estamos trabalhando ao seu lado. Obrigado professora!

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal, pela concessão da bolsa de estudos.

À Morgana, luz que o Pai do Céu colocou no meu caminho, a fim de me ajudar a caminhar. Noiva querida e amor da minha vida. Sem você seria muito mais difícil. Obrigado pelas suas orações e as da sua mãe!

À minha irmã, batalhadora, forte e incansável na luta, que sempre pede aos céus por mim. Pela fala de encorajamento, pelo carinho e amor. Não há distâncias para quem é irmã de verdade!

A todas as funcionárias, Zilda, Neia, Nair, Bia e Patrícia. Muito obrigado pela ajuda incondicional e pelo carinho.

À Elisa pela paciência, pelas palavras de encorajamento, pelos momentos de descontração nos almoços e pela competência. Muito obrigado!

À salda Edna Toddai, pelas broncas, pelas orientações, por ter me ouvido nos momentos de tristeza, pelos cafés da manhã, pelos lanches, por preparar as festas. Agora, eu acredito que você entenda um pouco do que eu falava, pois está do outro lado da vida, no plano espiritual. Que Deus continue lhe amparando.

A todos os meus prezados colegas da turma de pós-graduação, pela oportunidade de engrandecimento conjunto.

Ao meu amigo Felipe, por tudo o que me ajudou e pela amizade verdadeira que nasce da sinceridade, do companheirismo e pelo convívio nos momentos de alegria e de tristeza. Obrigado, meu irmão! Fique sabendo que estarei vibrando por você, pedindo a Deus que lhe acompanhe sempre. Obrigado!

Ao meu amigo Sergio (Serginho!), pelas palavras de estímulo, por ter me encorajado, por ter me ajudado, sempre com atenção e firmeza. Irmão é para toda a vida. Dívidas de amizade não podem ser pagas. Esta é uma que vai ficar para a eternidade!

Candido AP. Comparação entre presença e distribuição de proteínas da matriz extracelular e graduação histológica de malignidade a frente de invasão no carcinoma epidermóide de lábio [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2007.

RESUMO

As interações entre as células neoplásicas e o estroma têm um papel central na progressão tumoral. Crescimento e invasão das neoplasias depende de modificações controladas dos componentes da matriz extracelular. A frente de invasão tem sido considerada a região mais agressiva das neoplasias malignas, pois suas células são as que apresentam a maior habilidade de invadir os tecidos adjacentes. Por essa razão, a região da frente de invasão é a área mais crucial da interface tumor-hospedeiro. O objetivo deste trabalho é investigar, através de imunoistoquímica, a expressão e distribuição das proteínas da membrana basal laminina e colágeno tipo IV e da matriz extracelular colágeno tipo III, fibronectina e tenascina, na região de frente de invasão do carcinoma epidermóide de lábio, a neoplasia maligna mais freqüente na cavidade oral. Os achados foram comparados à graduação histológica de malignidade da frente de invasão. Vinte casos de carcinoma epidermóide de lábio, todos apresentando elastose solar — que evidencia a participação da radiação ultravioleta do sol no processo — foram estudados. A graduação histológica de malignidade da frente de invasão foi feita de acordo com os critérios propostos por Bryne *et al.* (1989), usando-se cortes de 5 µm corados por hematoxilina e eosina. As reações imunoistoquímicas foram realizadas em cortes de 3 µm obtidas a partir de material fixado em formol e emblocado em parafina e usando-se o método da

estreptavidina-biotina e anticorpos apropriados. Dos 20 casos estudados, 10 foram graduados como bem diferenciados (BD), 7 moderadamente diferenciados (MD) e 3 pobremente diferenciados (PD). Tanto laminina quanto colágeno tipo IV tiveram resultados semelhantes, apresentando descontinuidade da marcação com frequência. Quase todos os casos mostraram algum grau de descontinuidade na frente de invasão para esses dois antígenos. Alguns poucos casos revelaram, inclusive, a perda total da marcação nessa área. Não foi possível relacionar-se a graduação histológica de malignidade com o grau de descontinuidade da membrana basal. Dezesete casos mostraram perda total do colágeno tipo III na região da frente de invasão. Dentre os 3 casos que apresentaram marcação para a proteína, dois eram BD e 1 MD. A fibronectina foi muito abundante em todos os casos estudados. Essa proteína estava presente em uma área espessa de marcação iniciando-se na região de membrana basal. A marcação para a tenascina foi muito variável dentre os casos e não estava relacionada com a graduação histológica de malignidade ou com a intensidade da resposta inflamatória. Em conclusão: os resultados para laminina, colágeno IV e III sugerem uma importante atividade invasiva na frente de invasão da neoplasia. Embora o padrão de expressão das proteínas estudadas estava alterada na região de frente de invasão em comparação com o epitélio normal da região, não houve correlação com o grau histológico de malignidade.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide – Frente de invasão – Lábio - Imunoistoquímica

Candido AP Comparison between presence and distribution of the extracellular matrix proteins and malignancy histological grading in the lip SCC invasive front [Dissertação de Mestrado]. São Paulo:Faculdade de Odontologia da USP;2007

ABSTRACT

Interaction between tumor cells and stroma plays a central role in cancer progression. Local growth and invasion of neoplasms depend on the controlled modification of components of the extracellular matrix. The invasive front has been considered the most aggressive part of a tumor whose cells have the greatest ability to invade surrounding tissue. Therefore, this is the most crucial area at the tumour-host interface. The aim of this study was to investigate the immunohistochemical expression and distribution of the basement membrane proteins laminin and collagen type IV, and the extracellular matrix proteins collagen type III, fibronectin and tenascin, in the invasive front region of lip SCC, the most frequent malignancy of the oral cavity, and compare the findings to the histological malignancy grading of the invasive front. Twenty cases of lip SCC, all showing solar elastosis, were studied. Histological grading of the invasive front was carried out according to the criteria proposed by Bryne et al. (1989), using 5µm sections stained with H&E. Immunohistochemistry reactions were performed in 3µm sections obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, using the streptavidin-biotin-peroxidase method and appropriate antibodies. Of the 20 cases studied, 10 were graded well-differentiated (WD), 7 moderately-differentiated (MD) and 3 poorly-differentiated (PD). Both laminin and collagen IV had similar results presenting frequent

discontinuity. Almost every case showed at least some discontinuity in the invasive front. A few cases have showed a total loss of immunostaining in the area. It was not possible to determine a correlation between histological grade and degree of basement membrane discontinuity. Seventeen cases have shown total loss of collagen III expression in the invasive front. The three cases that presented positivity were represented by 2 WD and 1 MD SCC. Fibronectin was very abundant in all cases. It was present in a thick area starting from the basement membrane. Staining for tenascin was very variable among the cases and it was not correlated to the histological grading or intensity of inflammatory response. The results for laminin, collagen IV and III suggest invasive activity in the tumoral invasive front. Although the pattern of the proteins were altered in the invasive front of lip SCC in comparison to normal lining epithelium, these changes were not correlated to histological malignancy grade.

Keywords: squamous cell carcinoma, invasive front, histological grading, extracellular matrix, basal membrane. immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1	Fotomicrografias de fragmentos de semimucosa labial da fronte de invasão de carcinomas epidermóides labiais submetidos à técnica da hematoxilina e eosina e à técnica de imunoistoquímica.....	69
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Graduação histológica de Anneroth para os vinte casos de carcinoma epidermóide labial estudados.....	51
Tabela 5.2	Expressão das proteínas laminina, colágeno IV, colágeno III, tenascina e fibronectina na frente de invasão.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEB	Carcinoma epidermóide bucal
COL	Colágeno
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FNC	Fibronectina
LAM	Laminina
PH	Potencial de Hidrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Tumor
TIS	Tumor in situ
TNC	Tenascina
TNM	Tumor - Nodo - Metástase
TRIS	Hidroximetil Amino Metano
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

cm Centímetro

KD Quilodalton

°C Centígrado

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 A gênese do carcinoma epidermóide bucal	18
2.2 Carcinoma epidermóide bucal – Epidemiologia	20
2.3 Sítios anatômicos e manifestações clínicas	23
2.4 Sistemas de graduação histológica de malignidade	25
2.5 Matriz extracelular	28
2.5.1 Colágeno IV	31
2.5.2 Laminina	32
2.5.3 Colágeno III	35
2.5.4 Fibronectina	36
2.5.5 Tenascina	38
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Pacientes e amostras teciduais	42
4.2 Microscopia de luz	43
4.3 Graduação histológica da frente de invasão	43
4.4 Técnica de imunohistoquímica	45
5 RESULTADOS	48
5.1 Microscopia de luz	48
5.2 Graduação histológica da frente de invasão	49
5.3 Imunoistoquímica	52

5.3.1 Laminina.....	52
5.3.2 Colágeno IV.....	53
5.3.3 Colágeno III.....	55
5.3.4 Fibronectina.....	55
5.3.5 Tenascina.....	56
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A grande variação morfológica, funcional e patológica dos vários tecidos é conferida, na sua maior especificidade, à matriz extracelular, que é constituída por inúmeras proteínas e polissacarídeos. Cada tecido vai conter uma quantidade de matriz, sendo abundante no tecido conjuntivo. Na junção epitélio/conjuntivo, ao redor das células musculares, dos capilares linfáticos e sanguíneos a matriz extracelular forma uma delgada camada, chamada lâmina basal, que é uma teia, ou uma treliça de macromoléculas, de vital importância para a função celular.

As interações entre as células do carcinoma e a matriz extracelular determinam, através de sinalização molecular, a superexpressão de determinada proteína ou a sua alteração, com perda de função. Estas interações acontecem, de forma muito intensa, na região denominada: Frente de Invasão, que é localizada na interface das células neoplásicas junto à lâmina basal, invadindo o tecido conjuntivo. Esta região é a que contém as células neoplásicas mais agressivas e onde as alterações moleculares são mais evidentes, podendo ser estudadas com precisão.

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas laminina, colágeno IV, fibronectina e tenascina, na frente de invasão de 20 carcinomas epidermóides de lábio, catalogados em blocos da Disciplina de Patologia e Diagnóstico Bucal da FOUSP, observando alterações que auxiliem no diagnóstico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A gênese do CEB

Sabidamente conhecida como uma doença genética, o carcinoma vai se caracterizar por alterações importantes envolvendo genes relacionados com o reparo do DNA, genes supressores de tumor e oncogenes. Fatores ambientais como o fumo, o álcool e radiação ultravioleta atuam sinergicamente a estes primários, comprometendo a atividade celular em sua divisão, diferenciação, senescência e apoptose (WILLIAMS,2000).

A fim de que uma célula maligna prolifere, os mecanismos de supressão do desenvolvimento tumoral têm que estar comprometidos. É sabidamente conhecida a função dos genes supressores de tumor. Estes genes enviam sinais químicos, restringindo a proliferação celular. Quando este mecanismo está comprometido, devido ao fato da ocorrência de mutações nestes genes, haverá aumento na proliferação; perda da coesão das proteínas da matriz; invasão local, caracterizando a frente de invasão e metástases (ARAÚJO et al., 1997; SQUARIZE;CASTILHO;PINTO JUNIOR, 2002).

Isto se confirma devido a estudos de biologia molecular sobre a matriz extracelular, relacionando o comportamento das suas proteínas alteradas, que facilitarão a movimentação de células neoplásicas complexas por sobre o mesênquima, que em última análise, facilita o surgimento de metástases (KOSMEHEL et al., 1999).

É na interação entre epitélio e mesênquima que a microecologia caracterizada pela matriz estará manifestando equilíbrio ou permitindo que as células epiteliais complexas avancem. A transição entre um epitélio normal para um carcinoma invasivo é precedido por alterações importantes no estroma tumoral, que, em carcinomas de mama, caracterizam-se pela desorganização e disrupção da membrana basal periglandular e também pela desestruturação dos hemidesmosmos, além da neovascularização o que evidencia a franca invasão do carcinoma, que em última análise é a conversão do carcinoma in situ para carcinoma invasivo (LIOTTA; KOHN, 2001).

