Flávio Monteiro Amado

**Avaliação imunoistoquímica da expressão das
metaloproteinases de matriz 2 e 9 e CD31 em carcinomas
espinocelulares de soalho bucal**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Odontologia**

Área de Concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

**BAURU
2007**

Amado, Flávio Monteiro

Am12a Avaliação imunoistoquímica da expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 e CD31 em carcinomas espinocelulares de soalho bucal / Flávio Monteiro Amado. – Bauru, 2007.
123 p. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru, 14 de dezembro de 2007.

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Of.nº CEP/10 2005/FOB

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, sob o número 632/04.

FLÁVIO MONTEIRO AMADO

09 de novembro de 1976

Santos – SP

Nascimento

Filho de Carlos Roberto Passos Amado e
Julieta Vanda Monteiro Amado

1994-1997

Curso de Graduação em Odontologia pela
Faculdade de Odontologia de Bauru -
Universidade de São Paulo

1998-2000

Especialização em Implantodontia no
Hospital de Reabilitação de Anomalias
Craniofaciais - Universidade de São Paulo

2001-2003

Curso de Pós-Graduação em Estomatologia,
ao nível de Mestrado, pela Faculdade de
Odontologia de Bauru – Universidade de
São Paulo

2003-2007

Curso de Pós-Graduação em
Estomatologia, ao nível de Doutorado, pela
Faculdade de Odontologia de Bauru –
Universidade de São Paulo

2005-

Implantodontista do Hospital de Reabilitação
de Anomalias Craniofaciais – Universidade
de São Paulo

DEDICATÓRIA

À minha família - **Julieta, Beto, Ênio e Júlio** - pelo apoio constante, pela compreensão que demonstram, pelas lições que me passam, pelas palavras de ânimo, e pelas críticas que me fazem crescer. É impossível descrever a gratidão que sempre me acompanhará por terem me oferecido tantas oportunidades e tanto afeto.

À família da Samantha - **Nancy, Osíris, Vinícius e Guilherme** - e a **todos os amigos** que herdei de vocês, por me acolherem tão bem e me tratarem como um verdadeiro filho. Hoje vocês também são a minha família, e com vocês eu me sinto no conforto de casa.

À minha **Samantha** - meu presente, minha paz, minha alegria. Você é um exemplo de determinação, coragem, autenticidade, e compreensão. Seu carinho comigo é infinito, e espero poder retribuir sempre à altura.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. José Mauro Granjeiro**, pela aceitação em me orientar, pela paciência, pelos conselhos sempre bem-vindos, e pela determinação na conclusão deste estudo. Seus ensinamentos de vida e amizade sempre foram muito importantes.

Ao **Dr. Fernando Soares** e **Dr. Luiz Paulo Kowalski**, por possibilitarem a realização deste estudo, e por me atenderem sempre com grande atenção.

À **Inês N. Nishimoto**, pela realização da análise estatística e pelas informações tão relevantes e imprescindíveis durante a fase final deste trabalho.

Aos professores do curso de doutorado, **Profa. Ana Lúcia Alvarez Capelloza**, **Prof. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato**, **Prof. José Humberto Damante**, **Prof^a. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**, **Prof. Eduardo Sant'Ana**, **Prof. Osny Ferreira Júnior**, e **Prof. Paulo Sérgio Perry de Carvalho**.

À **Cristina Lima**, pela grande ajuda na realização deste trabalho, e pela disponibilidade com que sempre me atendeu.

À **Tânia Cestari**, que solucionou problemas durante a realização do estudo, e sem a qual este trabalho também não seria possível.

À **Daniela Ceolin**, que colaborou no momentos em que precisei.

À professora **Dra. Vanessa Soares Lara** e à aluna **Patrícia Freitas**, pela ajuda durante o trabalho.

Aos colegas do curso de doutorado, **Cláudio, Fernando, Eduardo, Luiz Fernando e Cássia**, pelo convívio.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia: **Walderez, Josiele, Marília, Fernanda, Roberto, Camila, Hebe, Regina, Elza, Patrícia, Reinaldo, David, Zezinho**, por toda a ajuda durante estes anos de trabalho.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, **Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes da Silva**, pela ajuda.

À Professora e amiga **Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende**, Malu, que oito anos depois de ter sido seu aluno durante a Especialização em Implantodontia, continua sendo meu grande exemplo de honestidade, caráter e seriedade. Muito obrigado por todo o incentivo e apoio.

À **Fernada Stipp**, pelo tratamento carinhoso e atenção nas oportunidades em que nos encontramos, e naquelas em que me hospedei em sua casa.

Aos alunos de Especialização em Implantodontia do HRAC - **Adriana, Érika, Fábio, Jorge, Marcelo e Samantha** - com os quais eu sempre aprendi mais do que ensinei.

À **Roseli** e à **Ivone**, do setor de Implantodontia do HRAC, pela ajuda e dedicação com que me atendem no dia-a-dia de nosso trabalho.

À **Dr^a. Lúcia Helena L. Andreatta**, pela participação na minha vida profissional e pessoal.

À **Priscila Padilha Moura**, que sempre me ajuda com tanta boa vontade e profissionalismo.

A todos os **pacientes**, cujo material utilizado pra a realização deste trabalho foi sem dúvida essencial. Que este estudo possa representar ao menos uma gota em meio a todo o conhecimento necessário para aliviar o sofrimento daqueles que, como eles, padecem com o câncer.

Aos **funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação**, por toda a atenção e disponibilidade com que atendem a todos.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**.

À **Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru**, na pessoa da sua Presidente **Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Ao **HRAC - Centrinho**, meu trabalho e minha escola, onde muito ainda tenho aprendido sobre minha profissão.

Aos **pacientes** da Clínica de Estomatologia desta Faculdade, sem os quais o aprendizado seria impensável.

A **todos** que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

À **FAPESP** e **CNPq**, pela concessão dos recursos materiais que possibilitaram a realização do estudo.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão das MMPs 2 e 9 e CD31 por meio de imunoistoquímica em carcinomas espinoceculares de soalho bucal, e correlacionar os resultados com variáveis demográficas, estadiamento tumoral TNM, parâmetros microscópicos, como invasão perineural, embolização, grau de diferenciação tumoral, e sobrevida. **Material e métodos:** dados de prontuários de 41 pacientes foram coletados e o diagnóstico histopatológico foi revisado com lâminas recém preparadas. Seções de 5 µm foram montadas em lâminas silanizadas e submetidas à imunomarcação pelo sistema streptoavidina-biotina utilizando os anticorpos anti MMP2, MMP 9 e CD31 humanos. A presença de imunomarcação das MMPs foi quantificada utilizando um retículo com 100 pontos em 20 campos de cada lâmina obtidos com objetiva de 40x. Os vasos foram identificados pela imunomarcação com anti-CD31 contando-se aqueles que apresentavam lumem e tamanho menor do que 50µm em cinco campos (objetiva de 20x) na área de maior vascularização das lesões. Para verificar a associação entre as variáveis numéricas e os marcadores, o teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado e, em tabelas de contingência, o teste de freqüências do qui-quadrado foi aplicado. O teste exato de Fisher foi adotado quando pelo menos uma freqüência esperada foi menor do que 5 em tabelas 2X2. O Método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar as probabilidades de sobrevida global e o teste de logrank para comparar as curvas de sobrevida. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos. **Resultados:** houve correlação estatisticamente significativa entre marcação para MMP 2 e metástase em linfonodo. Os fatores relacionados negativamente com a sobrevida foram estadiamento N, tipo histológico, invasão neural e marcação de MMP 9. **Conclusão:** a intensidade de imunomarcação de MMP 2 e MMP9 pode ser indicativa de metástase em linfonodo e menor probabilidade de sobrevida, respectivamente.

Palavras-chave: metaloproteinase 2 da matriz; metaloproteinase 9 da matriz; neoplasias bucais; carcinoma de células escamosas; metástase linfática; neovascularização patológica.

ABSTRACT

Evaluation of matrix metalloproteinases 2 and 9 and CD31 immune staining in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth

Objective: Compare the expression of MMPs 2 and 9 and CD31 by the use of immune histochemistry, in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth, and obtain the relationship between those markers and demographic aspects, TNM stage, nerve invasion, blood vessel intravasation, degree of tumor differentiation and survival rates. **Material and methods:** data from 41 patients were reviewed. Tissue sections with 5 μ m were mounted in silanized glasses, and submitted to immune staining by the streptoavidin-biotin method, using the anti MMP2, MMP 9 and CD31 human antibodies. The presence of staining was quantified in a 100 points grade in 20 fields of each lesion, with a 40X magnification. Blood vessels smaller than 50 μ m that were identified with the CD31 were counted in 5 fields of the hot spot area of the tumor. To verify the association between immune staining and numerical variables, the non parametric Mann-Whitney U test was used, and the chi-square test was verified. The exact Fisher test was adopted when at least one of the expected frequencies in 2X2 tables was less than 5. The Kaplan-Meier method was used to estimate the probabilities of global survival, and the log-rank test was used to compare the survival curves. **Results:** there was statistically significant association between MMP 2 immune staining and regional metastasis. The variables associated with poor survival rates were N stage, histological grade, nerve invasion and immune staining for MMP 9. **Conclusion:** the grade of immune staining can be an indicative of node metastasis and poor survival rate, respectively.

Key-words: matrix metalloproteinase 2; matrix metalloproteinase 9; carcinoma, squamous cell; lymphatic, metastasis; neovascularization, pathologic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aFGF - fator ácido de crescimento fibroblástico

BMF – fibroblasto da medula óssea

cDNA - ácido desoxirribonucleico clonado

CEC – carcinoma espinocelular

COX – citocromo oxidase

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – imunoenensaio enzimático

FGF – fator de crescimento de fiboblasto

HNSCC – carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

IL – interleucina

MEC – matriz extracelular

MMP – metaloproteinase de matriz

NGF – fator de crescimento neural

NO – óxido nítrico

MVD – densidade microvascular (microvascular density)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

RECK – reversion- induction cystein rich protein with Kazal motifs (proteína indutora de reversão com repetições Kazal)

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa

TGF – fator de crescimento tecidual

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF – fator de necrose tumoral

TNM – tumor, nodo, metástase

TSA – trichostatin

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1.Introdução	25
2 Revisão de literatura	33
3 Proposição	45
4 Material e métodos	49
4.1 Casuística	51
4.2 Critérios de elegibilidade para o estudo	51
4.2.1 Critérios de inclusão	51
4.2.2 Critérios de exclusão	52
4.3 Métodos	52
4.3.1 Estádio clínico	52
4.3.1.1 Estádio da neoplasia primária (T)	53
4.3.1.2 Estádio da metástase regional (N)	53
4.3.1.3 Estádio da metástase à distância (M)	53
4.3.1.4 Agrupamento por estádios clínicos (EC)	54
4.3.2 Imunoistoquímica	54
4.3.2.1 Procedimentos imunoistoquímicos	54
4.3.2.1.1 Desparafinização	54
4.3.2.1.2 Inativação da peroxidase endógena e das proteínas do soro	54
4.3.2.1.3 Recuperação dos epítomos	55
4.3.2.1.4. Exposição aos anticorpos	55
4.3.2.1.5 Exposição ao substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina)	56
4.3.2.1.6 Contra-coloração e montagem	56
4.3.2.1.7 Análise histomorfométrica das imunomarcações	56
4.3.3 Análise dos resultados	57
5 Resultados	59
6 Discussão	89
6.1 Concepção do estudo	91
6.2 Amostra	91
6.3 Metodologia	92
6.4 Carcinoma espinocelular e MMP 2 e 9	95
7 Conclusões	103
8 Perspectivas futuras	107
Referências bibliográficas	111
Anexos	121

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Apesar do fato de que menos do que 10% dos tumores malignos possam ser rastreados de acordo com herança Mendeliana, a habilidade das células malignas em proliferar e gerar metástase é atribuída a alterações genéticas. Tais alterações levam à ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e/ou inativação de mecanismos de reparo do DNA (LUDWIG; WEINSTEIN, 2005).

A tumorigênese e a progressão tumoral se baseiam em pelo menos sete alterações fundamentais na fisiologia celular: 1) produção de sinais de crescimento autócrinos; 2) insensibilidade aos sinais de inibição ao crescimento; 3) escape da apoptose; 4) perda da senescência; 5) manutenção da angiogênese; 6) invasão tecidual; e 7) metastástase (HANAHA; WEINBERG, 2000). Sem dúvida a capacidade de invadir tecidos e estabelecer colônias em sítios remotos são características que definem as neoplasias malignas. Como a metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer, a melhor compreensão dos processos de invasão tumoral e metástase são essenciais e poderão levar à identificação de novos alvos terapêuticos (CURRAN; MURRAY, 1999; KOWALSKI; CARVALHO *et al.*, 2005).

Dados substanciais pré-clínicos e epidemiológicos indicam que o câncer pode ser prevenido ou, ao menos, adiado. Entretanto, o dilema posto à comunidade científica é como identificar eficientemente estratégias de diagnóstico preventivo que possam ser utilizadas para grandes populações susceptíveis (SZABO, 2006).

No câncer bucal, por exemplo, se tem que, embora a taxa descrita de transformação de leucoplasia displásica para câncer seja de 36% em oito anos, danos genéticos na forma de perda de heterozigotidade em um ou mais loci cromossomais específicos podem identificar subgrupos de indivíduos com taxas tão altas como 25-50% de transformação maligna em cinco anos (ROSIN; CHENG *et al.*, 2000).

Fica evidente que a identificação de indivíduos susceptíveis pode trazer maiores benefícios aos mesmos na medida em que permite a aplicação de medidas preventivas mais eficientes. De maneira análoga, mesmo depois de instalado o câncer, a identificação de lesões ou indivíduos mais propensos a um comportamento tumoral mais agressivo, e a gerar metástase, pode permitir a aplicação de medidas

terapêuticas mais eficazes, com acesos cirúrgicos mais específicos e facilitando a comunicação entre profissionais quanto ao estadiamento das lesões (XIE, SUN *et al.*, 2004; LUDWIG; WEINSTEIN, 2005).