A frente de invasão, alterando a estrutura da matriz, mostra uma influência marcante por parte das células epiteliais complexas do carcinoma, o que se caracterizará pelo grau de diferenciação histológico. A variedade do tipo de células da microecologia que compõe este sítio constituído por estroma/frente/mesênquima será caracterizada por células do sistema imune, onde poderíamos evidenciar os linfócitos e as células dendríticas; células inflamatórias, representadas pelos monócitos e os granulócitos, além de miofibroblastos e células endoteliais, envolvidos com a neovascularização. Esta abundante manifestação de tipos celulares nos faz entender o que se passa com o tecido antes e após a invasão do carcinoma, que estará degradando a matriz, tendo como principais enzimas desta degradação protéica as metaloproteinases. Os estudos de vanguarda direcionam para métodos mais eficazes na análise histológica e na característica molecular da apresentação das células do carcinoma, evidenciando um prognóstico de acordo com a manifestação mais agressiva destas células na frente de invasão (ARAÚJO et al., 1997; LEETHANAKUL, 2000; SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JUNIOR, 2002).

2.2 Carcinoma Epidermóide Bucal – Epidemiologia

O CEB é caracterizado por ser uma entidade que surge no epitélio de superfície, histologicamente caracterizado por apresentar ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação a uma morfologia escamosa (NEVILLE;DAMM;ALLEN, 2004).

As estatísticas oficiais evidenciam que os cânceres da cavidade oral representam 5% de todos os tumores malignos no mundo, chegando a 9% no Brasil. Destes, 90% são carcinomas epidermóides, sendo a sexta dentre as neoplasias que afetam o ser humano (COTRAN;KUMAR;COLLINS,2000; INCA, 2006).

Conhecidamente insidiosa, a gênese do carcinoma epidermóide bucal, tende a modificar a faixa etária da sua manifestação para menos, devido à exposição a fatores de risco como o álcool, o fumo e a radiação solar, cada vez mais cedo. Há, também, o aumento do número de cânceres de cavidade oral em mulheres que, atualmente, estão mais expostas a estes fatores, que eram predominantemente masculinos (NEVILLE; DAMM; ALLEN, 1995; SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997). Soma-se a este panorama, o fato de a expectativa de vida da população estar aumentando. O reflexo disto é que teremos um número maior de pessoas desenvolvendo alterações genéticas, modificando células e proteínas, fazendo com que todos estes fatores caracterizem a etiologia multicêntrica do CEB, levando a uma sobrevida de cinco anos para metade dos pacientes que recebem o diagnóstico, anualmente, em todo o mundo.

A estatística de 2006, segundo o Instituto Nacional do Câncer, evidenciou que o CEB fora a oitava neoplasia mais freqüente entre os homens, manifestando-se em 10.060 novos casos e a nona neoplasia mais freqüente em mulheres, manifestando-se em 3.410 novos casos (INCA, 2006).

O panorama é assustador e já se caracterizou em um problema de saúde pública, pois o índice de sobrevida para o carcinoma epidermóide bucal é menor, quando comparado com os cânceres de mama, cólon, reto, rim e pele e os pacientes que obtêm a cura sobrevivem com seqüelas estéticas e funcionais importantes (SHTUTMAN; ZHURINSKY; SIMCHA, 1995; TODD; DONOFF; WONG, 1997).

O álcool e o cigarro são fatores extrínsecos que atuam de forma sinérgica na etiopatogenia do CEB intra-oral. Além destes, temos fatores intrínsecos como má-nutrição e anemia ferropriva documentados. Todos estes fatores se associam às alterações genéticas, que são primárias (NEVILLE; DAMM; ALLEN, 1995; OGDEN E WIGHT, 1998; FRANCESCHI et al., 2000; HINDLE et al., 2000).

Porém, há que se destacar o carcinoma epidermóide de lábio e a sua etiologia que é, sabidamente, a radiação ultravioleta solar. Vivemos em um país tropical e é evidente que os efeitos da radiação ultravioleta solar estarão favorecendo o aparecimento de alterações teciduais importantes na pele e nos lábios.

Todo o conjunto de modificações teciduais que caracterizam a manifestação clínica típica de eversão do lábio inferior, sinal característico da queilite actínica, com todo o seu grau desmoplasia, deve ser encarado com mais propriedade, pois esta é uma condição pré-cancerizável (SANTOS et al., 2003).

O carcinoma epidermóide de lábio representa 25% do total de cânceres diagnosticados na cavidade oral. Estudando a sua incidência na Austrália, este autor

evidencia que a sua etiologia é a exposição crônica à radiação ultravioleta solar e que o seu diagnóstico é executado tardiamente (VENESS, 2001).

Os estudos retrospectivos sobre a incidência do carcinoma epidermóide de lábio na população mexicana, atestam que 25% dos cânceres da cavidade oral são representados pelo carcinoma epidermóide de lábio, sendo que 45.9% destes casos estavam relacionados com a exposição crônica ao sol e 51.35% estavam relacionados com a utilização de cigarro. Evidencia-se, também, a estatística de que nos Estados Unidos da América a incidência para o carcinoma epidermóide de lábio, varia entre 0.4 a 4.4 por 100.000 habitantes (KAINULAINEN et al., 1997).

A relação entre carcinoma e pigmentação também fora verificada através de estudos sobre a incidência do carcinoma epidermóide de lábio na população africana, atestando que o câncer de lábio é menor em negros e que indivíduos albinos e feodermas estão mais predispostos a desenvolverem esta patologia, relacionando a sua incidência à exposição crônica ao sol, ao consumo de álcool e à utilização de cigarro (CHIDZONGA, 2005).

É importante assinalar que a abordagem terapêutica para o carcinoma epidermóide de lábio é menos traumática e invasiva, quando relacionamos esta neoplasia com outras da cavidade oral. Isto posto, é importante verificarmos as regiões de manifestação desta entidade, envolvendo a cavidade oral e anexos.

2.3 Sítios anatômicos e manifestações clínicas

O carcinoma epidermóide bucal (CEB) é uma doença predominantemente de indivíduos acima da quarta década de vida, acometendo mais homens que mulheres, incidindo com maior prevalência respectivamente em leucodermas, feodermas e melanodermas. Alterações clínicas como o aparecimento de lesões brancas, eritroplásicas ou mistas e, mais comumente, ulcerações são sinais clínicos evidentes, além da linfadenopatia (FARIA; CARDOSO; LOYOLA, 1999; PRINCE E BAILEY, 1999; INCA, 2006). Os sítios anatômicos mais comuns são língua e soalho, quando o lábio não é considerado e os elevados índices de recorrência e metástase são prognosticadores sombrios (LEONG; MAIN; BIRT, 1995; COSTA; TODAY; ARAÚJO, 1998).

No momento do exame clínico intra-oral, vamos nos deparar com uma lesão caracterizada pela presença uma úlcera e de placas brancas, eritroplásicas ou mistas, devido ao espessamento da mucosa. Haverá um aumento desta massa celular, infiltração para os tecidos adjacentes, com necrose da porção central e irregularidade das margens da lesão, que apresentará bordas elevadas, fazendo-se confundir este aspecto com lesões que devem apresentar o diagnóstico diferencial para úlceras traumáticas crônicas, sífilis terciária, tuberculose e paracoccidiodomicose. Os carcinomas epidermóides, originados na superfície externa dos lábios, têm a sua etiopatogenia bem documentada, relacionada com a radiação solar e tem evolução mais longa e um prognóstico discretamente melhor que os CEB intra-orais (NEVILLE; DAMM; ALLEN 2004).

O CEB labial é uma lesão ulcerada, endurecida, rígida, exsudativa e com crosta, normalmente menor que 1,0 cm em seu maior eixo, quando descoberta. Tem taxa de crescimento lento, com metástases tardias, com menos de 2,0 % das metástases evidentes quando do diagnóstico, sendo a região submentoniana o sítio metastático primário mais evidente (NEVILLE; DAMM; ALLEN, 2004). Todas estas alterações teciduais acontecerão em uma região já alterada devido à queilite actínica. Isto poderia, por si só, separar esta entidade dos carcinomas intra-orais: O sítio anatômico. Porém, não há estudos propioceptivos envolvendo somente o CEB de lábio e os dados epidemiológicos contemplam somente o CEB intra-oral. A este, associa-se o CEB de lábio, que não é estudado, separadamente, tendo o seu prognóstico muito mais favorável e com resolutividade cirúrgica melhor que o restante dos carcinomas epidermóides bucais, comparando-se: o sítio anatômico, as dimensões iniciais da neoplasia no diagnóstico e o comprometimento de linfonodos (INCA, 2006).

Tumores de assoalho bucal penetram precocemente pela mucosa em direção à glândula salivar sublingual, musculatura da linha média e se estendem pela mucosa gengival e osso da mandíbula tendem a migrar para os linfonodos submentonianos. Os tumores que se situam nas superfícies laterais ou inferior da língua tendem a ficar localizados por maior período, invadindo o assoalho bucal e freio lingual. Os carcinomas de mucosa jugal invadem a musculatura e eventualmente a pele. Os tumores de gengiva rapidamente invadem o periósteo, a mucosa adjacente e o assoalho bucal. Tumores de palato duro invadem o osso subjacente e raramente os seios maxilares. Os originados do trígono retromolar infiltram a mucosa adjacente, pilar amigdaliano anterior, espaço pterigomandibular, músculo pterigóide medial e bucinador (SALOMÃO, 2003).

2.4 Sistemas de graduação histológica de malignidade

Usa-se, atualmente, o estadiamento Tumor-Nodo-Metástase, que é baseado na apresentação clínica da doença, a saber: T0 – Sem evidência de tumor primário; TIS – carcinoma “in situ”; T1 – Tumor menor ou igual a 2,0 cm; T2 – Tumor com mais de 2,0 cm até 4,0 cm; T3 – Tumores com mais de 4,0 cm e T4 – Tumores que invadem estruturas adjacentes e Tx para tumores que não podem ser avaliados; N0 – ausência de comprometimento linfonodal; N1 – Metástases em linfonodo único ipsilateral menor que 3,0 cm; N2 – metástases em linfonodo único ipsilateral maior que 3,0 cm menor que 6,0 cm, múltiplos ipsilaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6,0 cm, N2a – Metástases em linfonodo único ipsilateral maior que 3,0 cm menor que 6,0 cm; N2b – Metástases em linfonodo múltiplos ipsilaterais, nenhum maior que 6,0 cm; N2c – metástases contralaterais, nenhum maior que 6,0 cm; N3 – metástases em linfonodo único ou múltiplos maior que 6,0 cm e NX para linfonodos que não puderam ser identificados; M0 – ausência de metástase distante, M1 – Metástase distante presente e MX metástases distantes que não puderam ser identificadas (KOWALSKI et al., 1999).

Ao estadiamento TNM se associa a graduação histológica. Esta graduação pode variar de lesões bem diferenciadas, onde a queratinização é freqüente, a lesões moderadamente diferenciadas, com presença de lençóis celulares unidos por desmossomos, indo até lesões pouco diferenciadas, onde o diagnóstico histológico pode ser difícil, sendo necessário diferenciar das lesões originadas de tecidos glandulares, linfóides e mesenquimais. Esta classificação histológica é a utilizada pela Organização Mundial de Saúde e tem a sua base de

aplicação no grau de anaplasia ou diferenciação celular, utilizando-se os graus I, II e III (NEVILLE; DAMM; ALLEN, 2004).

Embora amplamente utilizada, a classificação TNM recebe muitas críticas, pois ignora características histológicas individuais das neoplasias e, acredita-se que a avaliação combinada dos aspectos histopatológicos e dos clínicos forneceria uma medida mais precisa para predizer a evolução dos casos de neoplasias malignas, contribuindo de forma fundamental para a escolha do melhor tratamento para cada paciente (ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN, 1986).

Acredita-se que Broders (1927) foi o primeiro a graduar os carcinomas de boca, com um sistema baseado na proporção de células bem-diferenciadas no todo da neoplasia. O fato da população de células dos CE de cabeça e pescoço ser altamente heterogênea mostrou-se como um fator dificultante para o bom funcionamento desse sistema e um novo sistema foi proposto por Jakobsson et al. (1973) e posteriormente modificado por Anneroth, Hansen, Silverman Jr (1986). Este sistema avalia três aspectos das células neoplásicas nas áreas menos diferenciadas (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e número de mitoses) e três aspectos relacionados à relação neoplasia-hospedeiro (padrão de invasão, estágio ou profundidade de invasão e infiltração leucocitária junto à neoplasia). Embora extensamente usado, este sistema recebeu críticas por avaliar a neoplasia como um todo e, sabendo-se que o padrão histopatológico do CE varia enormemente dentro da mesma lesão, sugeriu-se que estudar uma região mais restrita forneceria dados mais precisos (BRYNE et al., 1989).

Nesse contexto, Bryne et al. (1989) propuseram que fosse avaliada a porção mais invasiva da lesão, pois esta região concentraria as células mais agressivas da neoplasia, dando início à graduação histológica da frente de invasão

dos carcinomas de boca. A região da frente de invasão mostra o menor grau de diferenciação e o maior grau de dissociação celular quando relacionada às demais partes do carcinoma. Essa graduação segue os mesmos critérios da classificação de Anneroth, Hansen e Silverman Jr (1986), com a exceção do estágio de invasão que não é avaliado, e considera apenas as áreas mais anaplásicas dentro dos sítios mais invasivos da neoplasia para a avaliação (LUND et al., 1975).

Estudos como os de Odell et al. (1994) ajudaram corroborar com a proposta de Bryne, Jensen e Boysen (1995). Esses autores estudaram casos de CE em borda lateral da língua, comparando o estadiamento TNM e a graduação histológica na frente de invasão, demonstrando a grande utilidade da graduação histológica na frente de invasão e que há relação desta graduação histológica com metástases e recorrência tumoral, sendo este sistema de graduação muito mais preciso que o estadiamento TNM. Diversos outros trabalhos mostraram o elevado valor do prognóstico relacionado com a graduação histológica da frente de invasão (BRYNE; TRANE; DABELSTEEN, 1991; BRYNE et al., 1992). Esses estudos sugerem que a região da frente de invasão deve ser privilegiada nas avaliações da relação neoplasia/hospedeiro. Inicialmente.

Outros estudos evidenciaram o aumento da proliferação na região da frente de invasão, inclusive com significância em relação ao prognóstico dos pacientes (PIFFKÒ et al., 1996; PIFFKÒ et al., 1997). Também já foi observado que a redução da expressão da proteína p27, um inibidor de ciclinas dependente de cinases, está diretamente relacionada com uma resposta desfavorável ao tratamento e prognóstico sombrio para pacientes com câncer de boca (VENKATESAN et al., 1999; MINETA et al., 1999).

Sabe-se que nas neoplasias malignas, o hospedeiro participa da indução, seleção e expansão das células neoplásicas e que o microambiente ativado pelas células neoplásicas no hospedeiro modifica o seu comportamento proliferativo e invasivo, fazendo com que a invasão neoplásica possa ser vista como um desarranjo da disposição correta das populações celulares, causando uma violação dos limites normais dos tecidos. Desta forma, o estudo das proteínas que compõe a matriz extracelular, e também a membrana basal, um lençol de macromoléculas altamente complexo que compartimentaliza tecidos, pode trazer importante contribuição para o diagnóstico e entendimento dos processos de invasão neoplásico (ABOSEIF et al., 1999; LIOTTA e KOHN, 2001).

2.5 Matriz Extracelular

A matriz extracelular é parte constituinte de vários tecidos. Abundante no tecido conjuntivo, estará em íntimo contato com o tecido epitelial através da lâmina basal, que é uma treliça de moléculas de colágeno IV, contendo proteínas, dentre as quais a mais importante é a laminina e a proteoglicana do heparansulfato (molécula com carga negativa elevada), fator que faz atrair, anionicamente, água. Esta propriedade das proteoglicanas é que confere a característica de gel hidrofílico ao componente aquoso da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000).

Os estudos atuais conferem à matriz a propriedade de direcionar a regulação da proteólise pericelular diante da progressão do tumor, fazendo com que haja um mecanismo de hidrolização enzimática atuando na função das

metaloproteinases, em sua expressão e atividade, devido à invasão da matriz por células neoplásicas (HORNEBECK et al., 2002).

A ligação entre as proteínas da matriz e as células é realizada através de receptores de membrana celular chamadas integrinas, que são glicoproteínas alongadas com uma extremidade que se prende a componentes da matriz e uma extremidade citoplasmática, que se liga, por intermédio da proteína talina, à porção do citoesqueleto constituída de actina. São também classificadas como glicoproteínas heterodiméricas da membrana celular, constituídas de uma ligação não covalente associada em subunidades alfa e beta (THORUP et al., 1998).

O desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal envolve alterações importantes na adesividade e na interação do epitélio que invade a base da lâmina basal. Desta forma, mudanças na expressão de receptores e ligantes de membrana celular, envolvendo a relação célula-célula e célula-matriz, em sua adesão, são de vital importância na transformação de uma condição pré-maligna para a malignidade (ALBELDA, 1993; JONES et al., 1993; SYMINTON; TAKADA; CARTER, 1993).

Estudos têm mostrado que as células neoplásicas alteram os componentes da matriz, sintetizando moléculas para favorecer a angiogênese, fator importante para o crescimento do carcinoma. Trabalhos comprovaram que células neoplásicas sintetizam elastina, ocasionando maior expressividade desta proteína colagênica em cânceres de mama e gástricos. A elastina é a glicoproteína, componente principal das fibras elásticas e é abundante em estruturas como a pele, artérias e pulmões (LÁPIS; TIMA 2002).

O carcinoma epidermóide de lábio tem as suas características peculiares e as alterações da matriz devem ser estudadas na frente de invasão. Dentro deste contexto, é importante estudar as proteínas colagênicas, pois uma alteração

importante nas fibras colágenas irá acontecer, ocasionada pela radiação ultravioleta. Trata-se da elastose solar, observada na microscopia de luz através da técnica de hematoxilina-eosina, com a denominação de degeneração basofílica. As alterações provenientes das modificações neoplásicas alteram a produção do colágeno (VISSCHER; WAAL, 1998).

O colágeno faz parte de um grupo de proteínas alongadas. Suas moléculas são constituídas por três polipeptídeos dispostos em tripla hélice, que se associam ou não. Esta estruturação conformacional das moléculas de colágeno é que vai caracterizar a função dos vários tipos de tecido. Entre os vários tipos de colágenos, há um grupo importante, a saber: o colágeno tipo I, tipo II, tipo III e tipo IV. O colágeno do tipo I é produzido pelos fibroblastos, conferindo à derma, tendões, ossos e pigmentos um grau de polimerização máxima, dando a estes tecidos a propriedade de resistir a tensões. O colágeno do tipo II é produzido pelos condrócitos, conferindo às cartilagens pequena polimerização das fibrilas, dando-lhes a propriedade de resistir à pressão. O colágeno do tipo III é produzido pelas células dos músculos lisos e células reticulares, conferindo ao músculo liso, ao tecido hemocitopoiético e nervos as suas propriedades, devido à média polimerização das suas finas fibrilas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

2.5.1 Colágeno IV

Interessa-nos o colágeno do tipo IV, devido ao fato de estar relacionado à conformação da lâmina basal, sendo depositado em forma de uma malha submicroscópica, com a função de suporte, filtragem e barreira na matriz extracelular.

Sabemos que o carcinoma epidermóide de lábio tem, em sua característica multicêntrica, a sua incidência aumentada devido à exposição ao sol. O estágio anterior ao aparecimento do carcinoma, a queilite actínica, já evidencia um grau de displasia importante e comprometimento das fibras colágenas (VISSCHER; WAAL, 1998; KAUGARS et al., 1999). Isto já está documentado, faltando-nos estudar a expressão do colágeno do tipo IV, na frente de invasão do carcinoma epidermóide de lábio, a fim de compreender as alterações moleculares, verificando as alterações do epitélio modificado que avança por sobre a frente.

O carcinoma de células basais é o primeiro em incidência dos cânceres de pele no mundo e o epidermóide é o segundo. (CERNEA et al., 2005). O colágeno IV, Nakajima et al.,(1987) é a mais importante proteína da membrana basal e está relacionada, na sua expressão, com a progressão do tumor e às metástases. Isto se confirma com estudos que mostraram a degradação do colágeno IV por collagenases e outras proteínas produzidas por células neoplásicas epiteliais, correlacionando a perda da continuidade na deposição desta proteína com o prognóstico da neoplasia. (CERNEA et al., 2005).

A descontinuidade da deposição de colágeno na membrana basal fora demonstrada por Cernea et al (2005) que estudou carcinomas basocelulares e

epidermóides, mostrando a perda de continuidade da membrana como sendo um fator prognosticador de extrema importância. A isto se associa o fato de a invasão de membrana basal e a sua perda de função estar associada com uma maior agressividade e indiferenciação da neoplasia. (KAINULAINEN et al., 1997; KOPF-MAIER; FLUG 1996).

Radovic (2003) estudando alterações teciduais em cólon, evidenciou através de análise imunoistoquímica, a mudança na expressão do colágeno IV, que era substituído na membrana basal no desenvolvimento de displasia epitelial e inflamação crônica de cólon. Este autor observou interrupções focais e irregularidades na expressão desta proteína, correlacionando a sua produção nas displasias leves iguais às encontradas nas inflamações, também leves. Este autor concluiu que a manifestação de expressão do colágeno na displasia moderada e severa são agentes indicadores para o aparecimento do carcinoma de cólon, porém relaciona também a alteração desta proteína à presença somente de inflamação crônica do mesmo órgão.

2.5.2 Laminina

Após o colágeno IV, teremos, em ordem de importância e quantidade na membrana basal, a laminina, que é uma proteína constituída por três polipeptídeos, que se ligam também a este colágeno, tendo como função unir as células epiteliais à lâmina basal.

A laminina é uma proteína filamentosa de ancoragem que conecta a membrana basal aos hemidesmossomos das células (ROOS, 1984). Até o presente, 11 lamininas foram encontradas. Dentre estas, a laminina 5 é de grande importância em carcinogênese, devido ao fato de a sua síntese e deposição estar relacionada com a graduação histológica na frente de invasão de carcinomas epidermóides. Isto foi confirmado com os estudos de Kainulainen et al. (1997) que verificaram a expressão da laminina 5 na frente de invasão destas neoplasias. A diminuição da sua expressão, ocasionando a liberação do estroma tumoral para além da membrana seria o que caracterizaria a progressão do tumor e a manifestação da agressividade na frente de invasão. (KOSSMEHL et al., 1999; THORUP et al., 1997).

Em frentes de invasão de carcinomas epidermóides, a laminina pode ser visualizada no citoplasma de células complexas do carcinoma em descontinuidade com a lâmina basal e no estroma tumoral contíguo à frente. Além disto, estudos evidenciam que há ligação entre a expressão de laminina e a deposição de fibronectina no estroma tumoral que avança por sob a frente, alterando o mesênquima, a fim de que o carcinoma prolifere. Isto comprova que há um entrelaçamento muito grande entre a expressão de cada uma das proteínas da matriz. (BERNDT et al., 1998; KOSMEHL et al., 1999).