O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é um câncer do trato aerodigestivo superior. Tal condição pode ser dividida em alguns sítios anatômicos potenciais como maxila, orofaringe, laringe, e hipofaringe. Embora as orientações de tratamento tenham sido desenvolvidas de acordo com o sítio tumoral, estadiamento TNM e diagnóstico histológico, eles nem sempre predizem os resultados clínicos de forma precisa (YOSHIZAKI, MARUYAMA *et al.*, 2001; LUDWIG; WEINSTEIN, 2005). Apesar do lento declínio na taxa de incidência (~4% desde 1980) e uma modesta melhora na sobrevida de 5 anos (54,4 para 59,4% nos últimos 20 anos), o CEC de cabeça e pescoço continua a ser um desafio clínico (FORASTIERE; KOCK *et al.*, 2001).

Um dos fatores que contribuem para que a sobrevida de pacientes seja tão baixa é que o câncer bucal geralmente é diagnosticado em estágio avançado (HASINA; LINGEN, 2001). Além disso, o câncer bucal tipicamente leva muitos anos até que possa ser observado, pois o desenvolvimento tumoral é um processo no qual ocorre a ativação seqüencial de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor nos mesmos clones celulares. A perda de regulação destes genes importantes é exatamente a base molecular para mudanças que ocorrem em células tumorais, permitindo que tais células sobrevivam e cresçam sem controle. Algumas destas mudanças fenotípicas que ocorrem incluem o desenvolvimento de imortalidade celular, a habilidade de invadir tecidos e gerar metástase, assim como a habilidade de induzir angiogênese (HASINA; LINGEN, 2001).

A invasão tumoral é considerada um processo dinâmico, complexo e com várias etapas, que envolve a separação de células malignas de seu ponto de origem, as quais atravessam a matriz extracelular e a membrana basal, e invadem os canais linfo-vasculares. A proteólise dos componentes da membrana basal e matriz extracelular são passos essenciais na invasão tecidual, assim, proteases específicas são requeridas para a degradação do colágeno, laminina e fibronectina. Há quatro principais grupos de proteases – as aspartato e cisteína proteases (incluindo as catepsinas), que funcionam em baixo pH e estão envolvidas na proteólise intracelular nos lisossomos, e as proteases dependentes de serina e metal, as quais são ativas em pH neutro e responsáveis pela proteólise extracelular.

Embora representantes das quatro classes de enzimas proteolíticas tenham sido implicados na invasão tumoral e metástase, especialmente as MMPs (proteases zinco-dependentes), têm sido o objeto de extensas pesquisas (CURRN; MURRAY, 1999; GOROGH; BEIER *et al.*, 2006; LIN; LIU *et al.*, 2006; HERSZNYI, HRITZ *et al.*, 2007).

Angiogênese, por sua vez, é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir de um leito vascular existente. A angiogênese fisiológica que ocorre na reprodução, desenvolvimento placentário e reparo, geralmente ocorre em pequenos surtos e é auto-limitante. Em contraste, a angiogênese patológica que ocorre em diversas doenças como tumores sólidos e artrite reumatóide, freqüentemente persiste indefinidamente (FOLKMAN, 1995b; 1995^a; LIOTTA; STETLER-STEVENSON, 1991)). Folkman (1971) propôs que a vascularização do tumor era essencial para sua sobrevivência, e afirmou que tumores não podem exceder um tamanho crítico se não houver o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1990; CARMELIET; JAIN, 2000).

A angiogênese ocorre devido a uma série de passos seqüenciais. Em resposta a diferentes estímulos angiogênicos, com o envolvimento de macrófagos, de vasos pré-existentes e de diversas moléculas, como CSF-1, GM-CSF, VEGF, MCP-1, TGF β -1 (WAHL; HUNT *et al.*, 1987; CLAUSS; MURRAY *et al.*, 1990; GRAVES; VALENTE, 1991; SCHOLL; BASCOU *et al.*, 1994; LEWIS; LEEK *et al.*, 1995), bFGF, e IL-8 (STRIETER; KUNKEL *et al.*, 1992). As células endoteliais que revestem os capilares existentes degradam sua membrana basal secretando enzimas proteolíticas, incluindo MMPs e serina-proteases (FURNESS, 1997). As células migram através da membrana basal degradada e continuam a romper o estroma intersticial enquanto se movem. As células endoteliais na extremidade do crescimento geralmente não se dividem, enquanto que a fileira de células que se seguem na base do novo vaso, proliferam. O endotélio, então, se organiza de forma bipolar, formando um lúmen. Os brotos recém-formados se anastomosam e formam um capilar pelo qual o sangue flui (FURNESS, 1997).

Alguns estudos têm indicado que MMPs, particularmente gelatinases A (MMP 2) e B (MMP 9), possuem um papel central durante a angiogênese (FRANCHI; SANTUCHI *et al.*, 2002; ROEBUCK; HELLIWELL *et al.*, 2005). Tais gelatinases são bem conhecidas por sua habilidade em degradar colágenos presentes na membrana basal vascular (MURPHY; CRABBE, 1995) e auxiliam as collagenases a degradarem

o interstício. MMP-2 pode quebrar os componentes intersticiais por clivagem direta do colágeno tipo I em uma taxa similar à da collagenase intersticial (AIMES; QUIGLEY, 1995). A MMP 2 pode promover a ativação de collagenase intersticial latente, a qual cliva a tripla α -hélice dos colágenos tipo I, II, III, cujos fragmentos são, posteriormente, degradados pela MMP 2 ou MMP 9 (ALEXANDER; ELROD, 2002). Por isso, alguns estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de correlacionar a expressão de MMPs em tecidos tumorais e a quantidade de microvasos nestes mesmos tecidos (FRANCHI; SANTUCCI *et al.*, 2002; GUTTMAN; STERN, Stern *et al.*, 2004; ROEBUCK; HELLIWELL *et al.*, 2005; HEIKKILA; SUOJANEN *et al.*, 2006).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes com mais de 20 componentes, importantes para a degradação da matriz extracelular durante a embriogênese, organogênese e morfogênese, sendo importante também em certas condições patológicas (WERB, 1997). Papéis fisiológicos normais das MMPs incluem crescimento neuronal, migração celular, alongamento ósseo, reparo de feridas, angiogênese, ovulação, maturação do esperma, involução uterina, menstruação, formação do esmalte, processamento e apresentação de antígeno, desenvolvimento de glândula mamária, desenvolvimento do folículo capilar e implantação embrionária (ALEXANDER; ELROD, 2002).

As MMPS são produzidas como pró-enzimas (zimogênios) cujo segmento pró-peptídeo está ligado à porção N-terminal, que deve ser removida para manifestar sua atividade enzimática. A atividade das MMPs é regulada em múltiplos níveis, incluindo a conversão da pró-enzima para a forma ativada, regulação da transcrição, tradução, mecanismos de ativação extracelular e bloqueio de inibidores teciduais de MMPs (ALEXANDER; ELROD, 2002).

É sugerido um papel no controle da invasão tumoral por meio da regulação da atividade de MMPs (CURRAAN; MURRAY, 2000; CHANG; WERB, 2001; BJORKLUND; KOIVUNEN, 2005; De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005; GU; LI *et al.*, 2005; BAKER; LEAPER *et al.*, 2006). Por isso, estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar possíveis agentes terapêuticos (YAZICI; KIM *et al.*, 2005) que, agindo de forma a inibir a atividade das metaloproteinases, diminua o potencial invasivo e metastático do câncer (MORINI; ASTIGIANO *et al.*, 2000; WINDING; NICAMHLAOIBH *et al.*, 2002; ROSE; HUANG *et al.*, 2005; SEO; LEE *et al.*, 2005).

Contudo, a relevância do papel das MMPs na evolução do câncer bucal não foi completamente elucidada. A maioria dos estudos neste campo não faz a distinção

entre os diversos sítios tumorais, muitas vezes caracterizando os conjuntos de lesões estudadas simplesmente como câncer de cabeça e pescoço, ou câncer bucal, em amostras muito heterogêneas de lesões (IKEBE; SHINOHARA *et al.*, 1999; KURAHARA; SHINOHARA *et al.*, 1999; P; RHYS-EVANS *et al.*, 2001; De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005; PATEL; SHAH *et al.*, 2005; RUOKOLAINEN; PAAKKO *et al.*, 2006; VAIRAKTARIS; VASSILIOU *et al.*, 2007).

Visto a importância do papel das metaloproteinases de matriz nos processos de invasão e angiogênese tumoral, e a falta de dados na literatura sobre CECs de soalho bucal, este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das MMPs 2 e 9, e sua relação com a densidade microvascular e parâmetros clinico-patológicos, em CECs de soalho bucal, exclusivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular

A causa do CEC é multifatorial, sendo que fatores extrínsecos incluem fumo, álcool, sífilis, exposição solar, e fatores intrínsecos incluem má nutrição e anemia. Origina-se da superfície epitelial displásica e caracteriza-se por ilhas de invasão e cordões de células epiteliais malignas, com diferenciação escamosa.

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, frequentemente com lesões proliferativas precoces, caracterizadas por padrões histológicos distintos. Com o tempo há sempre aumento da proliferação com alteração da morfologia. Aquelas lesões com displasia nuclear, mas sem evidência de invasão, às vezes denominadas “carcinoma *in situ*”, precedem o desenvolvimento do carcinoma, no qual a invasão pode ser detectada (KUPFERMAN; FINI *et al.*, 2000).

O câncer é um processo de múltiplos estágios no qual ocorrem mudanças genéticas progressivas em células iniciadas (células que carregam oncogenes ativados ou genes supressores de tumor inativados) e mudanças epigenéticas no microambiente no qual ele se desenvolve (BISSEL; RADISKY, 2001; RHEE; COUSSENS, 2002; BAYLIN; OHM, 2006). Em conjunto, tais características oferecem às células neoplásicas habilidades essenciais para o desenvolvimento tumoral – crescimento auto-suficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, resistência à programação de diferenciação terminal, senescência ou apoptose – assim como propicia a tais células uma capacidade de auto renovação ilimitada, habilidade de orquestrar e sustentar a angiogênese, e a habilidade de invadir ambientes teciduais ectópicos (HANAHAHANAN; WEINBERG, 2000).

Transcritos de MMPs aumentam rapidamente quando o tecido passa por remodelação como na inflamação, cicatrização tecidual e câncer. MMPs são sintetizadas como enzimas latentes que podem ser estocadas em grânulos de secreção nas células inflamatórias, mas são mais frequentemente secretadas, ancoradas ou associadas à superfície celular (RHEE; COUSSENS, 2002).

O alvo de diversos membros da família das MMPs é a região pericelular, tanto por uma ancoragem direta na membrana, ou por meio de receptores de membrana, isto cria uma região de concentração de atividade proteolítica que pode funcionar na invasão celular, assim como durante a sinalização de crescimento localizado, por

meio de interações com ligantes da MEC. Além disso, a ativação de algumas MMPs é dependente da interação com MMPs associadas à membrana. Este paradigma foi bem estabelecido pela ativação de MMP 2 pela MT1-MMP associada à membrana, um processo que é regulado tanto por RECK e TIMP-2 (WELM; MOTT *et al.*, 2002). Este último possui duas funções durante a ativação de MMP 2, cada uma confinada a um domínio específico da molécula: como um inibidor de MMP pelo seu domínio amino-terminal, que pode se ligar à MT1-MMP; e como um ativador de MMP via domínio carboxi-terminal que recruta proMMP 2 de um complexo ternário, o que resulta em sua ativação.

Uma função da MEC é oferecer uma barreira física entre os compartimentos teciduais. A MEC também é importante como um reservatório de fatores de crescimento, diferenciação e angiogênicos, e a clivagem da MEC pode produzir fragmentos com atividades biológicas distintas, como a endostatina (FERERAS; FELBOR *et al.*, 2000). Durante o crescimento invasivo do desenvolvimento, como durante a angiogênese, a reestruturação de MEC é requerida para a migração de vasos sanguíneos e sua intrusão em tecidos vizinhos. Degradação da MEC também ocorre durante eventos patológicos incluindo invasão tumoral e metástase (RHEE; COUSSENS, 2002).

O conceito que prevalecia era de que a capacidade das células tumorais invadir e gerar metástase era uma consequência direta de sua habilidade em produzir proteases que degradam matriz (LIOTTA; TRYGGVASON *et al.*, 1980; NAKAJIMA; WELCH *et al.*, 1987). Este ponto de vista evoluiu significativamente e se expandiu nos últimos anos e, agora, entende-se que tanto as células tumorais como as não-tumorais participam ativamente da degradação proteolítica da MEC fortalecendo o conceito de que as proteases que degradam matriz têm um papel mais complexo no câncer do que somente participar da invasão e metástase (DeCLERK, 2000).

2.2. Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

A família das metaloproteinases (MMPs) inclui mais de 26 membros (WELM; MOTT *et al.*, 2002). Embora MMPs se repitam quanto a sua especificidade, elas se

dividem em 5 grupos com respeito à degradação preferencial de diferentes substratos: gelatinases, matrilisinas, collagenases intersticiais, estromelisinases e MMPs de membrana (FARIAS; RANUNCOLO *et al.*, 2000). O critério utilizado para definir os membros da família MMP incluem a dependência de um átomo metálico de zinco, secreção como zimógeno, ativação *in vitro* da proenzima por tratamento ácido ou com organomercúrios, remoção autoproteolítica do N-terminal seguida de ativação ou inibição por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) ou inibidores químicos como quelantes de cálcio (GOMEZ; ALONSO *et al.*, 1997).