Em cânceres de mama, já foram reportadas modificações na função da laminina junto à lâmina basal, capaz de alterar a fixação de células da matriz por causa da presença de receptores em membranas de células epiteliais, que liberam proteases no interstício da matriz, promovendo a ruptura e difusão de células neoplásicas. (KOOCHKPOUR; MERZAK; PILKINGTON, 1995; IOACHIM et al., 2002).

A falha na adesão celular representa o evento inicial da invasão neoplásica e metástase. A laminina, quando perde a sua função, pode estar implicada na origem de metástases. Fülöp e Larbi (2002) relataram trabalhos evidenciando subunidades da laminina e receptores endoteliais que estariam envolvidos no processo de desregulação da adesão na frente de invasão e na membrana basal dos vasos. Estes estudos mostraram o complexo formado por elastina-laminina-receptor, como sendo a tríade de importância deste processo, referendando os achados anteriores que relacionavam a laminina com alterações nas paredes dos vasos, o que propiciaria a inclusão e migração das células neoplásicas, invadindo sítios distantes (CASTRANOVO; TARAMBOLETTI; SOBEL, 1991; LANDOWSKI; DRATZ; STARKEY, 1995; PRINCE e BAILEY, 1999).

Estudos realizados por Thorup et al. (1998) relacionou integrinas e a laminina-5, mostrando que, nas biópsias de carcinoma epidermóide bucal, a expressão das integrinas fora marcante na periferia e em células centrais de ilhas do carcinoma, provenientes da frente de invasão. A laminina se expressou alterada na base da membrana basal e excessiva no estroma. Houve uma correlação importante entre a expressão da laminina-5 e a classificação Tumor-Nodo-Metástase (TNM), mostrando que, realmente, há uma alteração importante na adesão das células epiteliais junto à lâmina basal e que isto relaciona a graduação histológica com o estágio clínico da doença (ALBELDA, 1993).

Berndt et al. (2001) observou através de análise imunoistoquímica que há síntese de laminina 5 acumulada em células complexas do estroma tumoral, em pontos descontínuos da frente e por sobre as células neoplásicas do carcinoma que invadem o mesênquima. Na atualidade, acredita-se que esta interação seja

justamente o que caracteriza a frente de invasão, na expressão das proteínas alteradas da matriz.

2.5.3 Colágeno III

Esta proteína tem a sua função relacionada com vasos, musculatura lisa, pele e em outros órgãos, tratando-se de uma proteína caracteristicamente formada por uma molécula longa e rígida.

Além das seqüelas da radiação solar, a ação das metaloproteinases e a perda da operacionalidade dos receptores integrina para o colágeno III e para as demais proteínas da matriz podem fazer com que o colágeno III tenha a sua síntese alterada na frente de invasão (JEAN, 2003).

Martines e Araújo (2004), estudando a expressão do colágeno III em cultura de fibroblastos provenientes de polpa dental e gengiva, não encontraram expressão desta proteína, evidenciando somente a presença de FN e TN, neste órgão.

Estudando a expressão desta proteína em cultura de fibroblastos provenientes de varicoses, Sansilvestri-Morel et al., (2005) observaram a diminuição da expressão desta proteína, atribuindo isto a ação das metaloproteinases, em específico, a metaloproteinase 3. A estabilidade da molécula de colágeno III fora observada, sendo detectada a sua estabilidade quando da presença de inibidores de metaloproteinases. Estes autores ainda relacionam o colágeno III e a

fibronectina, concluindo que a degradação destas proteínas teria repercussão na função dos diversos vasos.

Sendo um dos principais e o maior componente da matriz extracelular o colágeno foi estudado por Kim et al. (2005), relacionando a expressão desta proteína com a ação das integrinas que se caracterizam por serem receptores heterodiméricos celulares, encarregados com a interação célula-célula, célula-substrato de adesão, recebendo e emitindo sinais moleculares, controlando a arquitetura tissular. Estes autores afirmam que a interação colágeno-integrina tem efeito direto com a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular, além da angiogênese.

2.5.4 Fibronectina

A adesão celular é um evento complexo, envolvendo proteínas e moléculas. Entre outros componentes da matriz extracelular, vamos encontrar a fibronectina que é um dímero de 450 kD, caracterizada por ser um grupo de proteínas com a função de adesão entre as células, em outras moléculas de fibronectina e em estruturas fibrosas da matriz. Serve de ponte de união entre as células não epiteliais, promove a migração celular e a quimiotaxia monocítica, regulando o crescimento celular e a expressão dos genes (MARTINS, 1998).

Segundo Mohri, (1996) a relação da expressão da fibronectina com a motilidade seria explicada pela deposição diminuída desta proteína pela célula neoplásica, tendo como consequência uma maior movimentação destas células

alteradas e um certo grau de tracionamento molecular na matriz, a fim de que a metástase ocorra.

Estudos comparativos foram feitos com a fibronectina em sítios anatômicos diferentes da mucosa oral e em pele. A pele exibiu forte marcação na lâmina basal e na região papilar do tecido conjuntivo. Em lábio, a membrana basal foi marcada com menos intensidade que na pele. Em mucosa jugal, houve a mesma marcação que em lábio, com menos intensidade na lâmina própria. Em palato, houve forte marcação. Língua e palato foram os sítios anatômicos mais fortemente marcados (LINDE; JONSSON, 1982; MARTINS, 1998).

Os estudos de Kosmehl et al. (1996) evidenciaram que a expressão da fibronectina está relacionada com a maturação celular e com a diferenciação celular, influenciando nos processos de adesão e motilidade. Observou-se, neste trabalho, que a expressão de fibronectina fora intensa no estroma tumoral e em regiões de inflamação contíguas à frente de invasão. Estudos mostraram importantes sinais da transformação maligna, com fragmentação pericelular da fibronectina, concomitante com o aumento na sua produção no estroma peritumoral. Isto fez concluir que a fibronectina tem um papel importante na progressão da neoplasia. Da mesma forma, comparando tumores benignos de mama com adenomas malignos, observou que a fragmentação pericelular da fibronectina era um sinal de malignidade (ROBERT, 2002).

Dentro do complexo que é a sinalização protéica, as integrinas estarão ativando a fosforilação por tirosinas-kinases, com a conseqüente morte celular programada (apoptose), diferenciação, proliferação e sobrevivência. Quando em distúrbio, estas funções alteradas comprometem a matriz, ocasionando proteólises, modificando a ancoragem celular, o citoesqueleto e a sinalização protéica. A

regularização da via de sinalização molecular das ciclinas, que estará envolvida com a proliferação celular, depende, também, da sinalização das integrinas. Esta função estará alterada nas células neoplásicas e o complexo fibronectina-integrina perde a sua função, comprometendo a matriz. A consequência de toda esta alteração, na via de sinalização protéica, é que as células neoplásicas não entrarão em apoptose (AKIYAMA; NAGATA, YAMADA, 1990; HUHTALA et al., 1995; ILIC et al., 1998; LIOTTA; KOHN, 2001).

2.5.5 Tenascina

A Tenascina é uma molécula com seis cadeias longas, que possuem vários seguimentos em comum com a fibronectina. Tem uma ampla distribuição tecidual e é variável nos diversos tecidos e estágios de maturação (CHIQUET-EHRISMANN; KALLA; PEARSO, 1989).

A família das tenacinas é constituída por três tipos específicos de proteínas: TNC-R, constituinte do sistema nervoso central e periférico; TNC-X constituinte dos músculos esquelético e cardíaco e TNC-C, constituinte de vários tecidos em desenvolvimento, inclusive do SNC, mas ausente nos músculos estriados esqueléticos e cardíacos. A função desta proteína é estrutural no mesênquima e serve de moduladora para a função celular, devido ao fato de se ligar a receptores específicos da família das integrinas (CHIQUET-EHRISHMANN, 1995).

A TNC está presente no mesênquima de tecidos embrionários, sendo relacionada à indução executada por tecidos epiteliais em desenvolvimento,

principalmente em condensações como as glândulas mamárias, vibrissas e dentes. Cora-se positivamente também no rim cartilagem, osso, pulmão, parede vascular do fígado, timo, adrenais, além de encontrar-se presente na MB de diferentes epitélios de origem ecto e endodérmica (NATALI et al., 1991).

Em mama normal, a imunorreatividade da tenascina é usualmente notada ao redor dos ductos e dos ácinos. Nas alterações mamárias, apresentará marcação negativa para fibroadenomas e doenças fibrocísticas. Em carcinomas, há um aumento da imunorreatividade da tenascina, que se expressa no estroma tumoral, em comparação com a glândula mamária sadia (IOACHIM et al., 2002).

Provavelmente, a tenascina é uma molécula com funções de adesão e distribuição restrita nos tecidos (CHIQUET-EHRISMANN, 1989). O RNA mensageiro da tenascina já foi demonstrado em células endoteliais, o que indica que estas células são produtoras da molécula e a sua associação a tecidos neoplásicos já foi relatada. Natali et al. (1991) demonstraram que estágios iniciais da carcinogênese eram representados por um aumento na deposição da tenascina (NATALI et al., 1991; LEE et al., 1995; MARTINS, 1998).

Em culturas, fora observada a inibição do contato célula-célula, promoção de adesão e não espraiamento destas células cultivadas. Fora observada também ação anti-adesiva, que associando-se à atividade adesiva e de espraiamento da TNC permite a movimentação celular com a manutenção da integridade do seu citoesqueleto, durante a migração da frente de invasão. (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1989).

Os estudos evidenciam que a TNC tem a sua expressividade aumentada no estroma de neoplasias, principalmente devido ao fato de haver uma necessidade de movimentação da neoplasia por sobre a frente. A alteração da permeabilidade,

facilitando a migração das células epiteliais complexas por sobre a matriz, justificariam o aumento da expressão desta proteína.

3 PROPOSIÇÃO

Estudar a expressão imunoistoquímica das proteínas da matriz extracelular colágeno IV, colágeno III, laminina, fibronectina, e tenascina em carcinomas epidermóides de lábio.

Analisar o comportamento molecular destas proteínas em frente de invasão.

Observar alterações celulares que auxiliem no diagnóstico, direcionando para sinais objetivos de expressão protéica, através da técnica de imunoistoquímica, a fim de analisar o grau de agressividade do carcinoma epidermóide de lábio em frente de invasão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes e amostras teciduais

Este estudo teve por meta estudar casos de carcinoma epidermóide (CE) de lábio inferior relacionados à radiação solar. O material foi selecionado do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo, que se encontrava fixado em formol e embocado em parafina. Foram utilizados 20 casos de CE de lábio, amostras com tamanho ideal para confirmação dos achados — que foram analisados qualitativamente — dentre os diferentes graus histológicos de malignidade que puderam ser encontrados. Só foram estudados casos de CE de lábio nos quais foi possível detectar a alteração basofílica do colágeno, que demonstrassem a absorção de radiação UV na região, e que apresentassem a lesão como um todo para que a frente de invasão pudesse ser avaliada.

Para determinação do padrão das proteínas estudadas na região, foram selecionados nos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica 3 espécimes que continham mucosa da região labial e sem comprometimento neoplásico.

4.2 Microscopia de luz

Para a análise morfológica dos casos estudados, foram utilizados cortes de 5 µm estendidos sobre lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina e eosina.

4.3 Graduação histológica da frente de invasão

Esta avaliação foi feita nas lâminas coradas por HE e foi executada por dois observadores independentes (aluno e orientadora) e os dados foram confrontados e discutidos em conjunto posteriormente. A graduação foi feita segundo os critérios propostos por Bryne et al., (1989), a saber:

- Grau de queratinização: 1 (altamente queratinizado); 2 (moderadamente queratinizado); 3 (queratinização mínima); 4 (ausência de queratinização).
- Pleomorfismo nuclear: 1 (pouco pleomorfismo nuclear – mais de 75% das células maduras); 2 (pleomorfismo nuclear moderadamente abundante – 50 a 75% das células maduras); 3 (pleomorfismo nuclear abundante – 25 a 50% das células maduras); 4 pleomorfismo nuclear extremo (menos de 25% das células maduras).
- Número de mitoses (aumento de 400X): 1 (até 1 mitose); 2 (de 2 a 3 mitoses); 3 (de 4 a 5 mitoses); 4 (mais de 5 mitoses por campo).

- Padrão de invasão: 1 (bordas infiltrativas bem delimitadas, empurrando); 2 (fitas, bandas ou cordões sólidos); 3 (pequenos grupos de cordões celulares); 4 (marcada dissociação celular que estão em pequenos grupos de menos de 15 células, ou isoladas).
- Resposta do hospedeiro: 1 (intensa); 2 (moderada); 3 (discreta); 4 (nenhuma resposta inflamatória).

Os escores recebidos em cada aspecto analisado foram somados e o caso recebeu um escore geral que representou a graduação histológica de malignidade da sua frente de invasão. De acordo com o escore recebido, os casos foram divididos em: bem diferenciados (5 a 10), moderadamente diferenciados (11 a 13) e pobremente diferenciados (14 a 20).

Para este estudo, foi utilizado material obtido de biópsias de 20 lesões bucais, diagnosticadas como carcinoma epidermóide de lábio. Todo o material faz parte do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os diagnósticos histopatológicos das lesões foram realizados em cortes corados por hematoxilina-eosina e observados através de microscopia de luz.

Os blocos catalogados foram submetidos à análise imuno-histoquímica.

4.4 Técnica de Imunoistoquímica

Para a realização das reações imuno-histoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase e os cortes submetidos aos anticorpos anti: laminina, colágeno IV, colágeno III, fibronectina e tenascina.

Foram preparados, a partir do material parafinado emblocado em parafina, cortes de 2 a 3 micrômetros de espessura, estendidos em lâminas de vibro previamente tratadas pelo 3-aminopropiltietoxisilano.

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, o primeiro a 60° C, por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente, por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através da incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos.

Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica.

Para os anticorpos anti-colágeno IV, anti-colágeno III, anti-fibronectina e anti-laminina, os cortes foram tratados por digestão enzimática por pepsina a 1% durante 60 minutos em estufa a 37 °C. Para a tenascina, o tratamento foi o mesmo, porém em uma diluição de 0,4%.

Após os tratamentos, os cortes foram novamente lavados em água corrente, passaram por água destilada e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, que foi realizado pela incubação em dois banhos, de 5 minutos cada, em uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

Repetida a lavagem em água corrente e a passagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução de TRIS pH 7,4, a solução tampão da reação, em três banhos de 5 minutos cada, seguindo-se a incubação do anticorpo primário. A diluição do soro primário foi feita em TRIS acrescido de albumina bovina.

Todos os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de três banhos em TRIS pH 7,4, cada um de cinco minutos.

Após a incubação do anticorpo primário, seguiu-se a incubação do anticorpo de ligação, diluído em TRIS, pH 7,4, em uma diluição de 1:150 por 30 minutos a temperatura ambiente. O anticorpo utilizado foi o anti-soro do animal em que se produziu o anticorpo primário. Para esta etapa, utilizou-se o kit DUET da DAKO (K-492).

Seguiu-se a incubação do complexo terciário, formado pela estreptavidina, biotina e enzima peroxidase. O diluente também foi o TRIS pH 7,4. A incubação teve duração de 30 minutos e foi realizada em temperatura ambiente.

A revelação da reação foi feita pela diaminobenzidina (DAB), diluída em TRIS, pH 7,4, e ativada por 600 microlitros de peróxido de hidrogênio a 6%, em câmara escura, durante 3 minutos.

Após nova lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Meyer e a seguir desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados em resina para microscopia e examinados em microscópio de luz.

Como controle positivo das reações, foram usados cortes contendo membrana basal de fragmentos de mucosa, para o colágeno IV e a laminina; tecido conjuntivo da lâmina própria para colágeno III e fibronectina; e tecido de reparação

para a tenascina. O controle negativo das reações foi feito pela omissão da incubação do anticorpo primário.

5 RESULTADOS

5.1 Microscopia de luz

Os 20 casos de carcinoma epidermóide de lábio (CEL) estudados apresentaram características histopatológicas comuns que caracterizaram sua natureza. Eram representados por fragmento de semimucosa labial exibindo no interior da lâmina própria células epiteliais neoplásicas arranjadas em cordões e ilhotas, que por vezes apresentavam-se em continuidade com o epitélio de revestimento. As células neoplásicas eram poliédricas grandes, com citoplasma abundante, núcleos grandes e claros de formato oval ou arredondado e exibindo nucléolos centrais. As alterações típicas da neoplasia mais evidentes eram pleomorfismo em graus variados, aumento da proporção núcleo/citoplasma, hiperchromatismo nuclear e evidênciação nucleolar. As mitoses estavam aumentadas e eram, com frequência, atípicas. Muitas vezes era possível notar-se no interior das ilhotas neoplásicas a formação de pérolas córneas.

A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo denso apresentando infiltrado inflamatório caracteristicamente mononuclear. A quantidade de células inflamatórias variou dentre os casos mas foi, de maneira geral, abundante, conforme pode ser observado na Tabela 5.1. A degeneração basofílica do colágeno e das fibras elásticas pode ser evidenciada em todos os casos estudados, demonstrando a ação da radiação solar sobre esses tecidos.

5.2 Graduação histológica da frente de invasão

Dos vinte casos selecionados, 10 foram graduados histologicamente como bem diferenciados (BD). Desses, 3 mostraram-se altamente queratinizados, 6 moderadamente queratinizados e apenas 1 mostrou-se minimamente queratinizado. Com relação ao pleomorfismo celular, 4 casos mostraram mais de 75% de suas células maduras e os outros 6 apresentaram de 50 a 75% de suas células maduras. Em metade dos casos apenas 1 mitose foi encontrada por campo em aumento de 400X. Os outros 5 casos apresentaram de 2 a 3 mitoses por campo. O padrão de invasão se caracterizou por 2 casos apresentando bordas infiltrativas bem delimitas, empurrando o mesênquima; 7 casos exibindo cordões sólidos, fitas ou bandas como forma de invasão; e apenas 1 caso exibiu padrão de invasão em pequenos grupos de cordões celulares. A inflamação na região da frente de invasão era intensa em 6 casos do grupo BD e moderada nos outros 4 casos.

Sete casos foram graduados como moderadamente diferenciados (MD). Dentre os sete casos, 1 mostrou a região de frente de invasão altamente queratinizada, 3 mostraram moderadamente queratinizada, 2 apresentaram queratinização mínima e apenas 1 caso teve ausência de queratinização. Quanto ao pleomorfismo celular, 2 casos apresentaram entre 50 e 75% das células maduras e os demais 5 exibiram pleomorfismo abundante, com 25 a 50% de suas células maduras apenas. O número de mitoses por campo em 400 aumentos foi de até uma em 1 caso, de 2 a 3 em 3 casos, e de 4 a 5 em outros 3 casos. O padrão de invasão em fitas, bandas ou cordões sólidos foi visto em 2 casos, mas o padrão predominante, visto nos outros 5 casos, foi de invasão em pequenos grupos de

cordões celulares. A inflamação na região da frente de invasão foi abundante em 5 casos e moderada em apenas 2.

Da amostra estudada, 3 casos foram graduados como pobremente diferenciados (PD). Os três casos apresentaram ausência de queratinização na frente de invasão, 2 casos apresentaram abundante pleomorfismo (de 25 a 50% das células maduras) e 1 caso exibiu pleomorfismo extremo, com menos de 25% de suas células maduras. Com relação ao número de mitoses encontradas na região de frente de invasão em aumento de 400 vezes cada um dos casos apresentou um valor, até uma, de 2 a 3 e de 4 a 5 mitoses. O padrão de invasão também variou nos três casos, sendo padrão de fitas, bandas ou cordões sólidos em um caso, pequenos grupos de cordões celulares em outro e marcada dissociação celular no terceiro. O infiltrado inflamatório na região da frente de invasão foi intenso em um caso, moderado em outro e discreto no último caso deste grupo.

Os escores para todos os casos e itens estudados podem ser vistos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1—Graduação histológica de malignidade da frente de invasão dos casos de carcinoma epidermóide de lábio

Nº do Caso	Queratinização	Pleomorfismo	Mitoses	Invasão	Inflamação	Total	Graduação
Caso 1	1	1	1	2	1	6	Bem
Caso 2	1	1	1	1	2	6	Bem
Caso 3	1	2	2	2	1	8	Bem
Caso 4	2	1	2	2	1	8	Bem
Caso 5	2	2	1	2	1	8	Bem
Caso 6	3	1	1	1	2	8	Bem
Caso 7	2	2	2	2	1	9	Bem
Caso 8	2	2	1	3	1	9	Bem
Caso 9	2	2	2	2	2	10	Bem
Caso 10	2	2	2	2	2	10	Bem
Caso 11	1	3	3	3	1	11	Moderadamente
Caso 12	2	3	2	3	1	11	Moderadamente
Caso 13	3	2	2	3	1	11	Moderadamente
Caso 14	4	3	1	2	1	11	Moderadamente
Caso 15	2	3	2	2	2	11	Moderadamente
Caso 16	2	2	3	3	2	12	Moderadamente
Caso 17	3	3	3	3	1	13	Moderadamente
Caso 18	4	4	2	2	2	14	Pobrememente
Caso 19	4	3	1	3	3	14	Pobrememente
Caso 20	4	3	3	4	1	15	Pobrememente

5.3 Imunoistoquímica

A presença e distribuição de cada uma das 5 proteínas da matriz extracelular estudadas neste trabalho — laminina, colágeno IV, colágeno III, fibronectina e tenascina — foi analisada isoladamente para cada um dos casos, e apenas na região da frente de invasão. Cabe aqui ressaltar que os casos negativos na região da frente de invasão todos tiveram controle interno positivos.

Os resultados para cada uma das proteínas serão exibidos a seguir:

5.3.1 Laminina

A laminina apresentou-se como uma linha, de uma maneira geral fina, depositada na região de membrana basal, tanto do epitélio de superfície adjacente ao carcinoma quanto ao redor das ilhotas neoplásicas.

Neste trabalho foi avaliado o grau de descontinuidade da marcação na região da frente de invasão. Conforme pode ser visto na Tabela 5.2, a perda de marcação imunoistoquímica na região da frente de invasão foi graduada em pouca (–), moderada (– –) ou muita perda (– – –), o que significa que quase toda a superfície da frente de invasão foi negativa para a laminina. Com exceção de um caso, de graduação MD, os outros 19 tiveram algum grau de descontinuidade na deposição, embora nenhum caso tenha sido totalmente negativo para a laminina na região de frente de invasão.

Dentre os 10 casos BD, 2 tiveram pouca perda de continuidade, 3 tiveram moderada e 5 apresentaram muita perda de continuidade na expressão imunohistoquímica da laminina.

Para os 7 casos MD, além do caso já mencionado que não apresentou perda de continuidade na marcação para a laminina, 1 caso apresentou pouca perda, 2 apresentaram moderada e os três restantes apresentaram a muitas áreas de perda de continuidade.

Para os 3 casos de CEL que receberam graduação PD, 2 casos apresentaram pouca perda de continuidade e um apresentou moderada.

Quatro casos, sendo dois BD e dois MD, apresentaram células na região da frente de invasão exibindo seus citoplasmas positivos para a laminina. Essas células estavam normalmente na camada de células em contato com a membrana basal.

5.3.2 Colágeno IV

Assim como a laminina, o colágeno IV apresentou-se como uma linha fina na região de membrana basal. Caracteristicamente a coloração imunohistoquímica para o colágeno IV foi mais fraca que para a laminina.