As MMPs são um grupo de hidrolases nas quais um ataque nucleofílico em uma ligação peptídica é mediado por uma molécula de água ativada por um íon metálico (geralmente um Zn^{++}) seguro no local por três ligantes aminoácidos que formam o sítio catalítico. Uma característica única destas proteases é a presença de uma região conservada HEXXHXXGXXH em seu domínio catalítico, no qual os três resíduos de histidina representam os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico é o sítio ativo. Além do íon zinco catalítico descrito, estas proteases possuem um zinco adicional e um ou dois íons cálcio necessários para estabilidade (BJORKLUND; KOIVUNEN, 2005)

Os substratos alvo das MMPs são primariamente proteínas insolúveis da MEC, incluindo colágeno intersticial e membranas basais, glicoproteínas como fibronectina, vitronectina, laminina, tenascina e elastina, assim como proteoglicanos (BJORKLUND; KOIVUNEN, 2005). Mais recentemente ficou evidente que certas MMPs podem degradar proteínas outras além da MEC (CHANG; WERB, 2001).

Alguns estudos revelaram que embora muitas células tumorais produzam MMPs, as proteases são com frequência abundantemente expressas por células estromais localizadas adjacentes à fronteira de invasão tumoral (HEPPNER; MATRISIAN *et al.*, 1996). Logo, tal padrão de expressão das MMPs em tumores varia de acordo com a função de cada MMP e também com o tipo de câncer.

Tem sido relatado que uma grande variedade de células não malignas expressa MMPs em áreas adjacentes ao tumor, incluindo células inflamatórias, células adjacentes aos vasos e na MEC (BERGERS; BREKKEN *et al.*, 2000). Estas observações sugerem que células tumorais estimulam a expressão de MMPs no ambiente que as rodeia para promover a degradação catalítica da MEC pelas células do hospedeiro. Este efeito estimulante no estroma pode ser mediado por fatores produzidos diretamente pelas células tumorais, mas também podem ser o resultado

de uma reação inflamatória que sempre acompanha o estabelecimento de um tumor maligno. Um dos possíveis caminhos para que isso ocorra foi proposto por Saad e colaboradores, em 2002 (SAAD; GOTTLIEB *et al.*, 2002), que descreveram um mecanismo pelo qual células tumorais podem rapidamente utilizar MMP 2 produzida por fibroblastos da medula óssea (BMFs). Observaram em co-culturas de BMFs e linhagem de células humanas de câncer de mama (MDA-MB-231) que houve indução da liberação de MMP 2 no sobrenadante sem a supra-regulação da síntese de MMP 2 em quaisquer das células. A MMP 2 está presente nas superfícies das BMFs e é liberada pelas MDA-MB-231, ou por fibronectina ou fragmentos de fibronectina que contém módulos de fibronectina tipo II. Observaram também que quando a fibronectina é liberada da superfície das MDA-MB-231, estas perdem a habilidade de induzir a liberação de MMP 2 pelas BMFs. Tais dados são consistentes com o deslocamento de MMP 2 inativa ligada a fibroblastos normais via seu domínio de ligação ao colágeno. Células tumorais podem usar a proteinase para facilitar a invasão tecidual.

Diversos estudos focaram a expressão das metaloproteinases de matriz e seu papel no desenvolvimento tumoral, quer seja em tumores de cabeça e pescoço, incluindo boca e esôfago, ou em tumores de pâncreas, estômago, pulmão ou mama, sendo este último, sem dúvida alguma, o mais estudado.

Independente da metodologia utilizada (imunoistoquímica, ELISA, zimografia, western blot, PCR ou sequenciamento genético), em geral é consenso que quanto maior a expressão de metaloproteinases em tecidos tumorais, pior o prognóstico da doença, tanto em estudos com animais (BERGERS; BREKKEN *et al.*, 2000; KUPFERMAN; FINI *et al.*, 2000; WINDING; NICAMHLAOIBH *et al.*, 2002), em humanos (MACDOUGALL; BANI *et al.*, 1999; FARIAS; RANUNCOLO *et al.*, 2000; HANEMAAIJER; VERHEIJEN *et al.*, 2000; VARANI; HATTORI *et al.*, 2000; P; RHYS-EVANS *et al.*, 2001; SHEEN-CHEN; CHEN *et al.*, 2001; YOSHIZAKI; MARUYAMA *et al.*, 2001; FRANCHI, SANTUCCI *et al.*, 2002; GHILARDI; BIONDI *et al.*, 2002; GIANNELLI; FRANSVEA *et al.*, 2002; GUTTMAN; STERN *et al.*, 2004; RIJKEN; BRUIJNZEEL *et al.*, 2004; TAKEUCHI; HISANAGA *et al.*, 2004; XIE; SUN *et al.*, 2004; De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005; GU; LI *et al.*, 2005; KARAVASILIS; MALAMOU-MITSI *et al.*, 2005; MATSUMARA; OUE *et al.*, 2005; PATEL; SHAH *et al.*, 2005; SIVULA; TALVENSAARI-MATTILA *et al.*, 2005; ZHANG; JIN *et al.*, 2005; GOROGH; BEIER *et al.*, 2006; HEIKKILA; SUOJANEN *et al.*, 2006; HOIKKALA;

PAAKKO *et al.*, 2006; SONG; SON *et al.*, 2006; EI HOUDA; BADOUAL *et al.*, 2007; HERSZENYI; HRITZ *et al.*, 2007; ISLEKEL; OKTAY *et al.*, 2007; LIU; LIU *et al.*, 2007; VAIRAKTARIS; VASSILIOU *et al.*, 2007); ou em linhagens celulares (CHICOINE; ESTEVE *et al.*, 2002; STEARNS; WANG *et al.*, 2003; MORGAN; HILL, 2005; GOROGH; BEIER *et al.*, 2006). Contudo, alguns estudos ainda não encontram tal relação ou até mesmo demonstram o inverso (TALVENSAARI-MATTILA; TUPEENNIEMI-HUJANEN, 2005a; 2005b; RUOKOLAINEN; PAKKO *et al.*, 2006).

No que concerne especificamente o câncer na região de cabeça e pescoço, um importante estudo a ser comentado é o de Wiegand et al (2005) que estudaram o padrão de expressão de MMP em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por meio de metaanálise, com o objetivo de determinar um único e exato valor para a predição quantitativa de risco. Embora 29 artigos tenham sido encontrados relatando expressão de MMP em CEC de cabeça e pescoço (HNSCC), apenas 14 estudos apresentaram dados originais, envolvendo 710 pacientes. Foram estudadas as MMPs 1 (2), 2 (7), 3 (3), 9 (5) e 14 (4). Os autores argumentaram que correlações positivas podem ser excessivamente representadas devido a diversos fatores, como a tendência de serem publicados apenas resultados positivos. Outro problema é que diversos estudos incluíram pacientes em diferentes estágios da doença, e poucos estudos usaram análise multivariativa para correlacionar expressão de MMP com o estágio do tumor ou metástase em linfonodo. Ainda, os níveis de MMP podem ser determinados por diferentes procedimentos. Diferentes anticorpos foram utilizados; os estudos diferiram quanto sua definição de expressão positiva ou negativa de MMP. A limitação dos dados permitiu aos autores assumirem que o risco para metástase em linfonodo está aumentado em pacientes com HNSCC positivos para MMP 2, e que há um risco aumentado para metástase em linfonodo em pacientes com tumores com expressão de MMP 3 ou 14. Em conclusão, baseados na heterogeneidade da coleta de dados, desenho do estudo, análise estatística, metodologia e avaliação dos protocolos, a metaanálise dos estudos que investigaram a expressão imunohistoquímica de MMPs no processo de invasão e metástase de HNSCC deixou incerto o papel da expressão de MMPs em carcinomas de cabeça e pescoço.

Kurarara (1999) e colaboradores avaliaram a expressão de diversas MMPs (1, 2, 3, 9) em tumores de cabeça e pescoço (língua, soalho bucal, mucosa jugal, palato), e observaram que em casos invasivos e metastáticos houve expressão

marcante de MMP 1, 2, 3 e 9, e tal associação foi também significativa com relação ao envolvimento de linfonodos.

Também em 1999, a mesma equipe (IKEBE; SHINOHARA *et al.*, 1999) avaliou se a atividade gelatinolítica em tecidos tumorais bucais estava associada à invasão e metástase. A atividade gelatinolítica se correlacionou com o grau de marcação imunoistoquímica, e casos com alto grau de invasão mostraram aumento na atividade gelatinolítica tanto para MMP 2 como para MMP 9. O mesmo não foi encontrado em relação à metástase.

Em 2000, Kurahara e colaboradores avaliaram a expressão de MMPs 2 e 9 em carcinomas espinocelulares de boca quanto ao potencial metastático. A imunoistoquímica demonstrou que aumento de MMP 2 não foi correlacionado com metástase tanto na forma ativa ou não, ao contrário da forma ativa de MMP 9, que teve aumento estatisticamente significativo nos casos metastáticos. Os autores sugeriram a MMP 9, principalmente, como um marcador de prognóstico para metástase em CECs orais.

Outros autores (P; RHYS-EVANS *et al.*, 2001) estudaram o perfil das MMPs (1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 13, 14) e seus dois principais inibidores (TIMPs 1 e 2) em 54 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, com o uso de RT-PCR, Western blot, ELISA e zimografia. Os resultados obtidos foram correlacionados com dados clínico-patológicos, invasão e metástase. Os autores observaram que a superexpressão de múltiplas MMPs é característica em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, e análise de MMPs específicas, MMP 9 em particular, pode ser útil na avaliação do potencial maligno neste tipo de tumor.

Também Yoshizaki e colaboradores (2001) avaliaram a relação e valor prognóstico de MMP 2, MT1-MMP and TIMP 2 em CEC de língua, por meio de análise imunoistoquímica e zimografia, e encontraram, em 51 CECs de língua, uma marcante correlação entre a expressão de MT1-MMP e MMP 2. Embora o número de células TIMP 2 positivas tendesse a ser menor que o de MMP 2 e MT1-MMP, a expressão de TIMP 2 se correlacionou significativamente com ambas. Alta expressão de MMP 2 se correlacionou com metástase positiva em linfonodo cervical e estadiamento clínico avançado no início do tratamento, mas não mostraram correlação significativa com o estadiamento do tumor. MMP 2, MT1-MMP e TIMP 2 positivas mostraram uma correlação significativamente grande com recorrência de metástase local linfonodal e à distância, e correlação inversa com a sobrevida livre

da doença. Estes dados sugerem que tais proteínas não estão associadas ao crescimento tumoral, mas à habilidade do mesmo em gerar metástase. Os autores assumem que a correlação das proteínas com a recorrência local pode ser devida à destruição da MEC, que permite com que células se espalhem localmente e distantes da fronteira de invasão. Fatores que representem o potencial de invasão e metástase como a expressão de MMPs, poderiam predizer o prognóstico dos HNSCCs.

FRANCHI e equipe (2002) analisaram a expressão das MMPs 1, 2 e 9 em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, com o objetivo de determinar se a expressão destas enzimas está correlacionada com a via da NO Sintase e o “status” do p53, assim como com a angiogênese e progressão tumoral. Realizaram para isto análise imunohistoquímica de peças fixadas em formol e embebidas em parafina para a análise das MMPs 1, 2 e 9, mediram a atividade da iNOS, avaliaram a densidade microvascular, e realizaram a análise dos exons 5-9 do gene p53 com o uso da técnica da PCR, utilizando para isto DNA extraído de secções de tecido embebido em formol. Observaram que níveis mais altos de NO na frente de invasão tumoral e presença de mutações do gene p53 estavam correlacionados com a expressão positiva da MMP 9, assim como com a angiogênese.

De Vicente (2005) realizaram um estudo coorte retrospectivo de 68 pacientes onde avaliaram a significância prognóstica de MMP 2 e 9, em carcinomas espinocelulares de boca por meio de imunoistoquímica. Vinte e oito por cento dos carcinomas bucais expressaram MMP 2, e 17,6% expressaram MMP 9. A imunoreatividade de MMP 2 foi significativamente maior em pacientes com consumo de álcool e com menos de 60 anos. Imunomarcagem de MMP 9 mostrou associação estatisticamente significativa com gradação tumoral de diferenciação e estadiamento tumoral, e também com consumo de álcool. Embora não significativa estatisticamente, foi observado que a imunoexpressão de MMP 2 e 9 era maior em pacientes com metástase linfonodal. Em pacientes sem metástase em linfonodo regional, expressão de MMP-9 demonstrou se relacionar com pobres taxas de sobrevida.

Xie e colaboradores (2004) examinaram a expressão de MMPs em carcinoma supraglótico. Amostras de 32 pacientes foram avaliados por mRNA e expressão proteica de MMPs 1, 2, 7, 8, 9, and 10, usando (RT-PCR) e imunoistoquímica.

Linfonodos cervicais foram examinados pra evidenciar metástase. Foi feita regressão logística multivariativa, e dois modelos matemáticos foram estabelecidos. Entre os seis tipos de MMPs, tanto mRNA como as proteínas de MMPs 2, 7 e 9 estavam suprarreguladas em mais de 63% dos tecidos tumorais comparados com tecido adjacente sadio, e isto foi significativamente correlacionado com metástase em linfonodo.

Guttman (2004) avaliaram a expressão de MMPs que degradam MECs, seus inibidores (TIMPs) e fatores (fator-8 e CD-34) em células tumorais, por meio de imunoistoquímica, em 23 pacientes com carcinoma de língua. Alta expressão de MMP 9 e TIMP 1 foi detectada em 60,9% e 65,2% dos espécimes, respectivamente. Invasão tumoral do músculo adjacente, metástase em linfonodo e estágio da doença ao final do período de acompanhamento foram positivamente correlacionados com contagem microvascular usando CD34, com expressão de MMP 9 ou TIMP 1. Então, MMP 9 e TIMP 1 falharam em prever a agressividade de carcinoma espinocelular de língua, mas o grau de vascularização foi indicativo da agressividade da doença. Os autores sugerem que isto pode ser utilizado como base para a seleção de pacientes para uma terapia mais intensiva.

Gorogh e colaboradores (2006) estudando 48 carcinomas espinocelulares de laringe, e 10 linhagens celulares de HNSSC, utilizando para isto RT-PCR, zimografia e imunoistoquímica, encontraram correlação positiva entre expressão de MMP-2 e metástase em linfonodo, sendo o inverso para TIMP-1 ou -2 e metástase. Observou-se que as expressões de MMP2 e -9 eram mais fortes nas células tumorais do que no estroma.