Também foi avaliado o grau de descontinuidade da marcação na região de frente de invasão. É importante ressaltar que todos os casos tinham controles positivos internos. Um caso, graduado como PD, apresentou integridade da linha de marcação de colágeno IV em toda a frente de invasão. Dentre os demais, todos

tiveram algum grau de perda de continuidade e 4 casos foram totalmente negativos para o colágeno IV na região da frente de invasão.

Os resultados para os 10 casos graduados como BD foram: 2 casos tiveram pouca perda de continuidade, 2 tiveram moderada, 3 tiveram muitas áreas de descontinuidade e os 3 restantes não tiveram marcação para o colágeno IV na área da frente de invasão.

Dentre os 7 casos MD, 2 tiveram poucas áreas de descontinuidade, e os demais, em número de 4, apresentaram muitas áreas de descontinuidade.

Cada um dos 3 casos graduados como PD tiveram resultados diferentes, sendo que um foi totalmente positivo para o colágeno IV na frente de invasão, outro teve muitas áreas de descontinuidade e o último foi totalmente negativo para a proteína.

Comparando-se os achados da imunoistoquímica para laminina e colágeno IV, ambos constituintes da membrana basal pode-se fazer algumas correspondências. Foi coincidente em 5 casos de BD e 2 casos do MD e semelhante (variação de apenas um grau na avaliação) em 4 casos de BD e 2 casos de MD. Para o grupo PD apenas o caso que foi totalmente positivo para o colágeno IV teve semelhança com o resultado para laminina que foi poucas áreas de descontinuidade. Os demais não tiveram semelhança. Para melhor avaliação desses achados os mesmos estão expressos na Tabela 5.1.

5.3.3 Colágeno III

A marcação do colágeno III foi em padrão fibrilar e difusa por toda a matriz extracelular. Na região de frente de invasão a maioria dos casos estudados revelou ausência de marcação junto ao limite das ilhotas neoplásicas do CEL.

Dos 10 casos graduados como BD, 8 foram negativos para o colágeno III na região de frente de invasão. Um caso revelou moderada marcação e outro intensa marcação nessa região, mas ambos apresentaram regiões de descontinuidade da marcação.

Dentre os 7 casos graduados como MD, 5 foram totalmente negativos na região de frente de invasão, um teve algumas áreas de positividade e o outro mostrou marcação moderada, também ambos com áreas de descontinuidade.

Os 3 casos graduados como PD foram totalmente negativos para a proteína colágeno III na região da frente de invasão.

5.3.4 Fibronectina

A fibronectina foi uma molécula amplamente distribuída e bastante abundante em todos os espécimes estudados. De um modo geral, a fibronectina se distribuiu por todo o tecido conjuntivo dos espécimes depositando-se de forma fibrilar. Apenas 3 casos apresentaram marcação moderada — um de cada grupo na graduação — e os demais foram considerados todos como tendo marcação intensa.

5.3.5 Tenascina

A marcação para a tenascina da região da frente de invasão dos casos estudados foi bastante variável. De um modo geral, esta proteína mostrava deposição junto à região da membrana basal e a espessura da área marcada variou dentre os casos.

Para os casos classificados como BD foram observados 6 casos nos quais a marcação para a tenascina foi abundante, 1 no qual foi moderada e 2 nos quais foi fraca. Em um caso a tenascina estava ausente na região da frente de invasão.

Nos sete casos classificados como MD, quatro tiveram marcação abundante, um moderado e os outros dois fraca.

Dos três casos que receberam classificação PD um apresentou expressão abundante da tenascina, um fraca e o último foi negativo para a proteínas na região da frente de invasão.

Como a tenascina tem sido sempre relacionada ao processo inflamatório foi também observada a relação entre a presença da proteína e a quantidade de infiltrado sem que nenhum padrão pudesse ser notado. Dos 12 casos com inflamação abundante, sete tiveram expressão abundante da proteína tenascina, um moderada, três fraca e um foi negativo para a proteína na região de frente de invasão. Com relação aos sete casos que apresentaram infiltrado inflamatório moderado, quatro tiveram marcação abundante para a tenascina, um moderada, um fraca e um foi negativo

para a proteína. O único caso que teve o infiltrado inflamatório graduado como pouco apresentou também pouca marcação para a tenascina na área estudada.

Tabela 5.2 – Expressão das proteínas laminina, colágeno IV, colágeno III, tenascina e fibronectina em frente de invasão

Nº do Caso	Graduação	Laminina	Col IV	Col III	Fibronectina	Tenascina
Caso 1	Bem	--	--	-	+++	+++
Caso 2	Bem	---	0	-	+++	-
Caso 3	Bem	--	-	-	+++	+
Caso 4	Bem	---	---	-	+++	+++
Caso 5	Bem	---	0	-	+++	+++
Caso 6	Bem	--	0	++	+++	+++
Caso 7	Bem	---	---	-	++	+++
Caso 8	Bem	-	--	-	+++	+
Caso 9	Bem	-	-	+++	+++	+
Caso 10	Bem	---	---	-	+++	++
Caso 11	Moderadamente	+	-	++	+++	+++
Caso 12	Moderadamente	-	---	-	++	+++
Caso 13	Moderadamente	---	---	-	+++	+++
Caso 14	Moderadamente	---	-	-	+++	++
Caso 15	Moderadamente	---	---	+	+++	+++
Caso 16	Moderadamente	--	---	-	+++	+
Caso 17	Moderadamente	--	-	-	+++	+++
Caso 18	Pobremente	--	0	-	+++	+++
Caso 19	Pobremente	-	---	-	++	-
Caso 20	Pobremente	-	+	-	+++	+

Legenda

Col IV: colágeno IV, Col III: colágeno III,

(-) Pouca perda; (--) Perda moderada; (---)Perda Abundante; (0) Ausência de expressão

(+) Positividade fraca; (++) Positividade moderada; (+++)Positividade intensa

6 DISCUSSÃO

Por um longo período, apenas as células neoplásicas foram o foco de interesse das pesquisas em câncer, enquanto considerava-se que o estroma não tinha nenhum significado biológico ou clínico realmente importante. Hoje em dia está claro que as células do estroma, assim como seus produtos exercem um papel fundamental no fenótipo das células do câncer (IOACHIM et al., 2002).

A progressão do carcinoma é um evento que está relacionado com a ruptura do equilíbrio existente entre os fenômenos moleculares da matriz, que atestam para a não existência de apoptose das células epiteliais neoplásicas e para a dissolução das suas proteínas, devido à ação das metaloproteinases, que são enzimas zinco-dependentes, pouco expressas em tecidos normais e substancialmente aumentadas na maioria das neoplasias malignas, em especial as collagenases e gelatinases, que estarão atuando degradando respectivamente a matriz e a membrana basal, favorecendo o avanço da frente. (LIOTTA; KOHN, 2001; VISSE; NAGASE, 2003).

Uma quantidade considerável de evidências revela que a região da frente de invasão de um carcinoma é a que contém informações morfológicas de importância maior do que em qualquer outra região dessas lesões (BRYNE et al., 1989).

Na frente de invasão ocorrem uma série de eventos importantes para a progressão do carcinoma, entre os quais pode-se destacar: a alteração da adesão molecular, caracterizando as várias vias de sinalização protéica; a secreção de enzimas proteolíticas, que estariam degradando as proteínas da membrana basal,

alterando a síntese das demais proteínas da matriz e modificando a citoarquitetura do mesênquima; a proliferação de células endoteliais e miofibroblastos, que estão relacionados com a angiogênese e o recrutamento de células inflamatórias. (BRYNE, 1998; DE WEVER; MAREEL, 2005; KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003, KYZAS, STEFANOOU, AGNANTIS, 2004).

Em carcinomas existe uma interação dinâmica na interface neoplasia/estroma mesenquimal, e considera-se a membrana basal como uma barreira protetora contra a infiltração inicial dos tecidos pelas células malignas. A membrana basal é um tipo especializado de matriz extracelular que compartimentaliza tecidos de naturezas diferentes. Os principais componentes da membrana basal são a laminina e colágeno IV. Após os eventos genéticos ocorridos no epitélio, haverá um desequilíbrio na relação entre a proliferação celular epitelial e o tecido conjuntivo, o que é mediado pela membrana basal, que estará sendo alterada em sua conformação e propriedades, fazendo com que a microecologia da matriz extracelular se altere, favorecendo a diferenciação e a proliferação das células epiteliais neoplásicas. Esta alteração na microecologia da matriz é o que caracteriza a modificação do padrão de carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo (LIOTTA; KOHN, 2001).

Neste estudo a análise da expressão da laminina foi direcionada para a perda da sua continuidade ao longo da membrana basal. Em quase todos os vinte casos, houve algum grau de perda de continuidade da marcação para a laminina, mostrando que, para que haja a invasão das células do carcinoma, é necessário que a membrana tenha a sua conformação alterada, o que em última análise determina a perda da sua função de barreira. Observou-se também que 50% dos casos com perda de continuidade da marcação para laminina foram classificados como bem

diferenciados e, que dentre esses, a metade (10 casos) caracterizou-se por apresentar muita perda de continuidade na expressão da laminina. Dos 7 casos classificados com moderadamente diferenciados, 3 apresentaram muita perda de continuidade da laminina e para os três classificados como pobremente diferenciado, somente 1 apresentou muita perda de continuidade da laminina, perfazendo um total de 9 casos com muita perda de continuidade da expressão desta proteína, em todo o grupo dos 20 casos estudados.

O grau de diferenciação do carcinoma atesta o seguimento e curso da doença. Nesse aspecto, os carcinomas classificados como bem diferenciados crescem mais lentamente e metastatizam tardiamente. Os que se apresentam mais celulares e com núcleos com pouca ou nenhuma produção de queratina, podem oferecer dificuldade para serem relacionados como provenientes do epitélio, crescendo mais rápido e metastatizando logo, recebendo a graduação pobremente diferenciado. Os graduados como moderadamente diferenciados estariam entre os dois primeiros relacionados. Neste entendimento, a manifestação da muita perda de continuidade da expressão da laminina para 50% dos casos estudados e classificados como bem diferenciados, foi um dado importante. Isto poderia estar relacionado com as propriedades da laminina, destacando-se a função de proteína de ancoragem, conectando a base da membrana basal aos hemidesmosmosos, que estaria alterada. Estes casos poderiam refletir que mesmo invadindo mais lentamente os tecidos adjacentes, as células epiteliais neoplásicas de um carcinoma bem diferenciado, tendem a alterar de forma importante a membrana basal na frente de invasão. Em contrapartida, os três casos classificados como pobremente diferenciados, tiveram uma expressão desta proteína que não pode ser relacionada com a graduação histológica, já que estes casos são classificados como os mais

agressivos, possuindo as células neoplásicas com maior poder de alterar a membrana basal, tendo apresentado pouca e moderada expressão desta proteína. Entre os 7 casos graduados histologicamente como moderados, um apresentou expressão positiva da laminina ao longo da membrana basal e expressando pouco colágeno IV na mesma região. Os outros 6, mantiveram o padrão de expressão entre pouca, moderada e abundante perda de continuidade tanto da laminina quanto do colágeno IV ao longo da membrana, não apresentando um padrão de relação desses achados com a graduação histológica. (BERNDT et al., 2001; ALTHOLLAND et al., 2005).

Analizando-se a expressão da laminina em carcinomas epidermóides orais, outros autores concluem que esta proteína está expressa de maneira difusa na frente de invasão e em metástases de linfonodos. Esta forma de expressão difusa, assinalaria que a síntese de laminina estaria alterada na membrana basal e se caracterizaria por perda da continuidade na membrana e pela deposição desta proteína no citoplasma de células epiteliais complexas, o que se evidenciaria pela infiltração do carcinoma por sobre o mesênquima. Isto foi verificado, nos casos estudados, devido à presença de ilhas de carcinoma que invadiam o tecido conjuntivo e que, em alguns sítios de observação, não apresentavam expressão da laminina, sendo que, em outros sítios contíguos, a expressão desta proteína era verificada de forma difusa. (KAINUINEM et al., 1997).

Poderíamos inferir que estas características estejam envolvidas com os sinais moleculares emitidos pelas células alteradas do carcinoma, e que estes sinais moleculares teriam um efeito destruidor das propriedades da membrana basal o que se pode verificar pela perda da continuidade da expressão desta proteína, o que facilitaria a proliferação e a motilidade das células epiteliais neoplásicas para além

da membrana, fazendo desencadear as demais alterações na matriz. (FÜLÖP; LARBI, 2002)..

Estudos mostraram que há continuidade na deposição de laminina e de colágeno IV na membrana basal em pele normal e em regiões de moderada displasia. Analisando-se a pele normal, a laminina e o colágeno IV estão expressos de maneira contínua, na superfície basal e lateral das células da camada basal, mostrando que não há alteração na polarização das células epiteliais da membrana basal na epiderme sadia. Isto pode ser verificado nos casos estudados, em que a deposição de laminina e de colágeno IV esteve presente no epitélio labial livre de carcinoma (KÖPF-MAIER; FLUG, 1996).

Outros estudos foram executados, analisando o comportamento celular na frente de invasão de carcinomas epidermóides orais, confirmando que a deposição de laminina e de colágeno IV está expressa de forma difusa na frente de invasão, além de evidenciar que as células complexas do carcinoma, seriam as células epiteliais neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo, expressando estas proteínas no seu citoplasma. Esta perda de continuidade foi verificada, também, para o colágeno IV, pois a continuidade da expressão desta proteína estaria implicada na conseqüente manutenção da integridade da membrana, pois segundo a literatura, a deposição se alterada devido ao aumento de collagenase tipo IV que, em displasias epiteliais e carcinomas epidermóides, está aumentada, favorecendo a desestruturação desta proteína, na membrana e diminuindo a sua expressão na frente de invasão, fato que foi observado nos casos estudados. Porém, para os casos classificados como pobremente diferenciados, houve expressão positiva do colágeno ao longo da membrana basal para um dos casos, expressão negativa para outro caso e expressão moderada para um caso, atestando que não houve um

padrão de expressão desta proteína relacionado com a graduação histológica de malignidade, já que para os 10 casos classificados como bem diferenciados, com frentes de invasão menos agressivos, houve 3 casos sem expressão desta proteína e 3 casos com muitas áreas de perda de expressão na membrana basal, lembrando-se que para todos os 10 casos desta graduação houve perda de expressão, porém não sendo possível relacionar com um padrão de graduação de malignidade. (CASTRANOVO; TARABOTELLI; SOBEL, 1991; KÖPF-MAIER; FLUG, 1996; BERNDT et al., 2001).

O colágeno tipo III e o tipo I são os maiores componentes estruturais da matriz extracelular da pele, do tecido cardíaco e do tecido vascular, mantendo a sua integridade estrutural através de interações moleculares que são integrina-dependentes. As integrinas são as responsáveis pela interação entre as células e os componentes da matriz e se caracterizam por serem proteínas transmembrana. Estas interações entre colágeno e integrinas, estão envolvidas com os eventos relacionados com a adesão, proliferação, migração, diferenciação, angiogênese e agregação plaquetária (DYCE et al., 2002).

Nos casos estudados, quase a totalidade revelou ausência de expressão do colágeno III na região de frente de invasão.

Entre os casos estudados, somente dois graduados como bem diferenciados e dois graduados como moderadamente diferenciados expressaram positivamente o colágeno III na região da frente de invasão, porém todos descontinuamente e de maneira difusa, fazendo entender que há realmente uma desorganização da matriz colagênica, nesta região. Todos os outros 16 não expressaram esta proteína na frente de invasão (KIM et al., 2005).

A diferenciação epitelial, que ocorre durante a progressão do carcinoma, tem efeitos sobre os fibroblastos como já foi mostrado em estudos, *in vitro*, comprometendo a síntese do colágeno. Some-se a isso a ação das collagenases, evento que tem o seu curso subordinado à progressão do carcinoma, pode-se verificar a expressão diminuída do colágeno III. (AMANO et al., 2001; COSTEA; JOHANNESSEN, 2005).

Há uma relação entre a expressão aumentada da tenascina e da fibronectina e a presença de alterações displásicas em carcinomas orais. Estudos foram executados com usuários de rapé e fumantes de tabaco, evidenciando um aumento da expressão dessas proteínas no tecido conjuntivo próximo ao epitélio não neoplásico, alterado pelo rapé. Analisando-se as alterações provenientes do epitélio bucal de fumantes de tabaco, observa-se uma expressão mais intensa da tenascina e da fibronectina nas áreas mais infiltradas pelas células inflamatórias, fazendo entender que a inflamação exerce uma ação importante na expressão destas proteínas.

Todos os casos desta amostra apresentavam algum grau de inflamação e o que se pode observar é que em somente dois casos não se observou expressão da tenascina. Esses dois casos receberam o mesmo escore para inflamação, e foram graduados histologicamente como bem e pobremente diferenciados. Além disso, expressaram de forma intensa a fibronectina (ROJAS et al., 2005).

A migração das células epiteliais neoplásicas tem que ter uma facilitação para a sua movimentação e esta situação poderia ser proporcionada devido à ação da tenascina e da sua interação com a fibronectina. Além disto, os estudos já evidenciaram que as células inflamatórias promovem a lise do colágeno e

as fibras colágenas remanescentes, de permeio às células inflamatórias e associadas à tenascina, poderiam conferir um aspecto característico de rede para a região da frente, como foi verificado neste estudo (MACKIE, 1997; SAARIALHO-KERE et al.,2005).

Analisando-se mais detalhadamente a fibronectina, observou-se que a expressão desta proteína foi marcante para todos os 20 casos estudados nesta amostra.

A fibronectina está envolvida com a adesão e expansão celular, além de estar relacionada com a neovascularização, estimulando as células endoteliais a migrarem. Além disto há estudos relacionando a interação entre integrinas e a fibronectina, evidenciando que os receptores integrina para fibronectina estão aumentados em neoplasias epiteliais. Isso mostra que a matriz extracelular tem um papel facilitador da motilidade das células neoplásicas (MOHRI 1996; KYZAS; STEFANNOU; AGNANTIS, 2004). Outros autores já observaram o aumento da expressão da fibronectina em carcinomas epidermóides (KOSMEHEL et al.,1999; DE WEVER; MERREEL, 2002).

Dentre as propriedades da fibronectina, como já salientamos, poderíamos destacar a adesividade celular e seria justamente esta capacidade que permitiria a livre propagação das células neoplásicas, o que já foi estudado por outros autores, verificando-se a expressão da fibronectina em tecido oral normal e em carcinomas orais, onde se observa aumento importante na expressão desta proteína na região da frente de invasão, além da expressão estar relacionada também com a característica do infiltrado inflamatório. Nos casos estudados nesta amostra, todos expressaram positivamente esta proteína, independentemente do grau de inflamação. A análise da expressão desta proteína para os 20 casos, poderia sugerir

que o seu aumento na matriz, favoreceria a propagação das células do carcinoma. Além disto, observou-se em alguns dos casos estudados, a expressão de fibronectina no citoplasma de células epiteliais neoplásicas no estroma tumoral e na membrana basal. Isto poderia estar relacionado com a facilidade que esta proteína ofereceria às células epiteliais neoplásicas de se arrastarem por sobre o conjuntivo, servindo de caminho para a propagação do carcinoma (KOSMEHL et al., 1999; ZIDAR et al., 2001; LYONS, 2001).

Comparando tumores benignos de mama e adenomas malignos, atesta-se que, nas lesões benignas não existe lise peritumoral, que é progressiva nas lesões malignas, que se comportam com deposição peritumoral de fibronectina, ao redor do estroma fibroso. A reação da matriz, expressando fibronectina, estaria relacionada com o envolvimento de miofibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias. Outros achados analisaram a expressão desta proteína em carcinomas larígeos e ectocervicais, através da técnica de hibridização *in situ*, sendo conclusivo ao detectar fibronectina no estroma peritumoral destas lesões, atestando que a sua expressão diminui de acordo com o grau de destruição do estroma, ou seja: a expressão da fibronectina é maior nas regiões onde estão as células mais agressivas do carcinoma e onde o tecido conjuntivo tem condições de recrutar moléculas e células que tornem viável a progressão do tumor. Outros estudos afirmam que a imunodeteção da fibronectina na frente de invasão seria um importante sinal de malignidade, podendo ser utilizado na distinção de lesões benignas mamárias e lesões malignas. Nos 20 casos estudados, a expressão da fibronectina foi um achado relevante, fazendo-nos inferir que a expressão mais aumentada da fibronectina na frente de invasão seria um achado importante para o diagnóstico (BROW et al., 1999; LABAT-ROBERT, 2002).

Com a progressão da frente de invasão, a matriz extracelular modifica a sua conformação, seja na estrutura das suas fibras colágenas e elásticas, o que lhe garante a resistência mecânica e a flexibilidade tecidual, seja nas demais proteínas envolvidas com a ancoragem celular, migração e adesividade. Além das proteínas da membrana basal, as demais proteínas da matriz, estudadas nesta amostra, tiveram a sua síntese alterada, podendo-se inferir que frente à progressão da frente de invasão todo um conjunto de alterações celulares e moleculares estará acontecendo, sendo importante mapear estas alterações com vistas ao diagnóstico mais preciso (FÜLÖP; LARBI, 2002 ALT-HOLLAND et al., 2005).

Figura 5.1 - A: CEL exibindo frente de invasão, corado por hematoxilina e eosina (100X no original). B a F: marcação imunoistoquímica para proteínas da matriz extracelular na região da frente de invasão do CEL (todas 200X no original). B - marcação para laminina exibindo muitas áreas de perda de continuidade (setas); C - colágeno IV, quase totalmente negativo na região de frente de invasão; D - colágeno III totalmente ausente na região de frente de invasão; E - fibronectina e F tenascina, ambas mostrando-se muito abundantes na região de frente de invasão

7 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo evidenciam que a expressão das proteínas analisadas na membrana basal, por se apresentarem alteradas na sua deposição, estariam com as suas propriedades de ancoragem e de barreira comprometidas. Somente dois casos expressaram positividade para laminina e um caso para o colágeno IV. Todos os outros expressaram perda de continuidade ou negatividade, independente da graduação histológica de malignidade, fazendo entender que tanto os casos graduados histologicamente como bem, moderadamente e pobremente diferenciados têm o poder de alterar a conformação da membrana basal.

O colágeno III teve a sua expressão observada, de maneira difusa, em somente 4 casos desta amostra. Todos os restantes foram negativos, fazendo entender que as alterações colagênicas na região da frente realmente são relevantes, principalmente devido ao fato destas alterações estarem acontecendo em uma matriz já alterada devido à degeneração basofílica do colágeno e isto foi independente da graduação histológica de malignidade. Uma vez observado o avanço da frente de invasão, o que se verificou foi que o colágeno III se desestruturou, daí a ausência de expressão para a maioria dos casos, tanto para os graduados como bem, moderadamente e pobremente diferenciados

A intensa expressão das proteínas tenascina e fibronectina também foi um dado relevante, independente do padrão de inflamação. Observou-se que, havia uma relação importante entre a presença da frente de invasão e a expressão intensa destas duas proteínas, não sendo possível relacionar isto à graduação histológica de

malignidade. Somente tivemos negatividade para tenascina em dois casos, sendo que a expressão foi intensa para a maioria dos casos de expressão desta proteína. Para a fibronectina, a expressão foi intensa para a maioria dos casos, independente da graduação histológica de malignidade.

Isto posto, entende-se que uma vez que o carcinoma seja diagnosticado com a frente de invasão evidente, todos estes sinais moleculares emitidos estariam fazendo parte de um conjunto maior de alterações. O estudo e a análise destas alterações devem ser somados à graduação histológica de malignidade, pois auxiliarão no diagnóstico mais preciso, além de apontarem para terapêuticas mais aplicadas para a cura desta entidade.