Sundelin e equipe (2005) observaram que as citocinas intra-tumorais IL-6, Fator de crescimento de hepatócito (HGF) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) estimulam células de câncer oral a aumentar a secreção de MMP 1 e 9. IL 6 teve um efeito estimulador moderado na secreção de MMP 1, assim como HGF em uma determinada linhagem celular. TNF-alfa estimulou secreção de MMP 9 em ambas linhagens de células, mas MMP-1 apenas em uma.

Baker e colaboradores (2006) compararam 38 pares de tecido tumoral e normal bucais quanto às concentrações de MMPs 1, 3, 2 e 9, e encontraram maiores concentrações das mesmas nos tecidos doentes, e alguns fatores.

Outros autores (2005) estudaram a ativação de MMP 2 e 9 por meio de zimografia em 39 pacientes com carcinomas espinocelulares de boca, classificados

como metastáticos e não-metastáticos, de acordo com o envolvimento de linfonodo regional. Os zimogramas foram analisados densitometricamente. Foi notado que as formas latentes e ativas de MMP 2 e 9, assim como atividade total de MMP 2 e 9, foram significativamente elevadas em tecidos malignos comparados aos tecidos normais adjacentes. Ativação de MMP2 foi maior (11%) do que MMP 9 (5%) em tecidos malignos

Mais recentemente, Se-Heon e colaboradores (2006) procuraram demonstrar o processo de invasão de carcinoma de língua em estágio inicial e a expressão de MMP 2 e 9, além de VEGF, por meio de imunoistoquímica em 38 tumores. Encontraram expressão para MMP 2, 9 e VEGF de 52,6, 78,9 e 52,6%, respectivamente, além de alta correlação entre VEGF e densidade microvascular, demonstrada por CD31, sendo que VEGF correlacionou-se diretamente com profundidade de invasão tumoral, mas inversamente com sobrevida livre da doença. Não foi encontrada correlação entre a expressão de MMP 2 e 9 e profundidade de invasão.

Gorough e colaboradores (2006) encontraram correlação positiva entre MMP 2 e metástase em linfonodo na avaliação de 48 carcinomas espinocelulares de laringe, mas não entre MMP 1, 9 e 10 quanto à metástase ou tamanho do tumor.

Heikkila e colaboradores (2006) demonstraram que inibidores de gelatinases diminuíram atividade gelanólítica de linhagem celular derivada de CEC de língua, por meio da inibição de MMP 2 e 9, mas sem inibir atividade colagenolítica de MMP 1, 8 ou 13.

Ruokolainen (2006) e colaboradores observaram que a superexpressão de MMP 2 foi fator prognóstico para diminuição da sobrevida em 74 pacientes com CEC de cabeça e pescoço. Contudo, não encontraram associação entre a imunoratividade de MMP-2 e parâmetros clínicos de prognóstico.

Vairaktaris (2007) observaram que determinado polimorfismo no promotor do gene de MMP 9 tem forte associação com o maior risco de desenvolvimento de câncer bucal, após analisarem o DNA de 152 pacientes. Observaram ainda que o polimorfismo aumenta o potencial de desenvolvimento tumoral apenas em estágios iniciais, sendo que na verdade é protetor em tumores avançados, provavelmente devido ao seu papel de gerar angiostatina a partir do plasminogênio.

É importante salientar que a maioria dos estudos, citados anteriormente, acerca da expressão de metaloproteinases em tumores de cabeça e pescoço

considera no mesmo trabalho doenças diferentes, como tumores de língua, lábio, soalho bucal, mucosa jugal, palato e gengiva.

Desta forma, os estudos até aqui relatados demonstram a necessidade de mais dados acerca do papel das MMPs na iniciação e progressão tumoral em carcinomas do soalho bucal.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 em função dos dados demográficos, clínicos, microscópicos e da densidade de microvasos em carcinomas espinocelulares de soalho bucal. Especificamente pretende-se:

1. Descrever os diferentes padrões de expressão das metaloproteinases 2 e 9 nos carcinomas espinocelulares de soalho bucal avaliados.
2. Quantificar a expressão de MMP 2 e MMP 9;
3. Correlacionar a expressão das enzimas com características demográficas (sexo, idade), características microscópicas tumorais (embolização, invasão perineural, invasão óssea, grau de diferenciação), parâmetros clínicos (estadiamento clínico, sobrevida), e correlacionar a quantidade de vasos presentes com os achados clínicos e microscópicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Este estudo retrospectivo foi realizado em colaboração com o Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Antônio Cândido Camargo, da Fundação Antônio Prudente, localizado na cidade de São Paulo. Com base nos critérios de elegibilidade descritos a seguir, foi possível acessar os prontuários de 123 pacientes portadores de neoplasia maligna primitiva de soalho bucal, cujo primeiro diagnóstico foi obtido no período de 1970 a 1993, dos quais 100 continham blocos e lâminas. A análise das lâminas permitiu identificar que os blocos de 41 pacientes apresentavam condições de serem utilizados para a obtenção dos cortes para a análise imunohistoquímica.

A partir desses blocos foram confeccionadas lâminas contendo cortes de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina, a fim de que se realizasse a confirmação do diagnóstico por um patologista experiente. Os tumores foram graduados histologicamente em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados, e foram obtidas informações quanto ao estadiamento tumoral (sistema TNM), embolização vascular, infiltração perineural, invasão óssea, e sobrevida dos pacientes.

4.2. Critérios de elegibilidade para o estudo

4.2.1. Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico histologicamente confirmado de neoplasia maligna primitiva do soalho bucal;
2. Pacientes tratados com registro no hospital;
3. Pacientes tratados com finalidade curativa;

4. Pacientes que receberam tratamento radioterápico paliativo, porém quando a dose de radiação administrada correspondia à dose do tratamento curativo.

4.2.2. Critérios de exclusão

1. Pacientes considerados fora de possibilidades terapêuticas no momento da admissão;
2. Pacientes que abandonaram ou interromperam o tratamento;
3. Pacientes tratados em outras instituições e encaminhados para sequência ou complementação do tratamento;
4. Pacientes tratados exclusivamente com quimioterapia antineoplásica.

4.3. Métodos

Os dados utilizados para análise nesta pesquisa foram obtidos dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (S.A.M.E.) do Hospital A. C. Camargo, da Fundação Antônio Prudente.

4.3.1. Estádio Clínico

O estadiamento das neoplasias foi realizado de acordo com as normas de classificação das neoplasias malignas, preconizadas pela União Internacional de Controle do Câncer – U.I.C.C. Tal classificação define a extensão da doença, analisando três parâmetros:

T – extensão da neoplasia primária;

N – Grau de comprometimento de linfonodos regionais;

M – Metástase à distância.

4.3.1.1. Estádio da neoplasia primária (T)

Tx – neoplasia primária não pode ser avaliada;

T0 – não há evidência de neoplasia primária;

Tis – Carcinoma “in situ”;

T1 – Neoplasia com até 2 cm em sua maior dimensão;

T2 – neoplasia entre 2 e 4 cm em sua maior dimensão;

T3 – neoplasia com dimensão maior do que 4 cm;

T4 – neoplasia invadindo estruturas adjacentes.

4.3.1.2. Estádio da metástase regional (N)

Nx – não podem ser avaliados;

N0 – não há evidência de comprometimento;

N1 - comprometimento em único linfonodo ipsilateral, com até 3 cm em sua maior dimensão;

N2a – comprometimento em linfonodo único ipsilateral, medindo entre 3 e 6 cm em sua maior dimensão;

N2b – comprometimento de múltiplos linfonodos ipsilaterais, sendo que nenhum linfonodo ultrapasse 6 cm em sua maior dimensão;

N2c – comprometimento de linfonodos bilaterais ou contralaterais, sendo que nenhum ultrapasse 6 cm em sua maior dimensão

N3 – comprometimento de um linfonodo com mais de 6 cm em sua dimensão

4.3.1.3. Estádio da metástase à distância (M)

Mx – metástase à distância não pode ser avaliada;

M0 – ausência de metástase à distância;

M1 – presença de metástase a distância.

4.3.1.4. Agrupamento por estádios clínicos (EC)

Estádio 0 – casos Tis N0 M0;

Estádio I – casos T1 N0 M0;

Estádio II – casos T2 N0 M0;

Estádio III – casos T1, T2 ou T3 com N1 e T3 N0 M0;

Estádio IV – casos T4; N2 ou 3; M1.

4.3.2. Imunoistoquímica

4.3.2.1. Procedimentos imunoistoquímicos:

4.3.2.1.1. Desparafinização

Os cortes de 5µm foram montados em lâminas silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) e colocados em estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Em seguida, acomodadas em cubas de coopler com ranhuras, passaram por três banhos de xilol de 5 minutos cada e dois banhos de etanol absoluto e um de álcool 95% de 5 minutos cada. Por último lavar e deixar as lâminas em dois banhos de PBS (Solução fosfato tamponada, pH=7,2) por 5 minutos.

4.3.2.1.2. Inativação da peroxidase endógena e das proteínas do soro

Após permanecerem por pelo menos 5 minutos no PBS, as lâminas foram transferidas para as bandejas, onde foi pingado e aspirado mais PBS, para, depois,

pingar peróxido de hidrogênio a 3% e deixar por 15 minutos. Em seguida foram lavados em PBS, aspirados e gotejados os bloqueadores de proteínas livres do soro e lavado em PBS novamente.

4.3.2.1.3. Recuperação dos epítomos

Para a recuperação dos epítomos das proteínas os cortes foram submetidos a aquecimento (95° C) em solução de tampão citrato de sódio 10mM por 30 minutos. Após o de recuperação antigênica, os cortes foram lavados em PBS e o excesso aspirado.

4.3.2.1.4. Exposição aos anticorpos

Os anticorpos primários contra as MMP 2 e 9 (AF902 e AF911, respectivamente, R&D Systems, Minneapolis) e CD31 (CD31, M-20, SC-1506, Santa Cruz Biotechnology) humanas foram diluídos em 1:250 em PBS pH 7,4 contendo BSA a 1% e pingados sobre as lâminas ficando em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram lavados com PBS, aspirados e expostos ao anticorpo secundário biotinilado, ficando por 15 min em temperatura ambiente ou no caso da MMP 9 (imunoglobulinas anti-cabra policlonal biotinilado – *Dakocytomation* cod. E0466). Ato contínuo, os cortes foram lavados com PBS 3 vezes e incubados na solução de streptavidina-peroxidase por 30 minutos. O controle negativo foi obtido pela incubação de um dos cortes com soro normal de coelho (1:1000).

4.3.2.1.5. Exposição ao substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina)

Após a exposição à solução de streptavidina-peroxidase, as lâminas foram lavadas com PBS, o excesso aspirado, e expostas ao DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidine, *Dakocytomation*) por 5 minutos.

4.3.2.1.6. Contra-coloração e montagem

Ao final dos 5 minutos do DAB, as lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas por Hematoxilina de Harris a 5% por 1 minuto. O excesso de corante foi removido por banho em água destilada, seguida de 3 banhos (rápidos) em álcool etílico absoluto e 3 banhos em xilol, em cubas de coopler com ranhura. A montagem das lâminas foi feita com resina sintética entelan® (Merck).

4.3.2.1.7. Análise histomorfométrica das imunomarcações

A avaliação das expressões de MMPs foi realizada por um examinador sem o prévio conhecimento das condições clínico-patológicas dos pacientes. Foram avaliados 20 campos por lâmina, casualizados de acordo com a quantidade estimada de campos por lâmina. Em cada campo foi contado o número de pontos de um retículo de 100 pontos que coincidiu com marcação positiva para as MMPs. Foi obtida a média dos valores, sendo esta considerada a média representativa de porcentagem do campo marcado em cada lesão. Valores acima de 10% foram considerados positivos para a classificação do “status” das MMPs (positivo ou negativo).

A densidade microvascular foi determinada utilizando o método descrito por Guttman (2004). As secções foram fotografadas em magnificação de 20X em cinco campos na área de maior densidade vascular, no tecido tumoral. Vasos de até 50 micrômetros foram considerados para a contagem. Não foram consideradas células isoladas ou grupos de células que não apresentassem luz do vaso.

4.3.3. Análise dos resultados

Estatísticas descritivas de medidas de tendência central e de variabilidade foram utilizadas para descrever as variáveis numéricas e a distribuição de freqüências para as variáveis categóricas.

Para verificar a associação entre as variáveis numéricas e os marcadores, o teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado e, em tabelas de contingência, o teste de freqüências do qui-quadrado foi aplicado. O teste exato de Fisher foi adotado quando pelo menos uma freqüência esperada foi menor do que 5 em tabelas 2X2.

O Método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar as probabilidades de sobrevida global e o teste de logrank para comparar as curvas de sobrevida.

O tempo de seguimento calculado considerou o período entre a data da cirurgia até o óbito ou a data da ultima informação efetiva.

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Com base nos prontuários dos 41 pacientes selecionados foram obtidos os dados demográficos e clínicos descritos a seguir. Os dados demográficos coletados foram sexo, idade ao diagnóstico, e condição do paciente, se vivo ou morto, no momento da última avaliação dos prontuários, realizada em cinco de novembro de dois mil e sete. As informações encontram-se descritas na tabela 1.

Da amostra obtida é interessante destacar a predominância de homens e a baixa sobrevida, apenas 4 de 36, pois 5 pacientes estavam sem acompanhamento recente, tendo sido considerados como perdidos. Dentre as outras causas de morte, observou-se AVC, infarto do miocárdio e homicídio, sendo um de cada.

Os dados clínicos relativos ao estadiamento TNM foram coletados no prontuário. A revisão das lâminas permitiu verificar: presença ou ausência de invasão perineural, embolização, invasão óssea; grau de diferenciação (bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado). Os dados relativos ao estadiamento tumoral na época do diagnóstico inicial, e às informações avaliadas durante a microscopia, estão detalhados na tabela 2.

Vale salientar que houve apenas um caso em que foi observada invasão óssea, tornando esta variável inadequada para utilização na avaliação de correlação com as variáveis moleculares e o prognóstico.

Os dados moleculares, referentes à imunomarcagem contra as metaloproteinases de matriz 2 e 9, e CD31 estão dispostos na tabela 3. Somente os pacientes cujos cortes histopatológicos apresentavam área marcada superior a 10% foram considerados positivos.

Tabela 1: Distribuição das variáveis de acordo com características demográficas

Variável	Categoria/medidas	freq (%) ou medidas
Sexo	Masculino	36 (87,8)
	Feminino	5 (12,2)
Idade ao diagnóstico	N	41
	Minima-máxima	39-95
	Mediana	55
	Média (dp)	54,8 (10,4)
Condição do paciente	Vivo sem doença	4 (9,8)
	Morte por cancer	24 (58,5)
	Morte por outras causas	8 (19,5)
	Perdido de seguimento	5 (12,2)
Tempo de seguimento	N	41
	Mínimo-máximo (dias)	12-8.171
	Mediana	788
	Media (dp)	1.897,8 (2.203,4)

Tabela 2: Distribuição das variáveis de acordo com as características clínicas

Variável	Categoria	freq (%)
Classificação histológica	I	21 (51,2)
	II	15 (36,6)
	III	5 (12,2)
Estadiamento clínico	EC1	3 (7,3)
	EC2	5(12,2)
	EC3	14 (34,5)
	EC4	19 (46,3)
Estadiamento T	T1	3 (7,3)
	T2	17 (41,4)
	T3	10 (24,4)
	T4	11 (26,8)
Estadiamento N	N0	18 (43,9)
	N1	12 (29,3)
	N2b	4 (9,76)
	N2c	6 (14,6)
	N3	1 (2,44)
Invasão neural	Negativo	28 (68,3)
	Positivo	13 (31,7)
Embolização	Negativo	30 (73,2)
	Positivo	11 (26,8)
Invasão óssea	Negativo	40 (97,6)
	Positivo	1 (2,4)

Tabela 3: Distribuição das variáveis de acordo com os marcadores moleculares

Variável	Categoria/medidas	freq (%) ou medidas
MMP-2	Negativo	19 (46,3)
	Positivo	22 (53,7)
MMP-9	Negativo	27 (65,9)
	Positivo	14 (34,1)
MVD	Mínima	10
	Máxima	46
	Mediana	22
	Média (dp)	21,3 (7,8)

Os dados demográficos, clínicos e moleculares foram cruzados para averiguar as possíveis relações entre as variáveis.

As informações correspondentes à distribuição das variáveis demográficas e clínicas de acordo com a expressão de MMP 2 e 9 estão dispostas nas tabelas 4 e 5, nas quais se observa que a marcação para MMP 2 se correlaciona com o estágio N positivo, indicando metástase em linfonodo no momento do diagnóstico inicial, enquanto a marcação para MMP 9 não se correlaciona com os dados demográficos ($p > 0,05$). A análise das variáveis demográficas e clínicas em função da densidade de microvasos indicaram menor grau de embolização nas áreas com maior densidade de microvasos (tabela 6). A presença de apenas um caso em que houve invasão óssea inviabilizou qualquer correlação entre este dado e as variáveis MMP 2, MMP 9, MVD, ou sobrevida dos pacientes.

A análise das correlações entre as variáveis moleculares (tabelas 7 – 9) mostrou que a expressão das MMPs não se correlaciona com a densidade de microvasos, entretanto, há uma correlação negativa entre as MMPs.

A probabilidade de sobrevida dos pacientes (tabela 10, figuras 1 – 5) mostra que as variáveis consideradas como fatores prognósticos estatisticamente significantes foram:

1. Estadiamento N negativo, como fator prognóstico positivo;
2. Tipo histológico, que indicou melhor prognóstico para os pacientes com tumores bem diferenciados, em relação aos tumores moderadamente ou pobremente diferenciados;
3. Ausência de invasão neural, como fator prognóstico positivo e;
4. Expressão de MMP-9, que demonstrou ser um fator indicativo de pior prognóstico.

Tabela 4: Distribuição das variáveis demográficas e clínicas de acordo com a expressão de **MMP-2**.

Variável	Categoria/medidas	negativo freq (%) ou medidas	positivo freq (%) ou medidas	p-valor
Sexo	Masculino Feminino	17 (47,2) 2 (40)	19 (52,8) 3 (60)	0,999*
Idade ao diagnóstico	N Minima-máxima Mediana Média (dp)	19 42-95 56 57,8 (11,9)	22 39-69 53,5 52,2 (8,3)	0,084**
Estádio T	T1+T2 T3+T4	9(45) 10(47,6)	11(55) 11(52,4)	0,867
Estádio N	N 0 N positivo	12 (66,7) 7 (30,4)	6 (33,3) 16 (69,6)	0,030*
Tipo histológico	Pouco + moderado (II+III) Bem diferenciado (I)	10 (50) 9 (42,9)	10 (50) 12 (57,1)	0,678
Invasão neural	Negativo Positivo	12 (42,9) 7 (53,8)	16 (57,1) 6 (46,2)	0,511
Embolização	Negativo Positivo	13 (43,3) 6 (54,5)	17 (56,7) 5 (45,5)	0,524
Invasão óssea	Negativo Positivo	18 (45) 1 (100)	22 (55) 0 (0)	NA

NA – não se aplica

p-valor obtido pelo teste do Qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

**p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 5: Distribuição das variáveis demográficas e clínicas de acordo com a expressão de **MMP-9**

Variável	Categoria/medidas	Negativo	Positivo	p-valor
		freq (%) ou medidas	freq (%) ou medidas	
Sexo	Masculino	25 (69,4)	11 (30,6)	0,317*
	Feminino	2 (40)	3 (60)	
Idade ao diagnóstico	N	27	14	0,783**
	Minima-máxima	40-95	39-67	
	Mediana	54	55	
	Média (dp)	55,48 (11,5)	53,5 (8,1)	
Estádio T	T1+T2	15 (75)	5 (25)	0,228
	T3+T4	12 (57,1)	9 (42,9)	
Estádio N	N 0	14 (77,8)	4 (22,2)	0,154
	N positivo	13 (56,5)	10 (43,5)	
Tipo histológico	Pouco + moderado (II+III)	12 (60)	8 (40)	0,440
	Bem diferenciado (I)	15 (71,4)	6 (28,6)	
Invasão neural	Negativo	20 (71,4)	8 (28,6)	0,307*
	Positivo	7 (53,8)	6 (46,2)	
Embolização	Negativo	19 (63,3)	11 (36,7)	0,709*
	Positivo	8 (72,7)	3 (27,7)	
Invasão óssea	Negativo	27 (67,5)	13 (32,5)	NA
	Positivo	0 (0)	1 (100)	

NA – não se aplica

p-valor obtido pelo teste do Qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

** p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 6: Distribuição das variáveis demográficas e clínicas de acordo com a **MVD**

Variável	Categoria/medidas	≤21	>21	p-valor
sexo	Masculino	18 (50)	18 (50)	0,999*
	Feminino	2 (40)	3 (60)	
Idade ao diagnóstico	N	20	21	0,140**
	Minima-máxima	42-67	39-95	
	Mediana	57	53	
	Média (dp)	56 (6,9)	56,7(12,9)	
Estádio T	T1+T2	12 (60)	8 (40)	0,161
	T3+T4	8 (38,1)	13 (61,9)	
Estádio N	N 0	7 (38,9)	11 (61,1)	0,262
	N positivo	13 (56,5)	10 (43,5)	
Tipo histológico	Pouco + moderado (II+III)	12 (60)	8 (40)	0,161
	Bem diferenciado (I)	8 (38,1)	13 (61,9)	
Invasão neural	Negativo	14 (50)	14 (50)	0,819
	Positivo	6 (46,1)	7 (53,9)	
Embolização	Negativo	10 (33,3)	20 (66,7)	0,001*
	Positivo	10 (91,9)	1 (9,1)	
Invasão óssea	Negativo	19 (47,5)	21 (52,5)	NA
	Positivo	1 (100)	0 (0)	

NA – não se aplica

p-valor obtido pelo teste do Qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

**p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 7: Distribuição das variáveis moleculares de acordo com a **expressão de MMP-2**

Variável	Categoria/medidas	Negativo	Positivo	p-valor
		freq (%) ou medidas	freq (%) ou medidas	
Status MMP-9	Negativo	15 (55,6)	12 (44,4)	0,100*
	Positivo	4 (28,6)	10 (71,4)	
MD MMP-9	N	19	22	0,070*
	Min-max	0-14	2-30	
	Mediana	6	9	
	Média (dp)	6,36 (3,9)	10,9 (8)	
MVD	MDV	19	22	0,655*
	Min-max	10-39	12-46	
	Mediana	23	19,5	
	Média (dp)	21,7 (7,8)	21 (8)	

*p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 8: Distribuição das variáveis moleculares de acordo com a expressão de MMP-9

Variável	Categoria/medidas	Negativo	Positivo	p-valor
		Freq (%) ou medidas	Freq (%) ou medidas	
Status MMP-2	Negativo	15 (79)	4 (21)	0,100
	Positivo	12 (54,5)	10 (45,5)	
MD MMP-2	N	27	14	0,018**
	Min-max	0-30	0-29	
	Mediana	3	16,5	
	Média (dp)	8,8 (10,1)	16,6 (9,3)	
MVD	N	27	14	0,424**
	Min-max	12-46	10-30	
	Mediana	22	19,5	
	Média (dp)	22,2 (8,4)	19,7(6,7)	

p-valor obtido pelo teste do qui-quadrado

*p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

**p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 9: Distribuição das variáveis moleculares de acordo com a **MVD**

Variável	Categoria/medidas	<=21	>21	p-valor
MD MMP-2	N	20	21	0,926**
	Minima-máxima	0-28	0-30	
	Mediana	11	11	
	Média (dp)	11,6 (10,7)	11,4 (10,4)	
Status 2	Negativo	9 (47,4)	10 (52,6)	0,867
	positivo	11 (50)	11 (50)	
MD MMP-9	N	20	21	0,582**
	Minima-máxima	0-30	0-26	
	Mediana	8	7	
	Média (dp)	9,7(7,9)	8(5,6)	
Status 9	Negativo	13 (48,1)	14 (51,9)	0,910
	positivo	7 (50)	7 (50)	

p-valor obtido pelo teste do Qui-quadrado

**p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 10: Probabilidade de sobrevida dos pacientes de acordo com as características demográficas, clínicas e moleculares

Variável	Categoria/medidas	Sobrevida (%) 5 anos	Sobrevida (%) 10 anos	p-valor
Sobrevida	Global	36,6	30,6	
Sexo	Masculino	38,9	32,0	0,265
	Feminino	20,0	20,0	
Faixa etária ao diagnóstico	≤ 55	41,7	36,1	0,252
	> 55	29,4	23,5	
Estádio T	T1+T2	40,0	34,3	0,944
	T3+T4	33,3	27,2	
Estádio N	N 0	55,6	43,2	0,006
	N+	21,7	21,7	
Tipo histológico	Pouco + moderado (II+III)	15,0	10,0	0,036
	Bem diferenciado (I)	57,1	51,1	
Invasão neural	Negativo	50,0	41,1	0,013
	Positivo	7,7	7,7	
Embolização	Negativo	43,3	35,61	0,503
	Positivo	18,1	18,1	
Invasão óssea	Negativo	37,5	31,7	NA
	Positivo	0,0		
Status MMP-2	Negativo	47,4	36,8	0,291
	Positivo	27,3	27,3	
Status MMP-9	Negativo	48,1	39,4	0,050
	Positivo	14,3	14,3	
MVD	≤ 21 (n=20)	35,0	35,0	0,880
	> 21 (n=21)	38,1	28,6	

NA – não se aplica

p-valor obtido pelo teste do logrank

Figura 1. Curva de sobrevida global dos pacientes.

Figura 2. Curva de sobrevida de acordo com estadiamento N.

Figura 3. Curva de sobrevida de acordo com o subtipo histológico.

Figura 4. Curva de sobrevida de acordo com a invasão neural.

Figura 5. Curva de sobrevida de acordo com o status de MMP-9.

No presente estudo, metaloproteinase 2 foi mais notoriamente expressa por fibroblastos do estroma tumoral (figura 6), e menos por células tumorais ou células inflamatórias (figuras 7 e 8, respectivamente).

Ficou também evidente que a expressão da MMP 9 se concentrou nas regiões tumorais ricas em infiltrado inflamatório (figura 9 e 10), predominantemente por células semelhantes a macrófagos (figura 11) e algumas vezes em células tumorais (12).

As figuras 13 e 14 mostram o resultado de marcação com o CD31, para endotélio vascular. A marcação facilitou a identificação dos microvasos, possibilitando sua contagem e obtenção do valor de MVD.

O controle negativo das reações pode ser observado nas figuras 15 e 16.

Figura 6. Imunomarcação difusa de MMP 2 no estroma tumoral (10X).

Figura 7. Imunomarcação difusa de MMP 2 no estroma tumoral, e tecido tumoral com marcação mais tênue (40X).

Figura 8. Imunomarcação de MMP 2 (40X). Notar que a marcação ocorre no estroma de forma mais difusa, em células mais alongadas, e não de forma localizada no infiltrado inflamatório, como com a MMP-9.

Figura 9. Imunomarcação de MMP 9 em área com abundante infiltrado inflamatório (10X).

Figura 10. Limite entre epitélio tumoral e tecido conjuntivo com muito infiltrado inflamatório. Notar forte expressão de MMP 9 nas células inflamatórias (40X).

Figura 11. Células morfológicamente semelhantes a macrófagos (setas) imunomarcadas com anti-MMP 9 (40X).

Figura 12. Imunomarcação de MMP-9 em células tumorais. Notar que a marcação não é difusa, mas concentrada em algumas células (40X).

Figura 13. Exemplo de imunomarcações em carcinomas espinocelulares de assoalho bucal, realizadas com anticorpo CD31, o que evidenciou a localização do endotélio vascular (contra-coloração com Hematoxilina de Harry) (40X). Este padrão de imunomarcação foi utilizado na contagem dos vasos, para a avaliação da densidade microvascular (MVD).

Figura 14. Imunomarcacão com CD31 permitindo a identificacão de microvasos (20x).

Figura 15. Exemplo de controle negativo das reacões (10X).

Figura 16. Exemplo de controle negativo das reações (40X).

6 DISCUSSÃO

Seria muita pretensão nossa imaginar que estudando duas ou três moléculas iremos encontrar a cura do câncer (Dr. Fernando Soares).

6 DISCUSSÃO

6.1. Concepção do estudo

As metaloproteinases 2 e 9 possuem íntima relação com o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e remodelação da matriz extracelular, acontecimentos cruciais no processo de invasão e metástase tumoral. Invasão e metástase podem ser avaliadas microscopicamente e clinicamente; a expressão das MMPs, e a quantificação de vasos sanguíneos podem ser avaliadas por meio de técnica imunoistoquímica.

6.2. Amostra

A maioria dos trabalhos na literatura deixa de relatar os dados demográficos dos pacientes, como idade e sexo (KURAHARA; SHINOHARA *et al.*, 1999; IMPOLA; UITTO *et al.*, 2004; SEO; LEE *et al.*, 2005).

De Vicente (2005) relatou que a grande maioria (79,9%) dos pacientes de seu estudo eram homens, e a idade variou de 27 a 87 anos, observação corroborada pelo presente estudo, no qual houve a incidência de 87,8% de homens, com idade variando entre 39 e 95 anos.

Naquele mesmo estudo, com 68 pacientes (De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005), nota-se que apenas 17 casos representavam CECs de soalho bucal, e os restantes de lábio, língua, gengiva, palato e mucosa jugal. Isto é uma constante na literatura. Outro trabalho (IKEBE; SHINOHARA *et al.*, 1999) analisando 57 casos, divididos em metastáticos ou não, apresenta apenas 7 casos de soalho bucal, sendo o restante de gengiva, mucosa jugal e palato. Kurahara (1999), em 96 biópsias (58 não-metastáticas, 38 metastáticas), estudou tumores de língua, gengiva mandibular e maxilar, mucosa jugal, palato, e apenas 10 casos de soalho bucal. Da mesma forma, Seong-Doo Hong (2000) avaliou 25 CECs não metastáticos e 19 metastáticos, sem fazer divisão da amostra por área afetada. Outros autores (2004)

avaliou a expressão de MMP 9 comparativamente entre hiperplasias bucais, carcinomas espinocelulares e verrucosos de boca, e obteve diferentes expressões daquela gelatinase nas diferentes lesões. Mas, de um total de 59 casos, 15 eram CECs bucais, e não foi feita a distinção quanto à localização do tumor.

O período de acompanhamento é um ponto importante para que se possa fazer uma correlação eficiente entre as variáveis estudadas. De Vicente (2005) obteve um tempo de observação de 4 a 128 meses, média de 56,4 meses, enquanto que no atual trabalho o menor tempo de acompanhamento foi de 12 dias, devido à morte do paciente, e o maior de pouco mais de 270 meses (22,5 anos). Os estudos citados anteriormente não relatam tempo de acompanhamento.

Desta forma, é importante destacar que o número da amostra do presente estudo, bem como a longa preservação, conferem um peso importante aos resultados obtidos, pois minimiza as variáveis advindas do estudo da estratificação excessiva dos diversos tipos e localizações dos carcinomas.

6.3. Metodologia

No presente estudo utilizou-se anticorpos anti-MMP2 e 9 com especificidade para a forma pro e ativa das gelatinases. Desta forma, as imunomarcações não identificam exclusivamente a forma ativa. Ikebe (1999) relatou pela primeira vez a correlação positiva entre a imunomarcação para MMP-2 e -9, utilizando anticorpos monoclonais que também reconhecem tanto a forma latente como a forma ativa das gelatinases, e a atividade gelatinolítica determinada por meio de zimografia. Assim, a despeito de ser possível identificar ambas as formas, a correlação entre a presença das proteínas e sua atividade tem sido documentada (De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005). Ainda, a análise zimográfica de carcinomas espinocelulares de boca demonstrou que ambas as formas latentes e ativas de MMP 2 e 9, assim como atividade total de MMP 2 e 9, foram significativamente elevadas em tecidos malignos comparados aos tecidos normais adjacentes (PATEL; SHAH *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que um desafio significativo da imunoistoquímica é a determinação da intensidade da marcação, pois esta apresenta grande variabilidade. O estudo do padrão de expressão de MMP 2 e 9 em CEC tem apresentado, em sua

grande maioria, análises subjetivas ou semi-quantitativas, atribuindo escores aos diferentes níveis de imunomarcação. Ainda, os autores não são explícitos quanto aos parâmetros utilizados para a determinação destes escores para avaliar o padrão de imunomarcação das MMPs em CEC (IKEBE; SHINOHARA *et al.*, 1999; KURAHARA; SHINOHARA *et al.*, 1999; HONG; HONG *et al.*, 2000; De VICENTE; FRESNO *et al.*, 2005). No presente estudo, consideramos a expressão de MMPs simplesmente como positiva ou negativa, avaliada por um único observador (FRANCHI; SANTUCCI *et al.*, 2002), tomando como valor de corte uma expressão >10% para que a marcação fosse considerada positiva, estando em acordo com a metodologia utilizada por (GUTTMAN; STERN *et al.*, 2004).

Ressalte-se que a análise imunoistoquímica é fortemente influenciada pela qualidade da imunomarcação obtida, pois, se a marcação de fundo não for controlada, a identificação da marcação será comprometida. Neste estudo houve uma atenção especial à técnica de imunoistoquímica, podendo ser verificada a ausência de marcação de fundo nos controles negativos (figuras 15 e 16) e a nítida marcação nos diferentes espécimes.

De Vicente (2005) evitou a contagem de áreas com inflamação intensa. Uma vez que se tem relatado a forte correlação entre o processo inflamatório e a progressão do câncer, desconsiderar a imunomarcação em células inflamatórias pode tendenciar a análise dos resultados. Já é conhecido que o componente inflamatório de uma neoplasia em desenvolvimento inclui uma população diversa de leucócitos – neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos – todas capazes de produzirem citocinas, mediadores, proteases, MMPs, e interleucinas, dentre outros (COUSSENS; WERB, 2002). Na verdade, há evidências de que tumores malignos podem surgir em áreas de infecção ou inflamação simplesmente como parte da resposta normal do hospedeiro, sendo desta forma, iniciados pela inflamação (SHACTER; WEITZMAN, 2002). Durante a progressão do câncer, a microecologia do tecido hospedeiro é um participante ativo da evolução tumoral. A invasão ocorre na interface tumor-hospedeiro, onde o tumor e células estromais trocam enzimas e citocinas que modulam a MEC e estimulam a migração tumoral (CHANG; WERB, 2001).

No presente estudo houve uma preocupação particular em utilizar-se uma ferramenta paramétrica para a avaliação da imunomarcação (retículo) com o intuito de explorar ao máximo toda a área da lesão (analisando 20 campos aleatoriamente

distribuídos pela lesão) e avaliar as imunomarcações tanto no epitélio como no conjuntivo. A determinação do número de campos analisados (20) foi determinada pelo seguinte método:

- a) Casualização sistemática (WEIBEL, 1969);
- b) Teste de homogeneidade da amostra utilizada na contagem de pontos, obtida através do esquema de casualização sistemática, foi verificado pelo teste do qui-quadrado múltiplo (χ^2), com valor crítico de 33,098;
- c) Coeficiente de variação da proporção (erro) da densidade de volume (SCHAEFER, 1970).

Esta estratégia permitiu constatar uma forte correlação entre a positividade para MMP-2 e a metástase ($p = 0,030$) em linfonodo, enquanto que de Vicente (2005) sugeriu tal correlação, mas não encontrou significância estatística. A não convergência dos resultados pode ser devido às diferentes estratégias utilizadas quanto à seleção da área analisada e composição da amostra. De Vicente (2005) excluiu na contagem o estroma tumoral, mas há estudos que revelaram que embora muitas células tumorais produzam MMPs, as proteases são com frequência abundantemente expressas por células estromais localizadas adjascentes à fronteira de invasão tumoral (HEPPNER; MATRISIAN *et al.*, 1996). Logo, tal padrão de expressão das MMPs em tumores varia de acordo com a função de cada MMP e também com o tipo de câncer (YOSHIZAKI; MARUYAMA *et al.*, 2001; GOROGH; BEIER *et al.*, 2006). Entretanto, há resultados divergentes (HONG; HONG *et al.*, 2000; RUOKOLAINEN; PAAKKO *et al.*, 2006).

O microambiente estromal, antes considerado apenas como uma estrutura de suporte passivo, foi reconhecido como um fator dinâmico e efetivo na progressão tumoral. Além das células estromais, este ambiente contém matriz extracelular, fatores de crescimento, enzimas regulatórias, proteases e seus inibidores. Vasos, nervos e células do sistema imune também são participantes importantes deste processo. Logo, muitas etapas durante invasão e metástase requerem interações específicas entre células tumorais e a matriz extracelular. O fenótipo invasivo depende da habilidade das células tumorais em atacar a MEC, degradar os componentes da matriz, e finalmente migrar por tal matriz parcialmente degradada (NICOLSON; NAKAJIMA *et al.*, 1998).

6.4. Carcinoma espinocelular e MMP 2 e 9

A maioria, se não todos os cânceres, adquirem o mesmo conjunto de funções ectópicas durante seu desenvolvimento: aumento da sinalização de crescimento durante hiperplasia e displasia, invasão tecidual, angiogênese enriquecida e metástase (HANAHA; WEINBERG, 2000). Cada um destes passos representa uma evasão da regulação normal de células e tecidos.

As metaloproteinases são os reguladores extrínsecos de cada uma destas funções durante não apenas a transformação maligna, mas também no desenvolvimento normal (VU; WERB, 2000). A sinalização intercelular entre diversos tipos celulares em uma massa tumoral é tão importante quanto a sinalização intracelular adquirida na autonomia de crescimento. Células tumorais bem-sucedidas são, portanto, aquelas que induzem a liberação de sinais estimuladores de crescimento pelas células vizinhas.

Devido ao fato de metaloproteinases degradarem proteínas da MEC, sua função primária tem sido assumida como a remodelação da mesma. Entretanto, MMPs também agem em outros substratos que não a MEC, incluindo reguladores de crescimento da superfície celular ligados à MEC, liberando-os de seus “estoques” (CHANG; WERB, 2001).

Durante a progressão do câncer, a microecologia do tecido hospedeiro é um participante ativo da evolução tumoral. A invasão ocorre na interface tumor-hospedeiro, onde o tumor e células estromais trocam enzimas e citocinas que modulam a MEC e estimulam a migração tumoral. Mecanismos similares ocorrem na invasão fisiológica e tumoral. Em ambos os casos, o passo limitante é a quebra das barreiras do tecido conjuntivo, compreendendo o colágeno, lamininas, fibronectina, vitronectina e proteoglicanas, o que requer a ativação das MMPs. A diferença entre elas é que a invasão fisiológica é regulada, enquanto que a tumoral parece ser perpétua (CHANG; WERB, 2001).

A matriz extracelular bloqueia a metástase tumoral não apenas por ser uma barreira física, mas também porque forma um microambiente auto-protetor, resistente à apoptose. Contudo, há evidências de que os componentes da ECM apóiam de certa forma a metástase, como no caso do aumento da expressão de fibronectina em estados metastáticos (CLARK; GOLUB *et al.*, 2000). Portanto, as

células tumorais devem interagir com certas moléculas da MEC para metastizarem e se estabelecer em novos sítios. Outras moléculas também estão implicadas na metástase, e quimiocinas podem determinar a direção de migração (MULLER; HOMEY *et al.*, 2001). As MMPs, por exemplo, podem regular a biodisponibilidade de tais quimiocinas.

Encontramos imunomarcção pontual de MMP 2 na membrana basal, em áreas não marcadas por epitélio (figura 17). Isto poderia sustentar os achados de Bergers *et al.* (2000) e Saad *et al.* (2002), que sugerem que células tumorais estimulam a expressão de MMPs no ambiente que as rodeia, para promover a degradação catalítica da MEC pelas células do hospedeiro

Figura 17. Imunomarcção de MMP 9 na lâmina basal (setas), o que poderia sugerir um estímulo do tumor para que o tecido do hospedeiro produza fatores que favoreçam a invasão (40X).

Decorre, então, que as metaloproteinases realmente degradam a MEC, mas seu papel vai muito além. Por sua habilidade em degradar o colágeno tipo IV, a atividade das metaloproteinases libera para o ambiente em que se encontram fatores antes aprisionados na MEC, que a partir deste momento podem agir em vasos e células próximas. Tais fatores podem contribuir para, mas também inibir o crescimento tumoral. Como exemplo, as MMPs possuem a habilidade de quebrar

moléculas, como o plasminogênio, gerando subprodutos ativos, no caso a angiostatina, um potente inibidor da proliferação angioblástica. Apesar de gerar angiostatina, um inibidor da proliferação vascular, a atividade das MMPs abre caminho na MEC para o desenvolvimento de novos vasos e para a invasão celular.

A expressão das MMPs também pode ocorrer distintamente em diferentes tipos de tumor, e a avaliação desta expressão é complexa. Geralmente os estudos demonstram que quanto maior a expressão de MMPs, mais invasivo o tumor. Porém, há estudos que contradizem tais dados (TALVENSARI-MATTILA; TUPEENNIEMI-HUJANEN, 2005a; 2005b).

Inicialmente se imaginava que as células tumorais eram as principais produtoras de MMPs, em particular as da fronteira de invasão. De fato, tem-se demonstrado que em determinados tipos de câncer as células tumorais não secretam tais enzimas, mas estimulam as células do estroma a secretarem, abrindo espaço para a invasão tumoral (HEPPNER; MATRISIAN *et al.*, 1996; DeCLERK, 2000), como observado no presente estudo.

De acordo com Sun (2001), na invasão tumoral, a maioria da MMPs é produzida pelas células estromais do hospedeiro, mas sua expressão é regulada pelas células tumorais por meio de quimiocinas, citocinas e indutores de MMPs. Tais indutores estão enriquecidos na superfície das células tumorais, induzindo a produção de MMPs pelas células estromais, que por sua vez ativam a invasão tumoral. Logo, é fundamental estudar os fatores do tumor que estimulam o estroma.

Constatou-se na figura 10 a mínima marcação no epitélio em oposição à intensa marcação em células inflamatórias no conjuntivo e à seletiva imunomarcação em células semelhantes a fibroblastos na lâmina basal. Esta observação vem reforçar a hipótese de que as células tumorais estimulam as células vizinhas a produzir MMPs e degradar a MEC a fim de permitir a metástase (SUN; HEMLER, 2001; ZHANG; CHEN *et al.*, 2004; LIU; LIU *et al.*, 2007).

Não há consenso em relação aos tipos celulares mais diretamente responsáveis pela produção e expressão de enzimas que colaboram no processo de progressão tumoral. Farias e colaboradores (FARIAS; RANUNCOLO *et al.*, 2000) afirmaram que células tumorais produzem níveis mais elevados de enzimas proteolíticas do que células normais. Entretanto, Gorogh (2006) afirmou que a produção de MMP pelo estroma pode ser uma característica dos tumores que já perderam sua capacidade de produzir MMP por si, devido à dediferenciação. Outra

explicação seria a de que cada MMP específica é preferencialmente produzida por um tipo celular específico.

De acordo com a literatura, algumas MMPs são sintetizadas principalmente por células tumorais (MMP-7), enquanto que outras MMPs (2 e 9) são mais produzidas por células estromais nos tumores, como fibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais (EGEBLAD; WERB, 2002). Rosenthal e colaboradores (ROSENTHAL; MATRISIAN, 2006), por exemplo, descreveram que fibroblastos do estroma tumoral, mais propriamente do que as células tumorais são os responsáveis pela maior parte da MMP-1 produzida (GOROGH; BEIER *et al.*, 2006).

A imunomarcagem para MMP 9 foi predominante em células inflamatórias, embora algumas células tumorais também tenham expressado a proteína, mas em menor proporção. Nesta situação, pode-se supor que quanto maior a reação inflamatória gerada pelo tumor, maior será a expressão de MMP 9, e maior será invasão tumoral decorrente desta gelatinase. Pode inferir que maior dissolução da matriz criará espaço para a massa tumoral, facilitando também a angiogênese intratumoral, e reduzindo a aderência celular aos componentes da matriz, sustentando a metástase.

Observou-se no presente estudo que a MMP 2 mostrou-se mais fortemente expressa no estroma tumoral, marcada em células fusiformes semelhantes a fibroblastos. Entretanto, Noël e equipe (1998) enfatizaram a importância dos fibroblastos na progressão do câncer, quando demonstraram que células MCF7, que superproduziam TIMP-2, injetadas em camundongos aboliam o efeito promotor de câncer nos fibroblastos. Novamente, isso não significa que neste estudo células tumorais não expressaram a mesma proteína. O fizeram, mas com menor frequência. Tais observações vão ao encontro do que observou Saad (2002), que mostrou que células metastáticas podem usar MMP 2 produzidas por células adjacentes normais para facilitar sua invasão e metástase.

Em praticamente todas as lâminas observadas a MMP 2 foi raramente observada nas células inflamatórias. Este dado se apóia na literatura pertinente, e nos leva a crer que a invasão propiciada pela MMP 2 não é influenciada pelo grau de inflamação gerado pelo tumor. Neste momento, contudo, devemos fazer as mesmas ressalvas feitas anteriormente para MMP-9, isto é, o processo de invasão

tumoral não pode ser levado em conta apenas pelo lado da remodelação e/ou degradação da MEC.

Logo, Inflamação crônica associada a alguns cânceres pode futuramente estimular a progressão tumoral devido à liberação de MMPs das células inflamatórias (COUSSENS; RAYMOND *et al.*, 1999; COUSSENS; TINKLE *et al.*, 2000), mas pode também promover a liberação de compostos que impeçam a progressão tumoral.

É certo que angiogênese é necessária para a persistência do crescimento tumoral, pois os vasos em crescimento são condutores para as trocas gasosas e suprimento de nutrientes (CARMELIET; JAIN, 2000; JOHNSTONE; LOGAN, 2007). Sem crescimento vascular a massa tumoral fica restrita a uma distância de difusão tecidual de aproximadamente 0,2 mm. MMPs e TIMPs são reguladores essenciais durante as varias fases do processo de angiogênese, desde a deposição e quebra da membrana basal das estruturas vasculares, à proliferação e migração endotelial. Mas parte da influência das MMPs na angiogênese é mediada por seus efeitos em moléculas pró-angiogênicas (VEGF e angiopoetina) e anti-angiogênicas (angiostatina). Portanto, durante angiogênese, MMPs podem possuir tanto um papel pró-angiogênico como anti-angiogênico (CHANG; WERB, 2001). MMP-9 gera também endostatina e tumstatina, um fragmento do domínio não colagênico da cadeia alfa-3 do colágeno tipo IV (BJORKLUND; KOIVUNEN, 2005). Visto isso, considerou-se plausível a ausência de relação dentre a densidade microvascular e a expressão das MMPs estudadas. Os atuais resultados confirmam em parte os de Guttman (2004), que também não encontrou correlação entre expressão de MMP 9 e contagem de vasos, mas encontrou correlação entre a contagem de vasos e a agressividade do tumor. Franchi (2002), contudo, observou relação positiva entre MMP 9 e angiogênese.

A predição pré-operatória de metástase em linfonodo pode ser muito útil na determinação de qual a extensão necessária para a incisão em um determinado caso, assim como qual o tipo de terapia pós-operatória deverá ser considerada, se uma terapia única, ou uma terapia integrada com quimio e radioterapia. A patologia molecular talvez seja muito mais eficiente em encontrar uma medida efetiva, com valores confirmativos da predição de metástase, em carcinomas de cabeça e pescoço. Quanto a isto, os biomarcadores associados à degradação de MEC podem ser valiosos para atingir tal objetivo, visto que as células tumorais que invadem

tecidos vizinhos e migram para além do foco inicial, para formar metástase, devem penetrar na barreira da MEC antes, o que significa que enzimas que degradam estes tipos de barreiras são necessárias, e estão mais ativas do que o usual no processo metastático (XIE; SUN *et al.*, 2004; De AGUIAR; KOWALSKI *et al.*, 2007) demonstraram que há correlação entre recorrência do CEC e alguns marcadores imunoistoquímicos.

De acordo com Ludwig e Weinstein (2005), a melhoria de um sistema como o TNM pode trazer vantagens, mas tem seu preço. De acordo com os autores, a incorporação de informações médicas mais atuais, como os marcadores, eliminaria a vantagem de um sistema estático, onde os pacientes podem ser estratificados em seleções clínicas, para comunicação entre os médicos e para padronização dos tumores entre instituições e nações. A mudança frequente nos critérios de classificação tornaria difícil a caracterização da relevância de pesquisas clínicas atuais para pacientes futuros, que seriam classificados de forma diferente. Uma solução a este paradoxo seria a utilização de um sistema estático, com atualizações esporádicas, como no caso do TNM, juntamente com informações complementares de acordo com novas descobertas científicas.

No presente estudo, a única correlação positiva encontrada entre um marcador molecular e o estadiamento TNM ou informações clinicopatológicas foi entre a expressão de MMP-2 e metástase em linfonodo. Gorouh *et al.* (2006), também encontrou relação entre MMP-2 e estadiamento N. Não obtivemos, contudo, os mesmos resultados de Gu e colaboradores (2005), que encontrou relação entre MMP-9 e permeação vascular, diferenciação tumoral e metástase em linfonodo, assim como de Vicente e equipe (2005) também encontrou estes resultados. É sabido que metástase em linfonodo resulta em alteração no plano de tratamento de pacientes com câncer, e alteração do prognóstico (VAUTERIN; VENESS *et al.*, 2006). Dada a importância de se identificar biomarcadores prognósticos para o câncer, a possível relação entre a expressão de MMPs e metástase em linfonodo, poderia facilitar a identificação precoce das metástases, facilitando o tratamento e seguimento do paciente. O tradicional sistema TNM facilita a comunicação entre profissionais, e padroniza o relato dos casos. Contudo, baseia-se apenas em informações sobre a extensão anatômica da doença, e há uma tendência de que biomarcadores e novas técnicas diagnósticas sobrepujem o valor deste sistema, utilizado desde 1958 (LUDWIG; WEINSTEIN, 2005).

Houve relação estatisticamente significativa entre expressão de MMP-9 e prognóstico ruim para sobrevida dos pacientes. Este dado está em desacordo com os obtidos por Kim (2006) que não encontrou correlação entre sobrevida dos pacientes e expressão de MMP 2 ou 9. Apesar do que foi encontrado neste estudo, acreditamos que ainda é cedo para afirmar se tal marcador poderá ou não ser utilizado no futuro para melhor definição do prognóstico da doença.

É sabido que o subtipo histológico influencia o prognóstico do câncer, influenciando na sobrevida do paciente (PEREIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2007). No presente estudo houve correlação significativa entre esta variável e sobrevida, sendo o subtipo bem diferenciado de melhor prognóstico.

A invasão tumoral não é decorrente simplesmente da maior ou menor expressão de metaloproteinases, mas fruto de um intrincado mecanismo, que envolve sim a degradação da MEC, mas também a motilidade celular, viabilidade da mesma e interações entre as células tumorais e os componentes da MEC. Cada tumor se desenvolve a partir de um clone celular específico. Então, mesmo tumores que possuem as mesmas características e localização e que compartilhem muitas das mutações que propiciaram o desenvolvimento tumoral, podem possuir também mutações pontuais específicas, que fazem com que seu comportamento invasivo, suas características de progressão e metástase sejam decorrentes de fatores distintos. Por exemplo, uns podem invadir mais devido à maior interação com componentes da MEC, outros devido a maior degradação da própria MEC.

Observou-se, ainda no presente estudo, uma correlação positiva entre invasão perineural e pior sobrevida, o que vai ao encontro das informações de Fagan, que encontrou relação entre a mesma variável e recorrência local, bem como metástase local. Wang e colaboradores (WANG; SUN *et al.*, 2006) observaram que a superexpressão de NGF (fator de crescimento neural), em carcinomas de glândulas salivares, pode ser uma razão para que haja afinidade entre as células daquele tumor e os nervos, podendo ser um marcador para invasão perineural em tumores de glândulas salivares humanos. No presente estudo, apesar de se observar relação significativa entre invasão neural e pobre sobrevida, ainda é cedo para afirmar se as razões para este achado são ou não as mesmas das encontradas por Wang e colaboradores, e ainda deve ser objeto de mais estudos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que as MMPs 2 e 9 apresentam distintos padrões de expressão no CEC de soalho bucal, sendo que a intensidade de imunomarcacão de MMP 2 e MMP9 pode ser indicativa de metástase em linfonodo e menor probabilidade de sobrevida, respectivamente.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

É certo que novos dados acerca do papel das metaloproteinases no desenvolvimento tumoral serão obtidos em futuro próximo. É provável também que alguns, ou muitos deles, entrem em choque com a literatura atual. O presente estudo confrontou dados da literatura, ora confirmando os mesmos, ora refutando.

Algumas ferramentas atuais já permitem avaliar uma série de dados antes impensáveis, e que colaboram para um melhor diagnóstico de alguns tipos de câncer, e em alguns casos gerando um melhor prognóstico, devido ao norteamiento do tratamento.

As metaloproteinases podem vir a tornarem-se mais uma ferramenta, apresentando-se como importantes marcadores da remodelação da MEC, e sinalização intercelular, aspectos estes importantes na progressão tumoral. É possível que um maior número de estudos, com amostras maiores, e a utilização de metodologias que permitam identificar as formas ativas e inativas das gelatinases, bem como correlacioná-las com sua localização no tecido tumoral e sadio, traga luz ao complexo processo de iniciação, promoção e progressão tumoral.

As possíveis correlações entre invasão neural e a progressão do CEC devem ser investigadas, para saber se este poderá ser utilizado futuramente como um marcador de prognóstico negativo. Além disso, uma estratificação da avaliação das imunomarcações, diferenciando a marcação que ocorre em células tumorais, inflamatórias ou fibroblastos, poderá oferecer dados mais precisos sobre o papel de cada uma destas populações celulares na progressão tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Aimes, R. T. e J. P. Quigley. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*, v.270, n.11, Mar 17, p.5872-6. 1995.
- Alexander, J. S. e J. W. Elrod. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat*, v.200, n.6, Jun, p.561-74. 2002.
- Baker, E. A., D. J. Leaper, *et al.* The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v.44, n.6, Dec, p.482-6. 2006.
- Baylin, S. B. e J. E. Ohm. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, v.6, n.2, Feb, p.107-16. 2006.
- Bergers, G., R. Brekken, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, v.2, n.10, Oct, p.737-44. 2000.
- Bissell, M. J. e D. Radisky. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, v.1, n.1, Oct, p.46-54. 2001.
- Bjorklund, M. e E. Koivunen. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1755, n.1, May 25, p.37-69. 2005.
- Carmeliet, P. e R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v.407, n.6801, Sep 14, p.249-57. 2000.
- Chang, C. e Z. Werb. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, v.11, n.11, Nov, p.S37-43. 2001.
- Chicoine, E., P. O. Esteve, *et al.* Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, v.297, n.4, Oct 4, p.765-72. 2002.
- Clark, E. A., T. R. Golub, *et al.* Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, v.406, n.6795, Aug 3, p.532-5. 2000.
- Clauss, M., J. C. Murray, *et al.* A polypeptide factor produced by fibrosarcoma cells that induces endothelial tissue factor and enhances the procoagulant response to tumor necrosis factor/cachectin. *J Biol Chem*, v.265, n.12, Apr 25, p.7078-83. 1990.
- Coussens, L. M., W. W. Raymond, *et al.* Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, v.13, n.11, Jun 1, p.1382-97. 1999.

¹ Diretrizes Básicas para Elaboração de Dissertações e teses, recomendadas para uso no âmbito da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, aprovadas pela Comissão de Pós-Graduação, em reunião de 13 de março de 2007.

Coussens, L. M., C. L. Tinkle, *et al.* MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, v.103, n.3, Oct 27, p.481-90. 2000.

Coussens, L. M. e Z. Werb. Inflammation and cancer. *Nature*, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.860-7. 2002.

Curran, S. e G. I. Murray. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, v.189, n.3, Nov, p.300-8. 1999.

_____. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*, v.36, n.13 Spec No, Aug, p.1621-30. 2000.

De Aguiar, A. F., Jr., L. P. Kowalski, *et al.* Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol*, v.43, n.6, Jul, p.593-601. 2007.

De Vicente, J. C., M. F. Fresno, *et al.* Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v.41, n.3, Mar, p.283-93. 2005.

Declerck, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer*, v.36, n.10, Jun, p.1258-68. 2000.

Egeblad, M. e Z. Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, v.2, n.3, Mar, p.161-74. 2002.

El Houda Aguezny, N., C. Badoual, *et al.* Soluble interleukin-2 receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. *Clin Exp Immunol*, v.150, n.1, Oct, p.114-23. 2007.

Farias, E., S. Ranuncolo, *et al.* Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer*, v.89, n.4, Jul 20, p.389-94. 2000.

Ferreras, M., U. Felbor, *et al.* Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*, v.486, n.3, Dec 15, p.247-51. 2000.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, v.285, n.21, Nov 18, p.1182-6. 1971.

_____. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, v.82, n.1, Jan 3, p.4-6. 1990.

_____. The influence of angiogenesis research on management of patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.36, n.2, p.109-18. 1995a.

_____. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, v.333, n.26, Dec 28, p.1757-63. 1995b.

Forastiere, A., W. Koch, *et al.* Head and neck cancer. *N Engl J Med*, v.345, n.26, Dec 27, p.1890-900. 2001.

Franchi, A., M. Santucci, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer*, v.95, n.9, Nov 1, p.1902-10. 2002.

Furness, P. N. Basement membrane synthesis and degradation. *J Pathol*, v.183, n.1, Sep, p.1-3. 1997.

Ghilardi, G., M. L. Biondi, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res*, v.8, n.12, Dec, p.3820-3. 2002.

Giannelli, G., E. Fransvea, *et al.* Gelatinase levels in male and female breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, v.292, n.1, Mar 22, p.161-6. 2002.

Gomez, D. E., D. F. Alonso, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, v.74, n.2, Oct, p.111-22. 1997.

Gorogh, T., U. H. Beier, *et al.* Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, v.28, n.1, Jan, p.31-9. 2006.

Graves, D. T. e A. J. Valente. Monocyte chemotactic proteins from human tumor cells. *Biochem Pharmacol*, v.41, n.3, Feb 1, p.333-7. 1991.

Gu, Z. D., J. Y. Li, *et al.* Matrix metalloproteinases expression correlates with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Gastroenterol*, v.100, n.8, Aug, p.1835-43. 2005.

Guttman, D., Y. Stern, *et al.* Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*, v.40, n.8, Sep, p.798-803. 2004.

Hanahan, D. e R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.

Hanemaaijer, R., J. H. Verheijen, *et al.* Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer*, v.86, n.2, Apr 15, p.204-7. 2000.

Hasina, R. e M. W. Lingen. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ*, v.65, n.11, Nov, p.1282-90. 2001.

Heikkila, P., J. Suojanen, *et al.* Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides. *Int J Cancer*, v.118, n.9, May 1, p.2202-9. 2006.

Heppner, K. J., L. M. Matrisian, *et al.* Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*, v.149, n.1, Jul, p.273-82. 1996.

Herszenyi, L., I. Hritz, *et al.* Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, v.13, n.5, Feb 7, p.676-82. 2007.

Hoikkala, S., P. Paakko, *et al.* Tissue MMP-2 and MMP-9 [corrected] are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2--complex or TIMP-1 [corrected] in stage [corrected] I-III lung carcinoma. *Cancer Lett*, v.236, n.1, May 8, p.125-32. 2006.

Hong, S. D., S. P. Hong, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol*, v.36, n.2, Mar, p.207-13. 2000.

Ikebe, T., M. Shinohara, *et al.* Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis*, v.17, n.4, Jun, p.315-23. 1999.

Impola, U., V. J. Uitto, *et al.* Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol*, v.202, n.1, Jan, p.14-22. 2004.

Islekel, H., G. Oktay, *et al.* Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct*, v.25, n.4, Jul-Aug, p.433-41. 2007.

Johnstone, S. e R. M. Logan. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v.36, n.3, Mar, p.263-6. 2007.

Karavasilis, V., V. Malamou-Mitsi, *et al.* Matrix metalloproteinases in carcinoma of unknown primary. *Cancer*, v.104, n.10, Nov 15, p.2282-7. 2005.

Kim, S. H., N. H. Cho, *et al.* Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol*, v.93, n.4, Mar 15, p.330-7. 2006.

Kowalski, L. P., A. L. Carvalho, *et al.* Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v.41, n.5, May, p.534-41. 2005.

Kupferman, M. E., M. E. Fini, *et al.* Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol*, v.157, n.6, Dec, p.1777-83. 2000.

Kurahara, S., M. Shinohara, *et al.* Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, v.21, n.7, Oct, p.627-38. 1999.

Lewis, C. E., R. Leek, *et al.* Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol*, v.57, n.5, May, p.747-51. 1995.

- Lin, M. H., S. Y. Liu, *et al.* Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v.42, n.9, Oct, p.907-13. 2006.
- Liotta, L. A. e W. G. Stetler-Stevenson. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*, v.51, n.18 Suppl, Sep 15, p.5054s-5059s. 1991.
- Liotta, L. A., K. Tryggvason, *et al.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, v.284, n.5751, Mar 6, p.67-8. 1980.
- Liu, S. Y., Y. C. Liu, *et al.* Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, v.36, n.7, Aug, p.430-5. 2007.
- Ludwig, J. A. e J. N. Weinstein. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*, v.5, n.11, Nov, p.845-56. 2005.
- Macdougall, J. R., M. R. Bani, *et al.* 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br J Cancer*, v.80, n.3-4, May, p.504-12. 1999.
- Matsumura, S., N. Oue, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, v.131, n.1, Jan, p.19-25. 2005.
- Morgan, H. e P. A. Hill. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity. *Cancer Cell Int*, v.5, n.1, Feb 8, p.1. 2005.
- Morini, M., S. Astigiano, *et al.* Hyperplasia and impaired involution in the mammary gland of transgenic mice expressing human FGF4. *Oncogene*, v.19, n.52, Dec 7, p.6007-14. 2000.
- Muller, A., B. Homey, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, v.410, n.6824, Mar 1, p.50-6. 2001.
- Murphy, G. e T. Crabbe. Gelatinases A and B. *Methods Enzymol*, v.248, p.470-84. 1995.
- Nakajima, M., D. R. Welch, *et al.* Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res*, v.47, n.18, Sep 15, p.4869-76. 1987.
- Nicolson, G. L., M. Nakajima, *et al.* Cancer cell heparanase activity associated with invasion and metastasis. *Adv Enzyme Regul*, v.38, p.19-32. 1998.
- Noel, A., A. Hajitou, *et al.* Inhibition of stromal matrix metalloproteases: effects on breast-tumor promotion by fibroblasts. *Int J Cancer*, v.76, n.2, Apr 13, p.267-73. 1998.
- P, O. C., P. H. Rhys-Evans, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v.127, n.7, Jul, p.813-20. 2001.

- Patel, B. P., P. M. Shah, *et al.* Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, v.90, n.2, May 1, p.81-8. 2005.
- Pereira, M. C., D. T. Oliveira, *et al.* Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc*, v.73, n.4, May, p.339-44. 2007.
- Rhee, J. S. e L. M. Coussens. RECKing MMP function: implications for cancer development. *Trends Cell Biol*, v.12, n.5, May, p.209-11. 2002.
- Rijken, F., P. L. Bruijnzeel, *et al.* Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL-10 expression. *J Invest Dermatol*, v.122, n.6, Jun, p.1448-55. 2004.
- Roebuck, M. M., T. R. Helliwell, *et al.* Matrix metalloproteinase expression is related to angiogenesis and histologic grade in spindle cell soft tissue neoplasms of the extremities. *Am J Clin Pathol*, v.123, n.3, Mar, p.405-14. 2005.
- Rose, P., Q. Huang, *et al.* Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.209, n.2, Dec 1, p.105-13. 2005.
- Rosenthal, E. L. e L. M. Matrisian. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck*, v.28, n.7, Jul, p.639-48. 2006.
- Rosin, M. P., X. Cheng, *et al.* Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*, v.6, n.2, Feb, p.357-62. 2000.
- Ruokolainen, H., P. Paakko, *et al.* Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma--tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod Pathol*, v.19, n.2, Feb, p.208-17. 2006.
- Saad, S., D. J. Gottlieb, *et al.* Cancer cell-associated fibronectin induces release of matrix metalloproteinase-2 from normal fibroblasts. *Cancer Res*, v.62, n.1, Jan 1, p.283-9. 2002.
- Schaefer, A. The mathematical basic of stereology. *Microscopion*, v.7, n.18, 19, p.3-13. 1970.
- Scholl, S. M., C. H. Bascou, *et al.* Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, v.69, n.2, Feb, p.342-6. 1994.
- Seo, U. K., Y. J. Lee, *et al.* Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol*, v.97, n.1, Feb 10, p.101-6. 2005.
- Shacter, E. e S. A. Weitzman. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*, v.16, n.2, Feb, p.217-26, 229; discussion 230-2. 2002.
- Sheen-Chen, S. M., H. S. Chen, *et al.* Serum levels of matrix metalloproteinase 2 in patients with breast cancer. *Cancer Lett*, v.173, n.1, Nov 8, p.79-82. 2001.

- Sivula, A., A. Talvensaaari-Mattila, *et al.* Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.89, n.3, Feb, p.215-20. 2005.
- Song, S. Y., H. J. Son, *et al.* Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur J Cancer*, v.42, n.1, Jan, p.101-8. 2006.
- Stearns, M. E., M. Wang, *et al.* Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines. *Clin Cancer Res*, v.9, n.3, Mar, p.1191-9. 2003.
- Strieter, R. M., S. L. Kunkel, *et al.* Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol*, v.141, n.6, Dec, p.1279-84. 1992.
- Sun, J. e M. E. Hemler. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, v.61, n.5, Mar 1, p.2276-81. 2001.
- Sundelin, K., K. Roberg, *et al.* Effects of cytokines on matrix metalloproteinase expression in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Acta Otolaryngol*, v.125, n.7, Jul, p.765-73. 2005.
- Szabo, E. Selecting targets for cancer prevention: where do we go from here? *Nat Rev Cancer*, v.6, n.11, Nov, p.867-74. 2006.
- Takeuchi, T., M. Hisanaga, *et al.* The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, v.10, n.16, Aug 15, p.5572-9. 2004.
- Talvensaaari-Mattila, A. e T. Turpeenniemi-Hujanen. High preoperative serum TIMP-1 is a prognostic indicator for survival in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, v.89, n.1, Jan, p.29-34. 2005a.
- _____. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer Lett*, v.217, n.2, Jan 20, p.237-42. 2005b.
- Vairaktaris, E., S. Vassiliou, *et al.* A metalloproteinase-9 polymorphism which affects its expression is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, May 9. 2007.
- Varani, J., Y. Hattori, *et al.* Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer*, v.82, n.3, Feb, p.657-65. 2000.
- Vauterin, T. J., M. J. Veness, *et al.* Patterns of lymph node spread of cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, v.28, n.9, Sep, p.785-91. 2006.
- Vu, T. H. e Z. Werb. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*, v.14, n.17, Sep 1, p.2123-33. 2000.

Wahl, S. M., D. A. Hunt, *et al.* Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.84, n.16, Aug, p.5788-92. 1987.

Wang, L., M. Sun, *et al.* Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *J Oral Maxillofac Surg*, v.64, n.4, Apr, p.636-41. 2006.

Weibel, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, v.26, p.235-302. 1969.

Welm, B., J. Mott, *et al.* Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. *Curr Biol*, v.12, n.6, Mar 19, p.R209-11. 2002.

Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, v.91, n.4, Nov 14, p.439-42. 1997.

Wiegand, S., A. A. Dunne, *et al.* Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, v.104, n.1, Jul 1, p.94-100. 2005.

Winding, B., R. Nicamhlaoibh, *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase inhibitors inhibit growth of established breast cancer osteolytic lesions and prolong survival in mice. *Clin Cancer Res*, v.8, n.6, Jun, p.1932-9. 2002.

Xie, M., Y. Sun, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in supraglottic carcinoma and its clinical implication for estimating lymph node metastases. *Laryngoscope*, v.114, n.12, Dec, p.2243-8. 2004.

Yazici, Y. D., S. Kim, *et al.* Antivascular therapy of oral tongue squamous cell carcinoma with PTK787. *Laryngoscope*, v.115, n.12, Dec, p.2249-55. 2005.

Yoshizaki, T., Y. Maruyama, *et al.* Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, v.95, n.1, Jan 20, p.44-50. 2001.

Zhang, J., X. Jin, *et al.* The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*, v.26, n.10, Oct, p.1748-53. 2005.

Zhang, L. J., Y. X. Chen, *et al.* Effect of interleukin-10 and platelet-derived growth factor on expressions of matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rat fibrotic liver and cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*, v.10, n.17, Sep 1, p.2574-9. 2004.

ANEXOS