REFERÊNCIAS¹

Aboseif S, El-Sakka A, Young P, Cunha G. Mesenchymal reprogramming of adult human epithelial differentiation. *Differentiation* 1999; 65(2):113-8.

Araújo VC, Loyola AM, Pinto Júnior DS, Borra RC, Araújo NS. P53 in biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol* 1997;33(1):5-9.

Akiyama SK, Nagata k, Yamada KM. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochim Biophys. Acta* 1990;1031:91-110.

Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest* 1993;68:4-17.

Alt-Holland A, Zhang W, Margulis A, Garlick JA. Microenvironmental control of premalignant disease: the role of intercellular adhesion in the progression of squamous cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2005;15:84-96.

Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y, Kadoya K, Nishiyama T, Camplaud MF, et al. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001;271:249-62.

Anneroth G, Hansen LS, Silverman Jr. S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol* 1986;15:162-8.

Berndt A, Hyckel P, Konneker A, Kosmehl H. 3-dimensional in vitro invasion model for oral squamous epithelial carcinomas. Evaluation of tumor and stromal cell properties in well as extracellular matrix. *Mund Kiefer Gerischts* 1998;2(5):256-60.

Berndt A, Borsi L, Hyckel, Kosmehl H. Fibrillary co-deposition of laminin-5 and large unspliced tenascin-C in the invasive front of oral squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:286-92.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Water LV, Iruela-Arispe ML, Yeo TK et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1999;5:1041-56.

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

Bryne M, Trane M, Dabelsteen E. Loss of expression of blood group antigen H is associated with cellular invasion and spread of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 1991;67:613-8.

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

Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 1995; 427:277-81.

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Diseases* 1998;4:70-7.

Castranovo V, Taramboletti G, Sobel ME. Laminine receptor complementary DNA deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. *Cancer Res* 1991;51:5672-8.

Cernea CR, Ferraz AR, Castro IV, Sotto MN, Logullo AF, Potenza AS, et al. Evaluation of basement membrane status in aggressive skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Ann Diag Pathol* 2005;9:130-3.

Chidzonga MM. Lip cancer in Zimbabwe. Report of 14 cases. *Int. J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:149-51.

Chiquet-Ehrismann R. Tenascin, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 1995;51(9):853-62.

Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA. Participation of tenascin and transforming growth factor beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res* 1989;49:4322-5.

Costa ALL, Today E, Araújo NS/. Otimização da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR em carcinoma epidermóide de boca. RPG 1998;5:177-83.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia Estrutural e Funcional. Sexta edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

Costea DE, Johannessen AC. Fibroblast control on epithelial differentiations is gradually lost during *in vitro* tumor progression. Differentiation 2005;73:134-41.

De Wever O, Mareel M. Role myofibroblasts at the invasion front. Biol Chem 2005;383:55-67.

Dyce OH, Ziober AF, Wever RS, Miyazaki K. Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. Laryng 2002;112(11):2025-32.

Faria PR, Cardoso SV, Loyola AM. Carcinoma epidermóide bucal: perfil diagnóstico dos serviços médicos e odontológicos (UFU-MG). Arq. Odontologia FOUFG 1999;35(Supl):43

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: ethiological clues. Oral Oncol 2000;36:106-15.

Fülöp T, Larbi A. Putative role of 67kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. Semin Cancer Biol 2002;12:3:219-29.

Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? Oral Oncol 2000;300(2):367-75.

Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G. Semin Cancer Biol 2002;12(3):231-41.

Huhtala P, Humphries MJ, Carthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damskt CH. Cooperative signaling alfa5beta1 and alfa4beta1 regulates metalloproteinases gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. J Cell Biol 1995;129:867-79.

Ilic D, Almeida EAC, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. J Cell Biol 1998;143:547-60.

Instituto Nacional do Câncer (INCA).. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2006 [documento eletrônico]. Ministério da Saúde. Disponível na internet. <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2006/brasil.html>

Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL O, et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminina in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer* 2002;38(18):2362-70.

Jacobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx (a pilot study). *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973;12:1-8.

Jean NS. Expressão imunoistoquímica de citoqueratinas CD1a, S100, P53, P21, PCNA e Ki67 em queilíe actínica. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de odontologia da USP;2000.

Jones J, Sugiyama M, Watt FM, Speight PM. Integrin expression in normal, hiperplasic, dysplasic, and malignant oral epithelium. *J Pathol* 1993;169:235-43.

Junqueira LL e Carneiro J. Histologia Básica. 7^a ed. Rio de janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A; 2000.

Kainulainen T, Autio-Harminen H, Oikarinen A, Salo S. Altered distribution and synthesis of laminin-5(kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Brit J of Dermatol* 1997;136:331-6.

Kaugars GE, Pillion TBA, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilits: A review of 152 cases. *Oral Maxillofac Pathol* 1999;88(2):181-6.

Kerklä E e Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin carcinoma. *Experiment Dermatol* 2003;12:109-25.

Kim JK, Xu Y, Xu X, Keenes DR, Gurusiddappa S, Liang X, et al. A novel binding site in collagen type III for integrinas alfa 1 beta 1 e alfa 2 beta 1. *J Biol Chem* 2005;37:32512-20.

Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer* 1995;31A:375-80.

Kosmehl H, Berndt A, Strasburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, et al. Distribution of laminina and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81:1071-9.

Köpf-Maier, Flug M. Behavior of the basement membrane during carcinoma cell invasion in chemically induced carcinomas of the skin. *Acta Anat* 1996;155:1-13.

Kowalski LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal. 1ª ed. São Paulo:Fröntis Editora; 1999.

Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol* 2004; 40:941-7.

Labat-Robert J. Fibronectin in malignancy. Effect of aging. *Cancer Biology* 2002;12:187-95.

Landowski TH, Dratz EA, Starkey JR. Studies on the structure of the metastasis associated 67kDa laminine binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form mature protein. *Biochemistry* 1995;34:11276-87.

Lápis K, Tima J. Role of elastin-matrix interactions in tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2002;12:3.209-17.

Lee SK, Park SC, Chi JG, Sakamoto F, Shrestha P, Mori M. Expression of tenascin in hamster buccal pouch mucosa during experimental carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B(3):188-92.

Leethanakul C. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene* 2000;19:3220-4.

Leong IT, Main JHP, Birt BD. Cancer of the tongue. *J Can Dent Assoc* 1995;61:792-6

Linde A, Jonsson R. Immunofluorescent localization of fibronectin in human oral mucosa. Arch Oral Biol 1982;27(12):1047-52.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host surface. Nat Insight 2001;441:375-9.

Lyons AJ. Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. Br J Oral Maxillofac Surg 2001;39(6):471-7.

Lund C, Sögaard DH, Elbrönd O, Jörgensen K, Pedersen AP. Epidermoid carcinoma of the lip. Histologic grading in the clinical evaluation. Acta Radiol Ther Phys Biol 1975;14:465-74.

Mackie EJ. Molecules in focus: Tenascin-C. Int J Biochem Cell Biol 1997;29(10):1133-7.

Mohri H. Fibronectin and integrins interactions. J Invest Med 1996;44:429-41.

Martins MM. Estudo imunoistoquímico dos componentes celulares e da matriz extracelular do sarcoma de kaposi de boca em AIDS [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;1998.

Martinez EF, Araújo VC. Expressão da tenascina, da fibronectina e do colágeno III em polpas dentárias humanas. RPG 1998;5(4):308.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patient with oral tongue squamous cell carcinoma. Cancer 1999;85(5):1011-7.

Nakajima M, Welch DR, Belomine PN, Nicolson GL. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. Cancer Research 1987;47:4869-76.

Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Botti C, Castellani P, Risso AM, ATALI PG, *et al.* Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. Int J Cancer 1991;47(6):811-6.

Neville BW, Damm DD, Allen CM. J Oral and Maxillofacial Pathology 1st Ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders CO; 1995.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral & Maxillofacial. 2^a ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S/A 2004.

Odell EW, Jani P, Ahluwalia SW, Levison DA. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. Cancer 1993;74:789-94.

Ogden GR, Wight AJ. A etiology of oral cancer: alcohol. Br J oral Maxillofac Surg 1998;36:247-51.

Prince S, Bailey BMW. Squamous carcinoma of the tongue: review. Br J Oral Maxillofac Surg 1999;37:164-7.

Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Rasch D, Joor U, Schuid KW. Standardized AgNor analysis of the invasive tumor front in oral squamous cell carcinomas. J Pathol 1997;182(4):450-6.

Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Kusch F, Bocker W. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. Virch Arch 1996;429(4):229-35.

Radovic S, Selak I, Babic M, Kuenzevic Z, Vinkobrat-Bijidid Z. Type IV collagen immunoreactivity of basement membrane in inflammatory-regenerative and dysplastic lesions of the flat colonic mucosa. Bosn j Basic Med Sci 2003;3(1):30-5.

Robert JL. Fibronectin in malignancy. Effect of aging. Semin Cancer Biol. 2002;12(3):187-95.

Roos E. Cellular adhesion, invasion and metastasis. Biochim Biophys Acta 1984;738:263-84.

Rojas IG, Spencer ML, Martínez A, Maurelia MA, Rudolph MI. Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. J Oral Pathol Med 2005;34:268-73.

Santos JN, Sousa, SOM, Nunes FD, Sotto MN, Araujo, VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. J Cutan Pathol 2003;30:237-41.

Sansilvestri-Morel P, Ruppen A, Jullien ND, Lembrez N, Mestries-Dubois P. Decreased production collagen III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation possible implication MMP-3. J Vasc Res 2005;42(5):388-98.

Salomão C. Fatores de prognóstico no carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de odontologia da USP; 2003.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki IG. Contemporary Oral and Facial Maxillofacial Pathology. Ed Mosby-Year Book Inc; 1997.

Saarialho Kere U, Ahokas K, Skoog T, Suonela S, Jalkanen L. Matrilysin-2 (Matrix Metalloproteinase-26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. J Invest Dermatol 2005;124(4):849-56.

Shtutman M, Zhuritsky J, Simcha I. Molecular genetics of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 1995;7:229.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Júnior DS. Immunohistochemical evidence of PTEN in OSCC and its correlation with the histological malignancy grading system. J Oral Pathol Med 2002;31(7):379-84.

Symington BE, Takada Y, Carter WG. Interaction of $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$: Potential role in keratinocyte intercellular adhesion. J Cell Biol 1993;120:523-35.

Thorup AK, Dabelsteen E, Schou S, Gil SG, Carter WG, Reibel J. Differential expression of integrins and laminin-5 in normal oral epithelia. APMIS 1997;105:519-30.

Thorup AK, Reibel J, Schiodt M, Sternersen TC, Therkildsen MH, Carter WG. Can alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? APMIS 1998;106:1170-80.

Todd R, Donoff RB, Wong DTW. The molecular biology of carcinogenesis: toward a tumor progression model. J Oral Maxillofac Surg 1997;55(6):613-23.

Veness MJ. Lip cancer: Important management issues. Aust J Dermatol 2001;42:30-3.

Venkatesan TK, Kuropkat C, Caldarell DD, Panzi WR. Prognostic significance of P 27 expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope* 1999;109(8):1329-33.

Visscher JGAM, Waal I. Etiology of cancer the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:199-03.

Visse R, Nagasse H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Cir Res* 2003; 92(8):827-39.

Willians HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2000;53:165-72.

Zidar N et al. Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous cell carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 2001; 21(1A): 451-4.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 81/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Comparação entre presença e distribuição de proteínas da matriz extracelular e graduação histológica de malignidade da frente de invasão no Carcinoma Epidermóide de Lábio"*, de responsabilidade do Pesquisador **Adriano Pires Candido**, sob orientação da Professora Doutora **Marília Trierveiler Martins**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 06 de junho de 2005

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP