

LEYSE MARA TOSCANO LOPES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASE - 2 E - 9 EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

CAMPO GRANDE
2013

LEYSE MARA TOSCANO LOPES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASE - 2 E - 9 EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia nível de Mestrado da Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros

CAMPO GRANDE
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEYSE MARA TOSCANO LOPES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASE - 2 E - 9 EM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia nível de Mestrado da Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Rosana Mara Giordano de Barros
Instituição: FAODO/UFMS

Prof. Dr^a. Márcia Gorisch
Instituição: Anhanguera-Uniderp

Prof. Dr. Edílson José Zafalin
Instituição: FAODO/UFMS

À minha amada mãe Líbia (*in memoriam*), saudades,
saudades eternas, eternas, eternas...

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, fortaleza minha, em quem confio, pois, se estou em pé é Ele quem tem me sustentado.

À Querida Orientadora **Prof.^a Dra. Rosana Mara Giordano de Barros**, que é o meu norte, pela sua competência, dedicação e seriedade, orgulho para a nossa classe, pela sua determinação e pelo pensamento que sempre podemos fazer melhor. Incentivando-nos a não desistir jamais, por um mundo melhor, mais humano. Por estar sempre mostrando-nos que o saber é um legado eterno e sem fronteiras. Pela generosidade com que ofertou o seu tempo, lucidez e confiança, expresso aqui os meus agradecimentos e profundo respeito.

Ao meu pai **Eduardo Lopes**, que me surpreende todos os dias com a sua maneira estranha de amar, por ter se esforçado para manter a unidade familiar.

Às minhas irmãs **Lenise Maria** e **Lenilza Mari**, que me trazem a certeza que neste mundo eu nunca estarei sozinha, porque elas existem, acreditando sempre em mim e no meu trabalho e que generosamente ajudaram a vida toda a criar os meus filhos, que hoje são homens e mulher dignos, elas são extensão de mim, um legado de amor e respeito, que nos unem por laços invisíveis por toda eternidade. Obrigada.

Ao **Fábio Augustus**, companheiro separado por Deus para estar comigo nesta estrada, parceiro, agradeço pelo profundo amor e amizade que me dedicas.

A meus filhos **Estevão, Mateus e Rebeca** pelo amor incondicional, apoio e incentivo, por serem reverentes, amorosos, dedicados, fiéis, certeza de saber que tudo que eu fiz valeu a pena... Obrigada, meus amores...

Às minhas noras **Bárbara e Sara Aline**, pelo trabalho de suporte ao clã, pela confiança e respeito que me dedicam. Ao meu netinho **Caio**, que tem sido refrigério de pureza nas nossas vidas.

À amiga e parceira **Silvia Roberta Cieslak**, com quem aprendi uma imensidão de coisas, pela paciência, inteligência, pela capacidade de conhecimento, generosidade de compartilhar o saber, expresso aqui os meus agradecimentos e profundo respeito, sempre serão mínimos diante de tudo que me foi oferecido, é contigo que reparto a minha vitória e felicidade...

Ao **Programa de Mestrado em Odontologia da UFMS e Professores**, pelo espírito empreendedor sempre com os “Olhos no Futuro”, por uma odontologia desenvolvida e mais moderna.

A **Prof.^a Dra. Márcia Gorisch**, pela dedicação e comprometimento com a pesquisa e ensino, fica aqui a minha gratidão. Muito obrigada.

A **Prof.^a Dra. Mônica Aratani**, pela seriedade e retidão com que me auxiliou, sempre com palavras de estímulos, pontuadas de apoio e correção, na busca de um trabalho com ética, dinâmica e métodos. Estabelecendo-me o foco, o caminho para o acerto, sem deixar com que o desânimo atrapalhasse a produção. Sou grata pela postura e competência com que conduz o ensino e pela consideração que me dedica.

Ao **Prof. Albert Schiaveto de Souza**, pelo brilhante trabalho estatístico desenvolvido.

Aos **Colegas da 1ª Turma do Mestrado em Odontologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**, pelo bom convívio, pelo espírito de cooperação que reinou entre nós.

Ao **Senhor Daniel Lichtenberg do APC Lab**, pelo empenho em cumprir as metas em tempo hábil.

À **Apoio em Patologia Cirúrgica Laboratórios (APC Lab.)**, pela colaboração, desempenho e esforço no cumprimento do prazo e na busca da qualidade de trabalho apresentado, agradeço a toda a sua equipe nota 10, pela cooperação.

À **Sra. Carlinda Zucarelli**, pelas palavras de incentivo certas, na hora exata.

À **Evelyn Ferro do Comitê de Ética para pesquisa de seres humanos/Plataforma Brasil, UFMS**, pelo empenho do desenvolvimento da pesquisa e respeito ao estudo, sem esquecer o indivíduo.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho (FAODO)**, incentivo e cooperação técnica.

À **Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**, pela oportunidade de aprendizado, pelo cumprimento de seu papel no estímulo da busca de um saber apurado, conquistando respostas aos problemas da sociedade através da instrução.

À **Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT)**, pelo apoio financeiro, através do processo nº 225303414314122011; por acreditar em novas frentes de pesquisa, por apoiar a educação, o ensino, a instrução e o empreendedorismo, como sendo a mola que move o mundo, na busca de novas idéias e de soluções inteligentes para o desenvolvimento do homem e do planeta.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“O Senhor é meu Pastor e nada me faltará.”

(SL 23:1)

RESUMO

LOPES, LMT. **Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 em carcinomas epidermóides de boca.** Campo Grande; 2013. [Dissertação – Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

As metaloproteinases de matriz são enzimas proteolíticas facilitadoras da dispersão de células mutadas. Nos carcinomas, as marcações destas proteínas estão relacionadas à malignização, invasão e metástases tumorais. O presente estudo avaliou a expressão imunoistoquímica das MMP-2 e MMP-9 em carcinomas epidermóides de boca, correlacionando aos aspectos histopatológicos das lesões (local) e parâmetros clínicos da amostra: gênero, idade, uso de prótese e hábitos (tabagismo e etilismo), ao grau de diferenciação (pouco, moderado e bem diferenciado), análise das expressões (ausente, fraca, moderada, intensa) em células neoplásicas centrais e do *front* invasivo de 32 blocos pertencentes ao acervo do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMS. Todas as amostras foram marcadas. A MMP-9 apresentou expressão mais significativa que a MMP-2 ($P < 0,001$) nos núcleos das células neoplásicas centrais e *front* de invasão ($P = 0,007$). A marcação das MMP-9 nos citoplasmas das células do *front* ($P = 0,003$) foi significativa, porém, sem relação com os aspectos clínicos da amostra. Os resultados do estudo refletem a marcação das MMPs-9 no desenvolvimento dos carcinomas epidermóides (CAEs), quanto ao grau de diferenciação, nas fases em que eles são classificados como moderadamente diferenciados, momento de intensa transformação celular, onde as MMPs-9 se fizeram presente no *front* invasivo ($P = 0,011$) e células neoplásicas ($p < 0,001$). Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a maior marcação das MMPs-9 pelas células do *front* invasivo e células neoplásicas centrais, contribui para o potencial invasivo, desenvolvimento e facilitação da metastatização dos carcinomas epidermóides de boca.

Palavras-Chave: Neoplasias, Metaloproteinases, Imunomarcadores, Endopeptidases, Carcinoma espinocelular.

ABSTRACT

LOPES, LMT. **Immunohistochemical expression of metalloproteinases -2 and -9 carcinomas mouth.** Campo Grande; 2013. [Dissertation – Posgraduated Program in Dentistry, Faculty of Dentistry Prof. Albino Coimbra Filho da Federal University of Mato Grosso do Sul].

Matrix metalloproteinases are proteolytic enzymes which facilitate the dispersion of mutated cells. In carcinomas, the markings of these proteins are related to malignancy, tumor invasion and metastasis. The present study evaluated the immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-9 in oral squamous cells carcinomas, correlating the histopathological lesions (site) and clinical parameters of the sample: gender, age, use of prosthesis and habits (smoking and drinking), the degree of differentiation (little, moderate and well-differentiated), analysis of expressions (absent, weak, moderate, severe) in neoplastic cells of the central and invasive *front* of 32 blocks belonging to the collection of the Laboratory of Oral Pathology, Faculty of Dentistry UFMS. All samples were labeled. MMP-9 expression showed more significant than with MMP-2 ($P < 0,001$) in the nuclei of the neoplastic cells and central *front* invasion ($P = 0,007$). The marking of MMP-9 in *front* of the cytoplasm of cells ($P = 0,003$) was significant, however, no correlation with the clinical sample and degree of prognosis. The results of the study reflect the marking of MMP-9 in the development of squamous cell carcinoma (OSCC), the degree of differentiation in the stages in which they are classified as moderately differentiated moment of intense cellular transformation, where MMP-9 was found in the invasive *front* ($P = 0,011$) and tumor cells ($p < 0,001$). Based on the results presented, we conclude that the major MMP-9 labeling of the cells invasive *front* and central neoplastic cells, contributes to the invasive potential, development and facilitation of metastasis of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Neoplasms, Metalloproteinases, Immunomarkers, Endopeptidases, Squamous Cell Carcinoma.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Gradação de malignidade de carcinomas epidermóides de boca diagnosticados em pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFMS, no período de 2004 a 2013. Campo Grande (MS). (n=32).....49
- Tabela 2 - Frequências dos graus de diferenciação e prognósticos de carcinomas epidermóides de boca diagnosticados em pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFMS, no período de 2004 a 2013. Campo Grande (MS). (n=32).....49
- Tabela 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com o local da lesão e as variáveis idades, gênero, enfartamento ganglionar, tabagismo, etilismo e uso de prótese.....50
- Tabela 4 - Resultados referentes à marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, de acordo com o gênero, faixa etária, uso ou não de tabaco e álcool e prognóstico.....51
- Tabela 5 - Resultados referentes à marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9....53
- Tabela 6 - Marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e o grau de diferenciação histopatológica.....55

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Esquema da estrutura das MMPs.....	26
Figura 2 - Marcação total nas células neoplásicas centrais e do <i>front</i> de invasão, de acordo com a imunistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	54
Quadro 1 – Sistema de gradação de malignidade “modo de invasão” recomendado por Bryne (1998)	42
Quadro 2 – Classificação dos escores quanto aos valores de prognósticos. Bryne (1998)	42
Quadro 3 – Classificação do grau de diferenciação preconizado pela OMS (1998).....	43
Quadro 4 – Características dos anticorpos utilizados para imunomarcação.	45
Quadro 5 – Apresentação dos valores obtidos pela gradação histopatológica de malignidade, de acordo com a classificação de Bryne (1998) quanto ao prognóstico e grau de diferenciação.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Câncer
CAE	Carcinoma espinocelular, epidermóide ou escamoso
CB	Câncer bucal
CC	Citosina-citosina
CT	Citosina-timina
Cu ⁺⁺	Íon cobre
DAB	Diaminobenzidina
EGFR	Receptor para fator de crescimento epidérmico ou epitelial
EBV	Vírus Epstein-Barr
EGF	Fatores de crescimento epidermal
FAODO	Faculdade de Odontologia
FUNDECT	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul
G1	Growth 1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hemoxilina-Eosina
Hg ⁺⁺	Íon mercúrio
HPV	Papiloma vírus humano
IARC	<i>International Agency Research Cancer</i> , Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imunoistoquímica
KDa	Kilodalton
mM	Milimolar
MB	Membrana basal
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinases de Matriz
MMP-2	Metaloproteinases de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinases de matriz 9
MMP- MMT	Metaloproteinases ligadas à membrana
MS	Mato Grosso do Sul
OMS	Organização Mundial de Saúde

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Solução Tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
Psi	Pressão manométrica
SABP	Sistema estreptavidina-biotina-peroxidase
Sn ⁺⁺	Íon estanho
S.O.E.	Sem outra especificação
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> - inibidores teciduais de Metaloproteinases
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
TNM	Tamanho, nódulos, metástases
TRIS-HCL	Três hidrocloreto
TT	Timina-timina
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UICC	União Internacional Contra o Câncer
USA	United States of America
VEFG	Fator de crescimento endotelial vascular
Zn ⁺⁺	Íon zinco
ZOE	Óxido de zinco e eugenol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Câncer.....	16
2.2 Carcinoma epidermoide.....	17
2.3 Matriz extracelular.....	22
2.4 Metaloproteinases de matriz.....	25
2.5 Inibidores de metaloproteinases.....	33
2.6 Imunoistoquímica.....	36
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivos gerais.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	41
4.1 Caracterização do estudo.....	41
4.2 Amostra.....	41
4.3 Análise morfológica de malignidade.....	41
4.4 Método imunoistoquímico.....	43
4.5 Análise de imunexpressão.....	45
4.6 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Resultados da gradação de malignidade.....	47
5.2 Resultados da imunoistoquímica.....	52
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	78
APÊNDICE A	91

1 INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença de genes das células somáticas, ocorre com a transformação dos proto-oncogenes, genes e responsáveis pela fisiologia celular, quanto à regulação do crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular (AMARAL et al., 2010; LOBÃO et al., 2011) em oncogênese e concomitantemente, a inativação dos genes supressores de tumores, genes estes responsáveis pela manutenção da integridade do genoma. Esta alteração estrutural reflete em uma perda do controle mitótico da célula com perda de adesão célula-célula, célula-estroma, aumento das enzimas proteolíticas, angiogênese, ligada à capacidade proliferativa desordenada, invasiva e de metastatização (BRYNE et al., 1992; CARPENA et al., 2008).

O diagnóstico do câncer tem parâmetros estabelecidos com base em aspectos clínicos e histopatológicos. Como esses indicadores são subjetivos e relativamente limitados, é indiscutível a necessidade de métodos mais apurados que identifiquem as alterações moleculares das transformações neoplásicas, pois uma das formas de combate a essa doença está na compreensão dos processos que regulam os eventos bioquímicos que controlam o ciclo e o meio celular (NEVILLE et al., 2009). Câncer de boca está entre os 10 tipos de cânceres mais incidentes em homens e mulheres, com destaque para o gênero masculino. Apresenta alto índice de morbidade e mortalidade e incidência global elevada com estimativa de novos casos: 14.170, sendo 9.990 homens e 4.180 mulheres (2012), o número de mortes: 4.891, sendo 3.882 homens e 1.009 mulheres (2012) (INCA 2013).

Atinge indivíduos brancos (leucodermas), acima de 40 anos em qualquer região anatômica da cavidade bucal, sendo a detecção tardia o principal fator associado às baixas taxas de sobrevida. A etiologia pode estar relacionada a hábitos de vida, entre eles, uso crônico de tabaco e álcool. Apesar do avanço nos tratamentos cirúrgicos, radioterápicos e quimioterápicos, o índice de sobrevida de 5 anos permanece inalterado nos últimos 40 anos (COLOMBO; RAHAL, 2009). É necessário aperfeiçoar as ações de prevenção, diagnóstico precoce e controle da doença (CIMARDI; FERNANDES, 2009). Estudos de novas técnicas laboratoriais mais sensíveis, fidedignas, de fácil execução como as técnicas moleculares e imunoistoquímicas, para elucidar dúvidas histogenéticas, associados a dados histopatológicos e clínicos (BARRA, 2006).

O sistema TNM (Tamanho, Nódulos e Metástases) relaciona características clínicas e faz referências a prognósticos, auxiliam os sistemas histológicos de diagnósticos. Estes avaliam o comportamento biológico da lesão e malignidade, pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) (DANTAS et al., 2003). O desenvolvimento de métodos laboratoriais mais apurados, detalhados e confiáveis conduzirá o entendimento da dinâmica das neoplasias sob a ação de proteases como as metaloproteinases. Estas enzimas, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (MEC) (BIKERDAL-HANSEN et al., 1993), participam de processos fisiológicos, como a remodelação tecidual, embriogênese e a angiogênese (NAVARRO et al., 2006) e eventos patológicos, como a invasão celular, disseminação das células tumorais no processo da carcinogênese, pela liberação de fatores de crescimento e citocinas que ficam estocadas na MEC (BARROS, 2006).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis pela lise dos elementos da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais (MB), por alterações na adesividade celular e angiogênese no ambiente tumoral (SILVEIRA et al., 2007), sendo detectadas em inúmeros tipos de carcinomas, entre eles, o carcinoma epidermoide de boca (NAVARRO et al., 2006). Pertencentes a uma família multigênica de mais de 30 enzimas relacionadas geneticamente (REIS, 2013), proteolíticas, zinco dependente, em equilíbrio com seus inibidores, possuem pouca expressão em tecidos normais e são altamente marcadas em neoplasias (BAKER et al., 2002; ROBINSON et al., 2003).

Este trabalho investigou a expressão das MMP-2 e MMP-9 em carcinomas epidermoides de boca e relacionou-as aos parâmetros clínicos e histopatológicos, para avaliar a marcação destas e associá-las ao mecanismo de desenvolvimento e invasividade. Este poderá auxiliar a novos estudos, que contribuirão nas estratégias de inibição da ação destas enzimas no câncer oral, para que através de associações terapêuticas, os tumores possam ser eliminados sem recorrência. A expressão das MMP-2 no devido trabalho foi pouco relevante, enquanto a MMP-9, apresentou significância como fator relevante/modificador no carcinoma epidermoide de boca, quanto a agressividade e invasividade da lesão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é uma alteração genética, multifatorial (BATISTA et al., 2008; CIMARDI; FERNANDES, 2009; AMARAL et al., 2010), associado a mutações permanentes que levam ao crescimento desordenado das células, desregulação no controle da proliferação. As alterações em genes denominados proto-oncogenes ou genes promotores de desenvolvimento em oncogenes. Os proto-oncogenes estão ligados a diferenciação, migração, morte celular (apoptose), com influência da angiogênese (BETTENDORF et al., 2004; LOBÃO et al., 2011) e alteração no ciclo celular (MONTORO et al., 2008).

Estas mutações genéticas levam a proliferação celular descontrolada e invasão tecidos e órgãos adjacentes, com lançamento de metástases por outras regiões do corpo (POLETTE et al., 2004) determinadas por alterações na interação célula-célula e célula-matriz (BAKER et al., 2002; BETTENFORF et al., 2004; SCULLY et al., 2005; CAVALHEIRO, 2008; ARAÚJO et al., 2011).

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer/Organização Mundial de Saúde (IARC/OMS), *World Cancer Report* (2012), o impacto global do câncer mais que dobrou em 2012 e estima-se cerca de 27 milhões de novos casos até 2030, com 17 milhões de pessoas vivas convivendo com a doença (OMS, 2012).

O câncer é a 2ª causa de morte na população depois das doenças cardiovasculares, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007, pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2010).

Os oncogênes levam as células a perder o controle sobre o ciclo mitótico (NEVILLE et al., 2009), resultando na síntese de oncoproteínas (produtos genéticos anormais com funções aberrantes) (LOPES et al., 2002; LOBÃO et al., 2011) que são inibidas pelos genes supressores tumorais, cuja função é prevenir e inibir que células se multipliquem descontroladamente, interrompendo o ciclo celular (SOUZA JÚNIOR, 2006).

Na mutação genética, há a desestabilização dos sistemas de controle, geneticamente pré-determinados, que coordenam o comportamento celular, há ruptura dos sinalizadores

celulares, do reparo de DNA e ciclo celular, que são fundamentais para a homeostasia do meio, e se diferencia de indivíduo para indivíduo (RAMALHO et al., 2002).

Este processo, quando desencadeado, é iniciado por estímulos denominados de carcinógenos ou carcinogênicos, que podem ser químicos, energia radiante e vírus oncogênicos (LOBÃO et al., 2011) e envolvem múltiplos estágios: a iniciação que é caracterizada pela interação do agente cancerígeno (oncoiniciador); a promoção, a célula iniciada permanece no organismo e sofre a ação de novo agente carcinogênico (oncopromotor), transformando-se lenta e gradualmente. Neste período, a suspensão do estímulo pode levar a interrupção do processo, por isso ele pode ser denominado neoplasia benigna; a progressão tumoral é o terceiro estágio se caracteriza pela ação dos oncoaceleradores nas células alteradas, o que se manifesta em multiplicação descontrolada e irreversível (expansão monoclonal), com sinais de malignidade (SOUZA JÚNIOR, 2006; INCA, 2012).

2.2 Carcinoma epidermoide

Estima-se que 7% da população mundial seja acometida pelo câncer de boca, sendo o carcinoma epidermoide de cavidade bucal, também denominado de espinocelular ou escamoso (NEVILLE et al., 2009), o mais incidente. Representa 90% a 95% de todos os tumores malignos de boca e cerca de 40% dos tumores de cabeça e pescoço (AMORIM et al., 2002; SCULLY, 2002; DANTAS et al., 2003; BRENER et al., 2007). A relação entre homens e mulheres é de 3:1 tem caído pelo aumento do número de mulheres fumantes, consumidoras de álcool, estimuladas pelas indústrias e com a possibilidade de vida mais longa em relação aos homens. Estes pontos têm universalizado os fatores de risco e modificado o perfil epidemiológico das neoplasias (AMORIM FILHO et al., 2003; INCA, 2012).

O CAE origina-se no tecido epitelial, resultante de uma transformação de queratinócitos (ERDEM et al., 2007; CARPENA et al., 2008), com proliferação desordenada da camada espinhosa. Apresentam-se com características histopatológicas, proliferações celulares intensas em camadas desordenadas, frequentemente formam blocos, ilhas, nichos e cordões com capacidade de invasão dos tecidos circunvizinhos, tecidos de suporte e vasos sanguíneos e linfáticos (*intravasation*), expressando vários graus de similaridades com suas células de origem (DANTAS et al., 2003).

Os CAEs apresentam elevado potencial invasivo e alta probabilidade de desenvolvimento de metástases, principalmente nos linfonodos cervicais (CARPENA et al.,

2008; NEVILLE et al., 2009). Geralmente são lesões ulceradas ou nodulares, com crescimento progressivo e indolor nas fases iniciais. Recidivas locais e loco-regionais são as principais causas de falha do tratamento e estão associadas aos piores prognósticos (AGRA, 2007; SOAMES; SOUTHAM, 2008).

O carcinoma epidermoide expressa um comportamento variado, biologicamente distinto, que depende do tempo de duração e do padrão de desenvolvimento do indivíduo. É avaliado, segundo a gradação histopatológica em: (1) bem diferenciado com numerosas pérolas córneas, queratinização celular com pontes intercelulares, menos de duas mitoses por campo histológico, observado em maior aumento, raras mitoses atípicas, células gigantes multinucleadas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzido, com ampla produção de queratina; (2) moderadamente diferenciado, pérolas córneas escassas, queratinização celular e pontes intercelulares aparentes, duas a quatro mitoses por campo histológico, algumas mitoses atípicas, moderado pleomorfismo celular e nuclear, escassas células gigantes multinucleadas; e (3) pouco diferenciado, pérolas córneas ausentes, queratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de quatro mitoses por campo histológico, frequentes mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear pronunciado, frequentes células gigantes multinucleadas, quando tem o crescimento difuso, pouca ou nenhuma tendência em formar cordões epiteliais e queratinização.

Os aspectos clínicos iniciais são lesões indolores, placas cinza branco-acinzentadas ou vermelho-acinzentado (eritoleucoplásicas), levemente elevado que podem parecer translúcidas, fissuradas ou corrugadas, tipicamente mais mole e plano, sendo que a forma mais comum é a úlcero-infiltrativa (COSTA et al., 2002; NEVILLE et al., 2009; CARLI et al., 2009).

O diagnóstico dos CAEs geralmente é feito através de exame histopatológico de microscopia óptica de rotina e as estruturas que contribuem no diagnóstico diferencial são epitélio acantótico, cordões, ninhos de células que produzem uma espiral central de ceratina (pérolas córneas), não há camada basal bem formada, células com pleomorfismos, núcleos hipercromáticos e aumentados, citoplasma eosinofílico abundante, nucléolos evidentes e numerosas figuras de mitoses com aspectos bizarros, podem se apresentar com ampla invasão (cordões) ou com o aspecto de ilhas de carcinoma no conjuntivo (COTRIM et al., 2002; DANIEL et al., 2006).

Os carcinomas epidermóides foram evidenciados em grupos com menor poder socioeconômico, varia de um país para o outro e dentro do mesmo país (BRENER et al., 2007), acometem especialmente indivíduos entre a 5ª e a 8ª décadas de vida, com um

crecente aumento da incidência em pacientes jovens com menos de 45 anos de idade, cuja etiologia está associada ao estilo de vida e hábitos como tabagismo, etilismo e infecção por vírus oncogênicos como o papiloma vírus humano (HPV 16, 18, 33 e 58), HBV (vírus Epstein-Barr) (AMORIM FILHO et al., 2003; ANTUNES, ANTUNES, 2004; CARLI et al., 2009).

A idade do paciente consiste em uma variável que pode estar relacionada ao grau de malignidade do tumor. Porém, pouco se entende por que indivíduos da mesma idade podem apresentar carcinomas com graus de malignidade bastante distintos (LOURENÇO et al., 2007).

A detecção tardia, demora da descoberta da lesão pelo indivíduo, dentista ou pelo médico, lesões que não cicatrizam espontaneamente no período de 20 dias após a terapêutica (AMORIM et al., 2002), geralmente associadas a fatores extrínsecos como tabagismo, tabaco sem fumaça e ao etilismo crônico, podem levar ao desenvolvimento dos CAEs. O fumo além de ser um indutor, é também promotor dos carcinomas (GASSEN et al., 2005). A associação de um ou mais fatores no ambiente bucal, como o uso de próteses mal adaptadas, dentes fraturados, úlceras orais secundárias e condições de higiene bucal precária, favorecem o aparecimento de lesões pré-malignas (DEDIVITIS et al., 2004).

Segundo Batista et al. (2008), o risco de desenvolvimento de CAEs em fumantes de cigarro industrializados é 6,3 vezes maior que em não fumantes (BRENER et al., 2007). O tabaco é um hábito que se faz mais significativo que ingerir bebidas alcoólicas, ou seja, o fumo é o mais importante na gênese deste tumor, porém, cita-se o álcool como fator a ser observado pelo efeito sinérgico (AMORIM FILHO et al., 2003). Este risco aumentaria para sete vezes em consumidores de cigarro de palha, para 14 vezes em usuários de cachimbo e em até 15 vezes se está associado ao alcoolismo crônico. O tabaco sem fumaça, o rapé ou o tabaco de mascar são potencialmente ativos às mutações, principalmente nos sítios de acomodação do fumo (PANDE et al., 2002; BARROS, 2006; BRENER et al., 2007).

Pessoas que consomem mais de 6 doses de bebidas com elevado teor de álcool, apresentam mais probabilidade de desenvolver câncer de boca (BATISTA et al., 2008). O álcool em associação com tabaco leva a uma incidência mais precoce da lesão (CARLI et al., 2009; COLOMBO; RAHAL, 2009).

Indivíduos que se abstiveram do consumo de álcool por pelo menos um ano antes do estabelecimento do diagnóstico do câncer, apresentam uma sobrevida maior. A potencialização do mecanismo pelo qual o álcool atua no processo da carcinogênese é incerta, somado a imunossupressão sistêmica (DANIEL et al., 2006). O álcool é apontado como

potente potencializador do câncer de boca pelo aumento na proliferação epitelial, bem como pode interferir no processo de maturação celular (CARRARD et al., 2008). A quantidade de álcool consumido e o tempo de duração do hábito são mais importantes do que o tipo de bebidas ingeridas, pois o hábito provoca a redução do fluxo salivar, com prejuízo na ação de lavagem das superfícies da mucosa, deixando-as mais expostas aos fatores carcinogênicos (CARRARD et al., 2008; SOAMES; SOUTHAM, 2008).

A radiação solar é fator importante como agente carcinogênico, com alta incidência no vermelhão de lábios inferiores, porém, atenção especial tem que ser dada para neoplasias em lábios superiores pelo número elevado e proximidade aos linfonodos parotídeos. Ocorre especialmente em indivíduos de pele clara que se expõem excessivamente ao sol. São raros em negros e crianças (ANTUNES, AA; ANTUNES, AP, 2004). Aparecem como úlceras crônicas que não cicatrizam ou como lesões exofíticas de natureza verrugosa. O carcinoma de lábio representa entre 25 a 30% dos casos de câncer bucal, é mais facilmente perceptível pelos pacientes, o que favorece uma intervenção precoce, diferentemente dos situados em áreas internas da boca (BRASILEIRO FILHO, 2004; BARROS, 2006).

Quanto aos fatores intrínsecos, incluem-se os estados sistêmicos ou generalizados como a desnutrição geral, anemia por deficiência de ferro e extrínsecos como a sífilis, cândida e os vírus (LOBÃO et al., 2011). A hereditariedade parece não desempenhar um papel principal nos casos de câncer oral, responsável por apenas 4% das incidências, porém, para alguns tipos de carcinomas devem ser observados e levados em conta o histórico familiar, como os cânceres de mama e de intestino (CARLI et al., 2009; NEVILLE et al., 2009). Na boca, os carcinomas originam-se em áreas com ceratoses actínicas ou próximo a elas, perfazendo 80% dos casos (PEREIRA et al., 2006).

A localização anatômica é considerada fator de influência no prognóstico, considerando que os tumores apresentam comportamento clínico diferente conforme a sua localização (COSTA et al., 2002; BARROS, 2006). As regiões anatômicas de alto risco para o desenvolvimento do CAE na mucosa bucal são: lábio inferior, mucosa jugal, região retromolar, palato mole, bordas laterais entre o terço médio, posterior, ventre da língua e assoalho de boca (GASSEN et al., 2005; NEVILLE et al., 2009). A língua e o assoalho de boca apresentam marcante envolvimento nodal, pobre diferenciação histológica e alta agressividade (OLIVEIRA et al., 2006; ALVES et al., 2011), com tendência a recorrência pós-cirúrgica, principalmente nos dois primeiros anos (AL-RAJHI et al., 2000) e predisposição para produzir metástases em linfonodos regionais (O'CHAROENRAT et al.,

2003). As lesões de lábios tendem a ter um bom prognóstico e baixo grau de metástases (DANTAS et al., 2003).

Carvalho et al. (2001), Perussi et al. (2002), Oliveira et al. (2006) realizaram trabalhos em Campina Grande (PB), São Paulo (SP) e Ribeirão Preto (SP) e relatam que o sítio mais acometido pelo carcinoma de boca é a língua, seguido de assoalho bucal, locais de difícil tratamento, pior prognóstico e maior comprometimento linfonodal, dado este provavelmente associado a proximidade do local com as cadeias linfáticas mentuais e submandibulares (BRENER et al., 2007; ALVES et al., 2011). Perussi et al. (2002) observaram ainda o predomínio da região jugal em pacientes idosos e lesões de língua nos jovens. Antunes e Antunes (2004), em Pernambuco, citaram lábios e língua como os sítios mais comuns. Dedivitis et al. (2004) e Teixeira et al. (2009) relataram que tumores de orofaringe provocam nitidamente mais óbitos que os tumores de boca, em torno de 2,4 vezes, avaliados na cidade de Santos.

Segundo Alves et al. (2011), o prognóstico do câncer bucal tem por base a gradação histológica de malignidade associada com os parâmetros clínicos em relação ao tamanho, invasão dos tecidos vizinhos, localização anatômica do tumor, presença ou não de metástases. O entendimento da progressão dos tumores tem atualmente recebido contribuição a partir de estudos histoquímicos e imunoistoquímicos que objetivam analisar alterações específicas das proteínas envolvidas no ciclo celular associada à agressividade e às lesões tumorais.

O estadiamento pelo Sistema TNM (Tamanho, Nódulos, Metástases) estabelecido pela *Internacional Union Against Cancer* (União Internacional Contra o Câncer - UICC), sintetiza as características do tumor e serve de guia terapêutico (OMS, 1988), tem forte relação com a agressividade do tumor, é aceito mundialmente e não fornece informações quanto às características histológicas e biológicas, mas está aliado a prognósticos clínicos (COSTA et al., 2002; DANTAS et al., 2003).

Os tumores menos diferenciados recebem os números mais altos e quanto maior as classificações do estadiamento, pior o prognóstico, pois significa o envolvimento dos linfonodos e constatação de metástases à distância, relacionada por 90% de mortes de pacientes (AMORIM et al., 2002; COSTA et al., 2002; ABREU et al., 2004; NEVILLE et al., 2009).

Em estudo desenvolvido por Gonzales-Moles et al. (2002), o parâmetro que exibiu maior relação com a sobrevida dos pacientes foi o tamanho da margem de ressecção (margem de segurança) e profundidade tumoral, pelos números de camadas envolvidas pelo CA e tipos celulares, pois quanto mais profunda maior o número de células indiferenciadas,

possibilitando uma maior reprodução destas células não especializadas, uma maior migração e disseminação de células neoplásicas (Al-RAJHI et al., 2000). Os parâmetros anatomomorfológicos encontraram-se relacionados com o desempenho biológico, embora sua correlação com o prognóstico não seja tão forte quanto a do estadiamento clínico. A avaliação microscópica de camadas profundas é importante para fornecer subsídios que possibilitem a leitura da agressividade de uma neoplasia e conseqüentemente, de grande valor prognóstico (COSTA et al., 2002; PEREIRA et al., 2006).

As terapias frequentemente usadas para o tratamento de câncer de boca dependem do local, do estágio da doença e da saúde geral do paciente (BETTENDORF et al., 2004). Consistem em cirurgias, radioterapias e quimioterapias, fundamentadas na excisão completa do tumor, radiação e, conseqüentemente, alteração letal das células neoplásicas e de células normais adjacentes, respectivamente (CARVALHO et al., 2012). A decisão pela alternativa combinada de tratamento depende de fatores como o estadiamento tumoral, relação com as estruturas anexas, envolvimento da cadeia linfática, idade, cooperação do paciente, além do subtipo histológico da lesão (LUNG et al., 2007).

2.3 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um microambiente complexo de macromoléculas tridimensionais estáveis e insolúveis formada por moléculas de diferentes naturezas, produzidas, exportadas, transformadas pelas células, que modula a estrutura, a fisiologia e a biomecânica dos tecidos, formando uma base sólida de suporte celular com uma porção amorfa que une as células, é reservatório de fibroblastos, condroblastos e células endoteliais (LYNCH; MATRISIAN, 2002).

A MEC é formada por substâncias fundamentais (glicosaminoglicanas e proteoglicanas), nela estão imersos elementos fibrosos (colágeno e elastina) elementos estruturais e os não fibrosos como a fibronectina, laminina, tenascina e entactina, que tem função de adesividade (BRASILEIRO FILHO, 2004). O colágeno é constituído de proteínas que formam cadeias em tripla hélice, resultando em fibras de grande força tensil. As fibronectinas estão presentes em três locais: no plasma (opsoninas), nas moléculas de adesão (superfícies das células) e nas fibrilas de matriz que fazem a quimiotaxia de fibroblastos, sendo sintetizada em várias células, principalmente em macrófagos e nos próprios fibroblastos. As lamininas são glicoproteínas extracelulares que promovem a adesão. É

formada de três camadas que influenciam o potencial da célula para crescimento, diferenciação e migração celular (VICENT et al., 2005).

A MEC não funciona somente como barreira física; é organizada em redes, que faz a ancoragem celular, dá resistência à compressão e o estiramento dos tecidos, permite a circulação de nutrientes e eliminação dos dejetos celulares, funciona como meio de transporte, migração, aderência, proliferação. Dá uma predisposição a apoptose, um grau de diferenciação e é reservatório de fatores essenciais ao funcionamento celular, como os fatores de crescimento, citocinas, proteases, hormônios e outras moléculas bioativas que eventualmente interagem com a superfície celular (BORNSTEIN; SAGE, 2002; BARROS, 2006).

A matriz extracelular se apresenta de várias formas, dependendo da maior ou menor concentração de fibras, como: elastinas e colágenos (tecido conjuntivo ou fibroso), substância fundamental gelificada (cartilagem) ou impregnada de cálcio (osso) (PEREIRA et al., 2005).

Relata-se que a MEC pode regular o comportamento celular por vários mecanismos através da composição de suas proteínas em um determinado tecido e por interações sinérgicas entre fatores de crescimento e moléculas de adesão ou por receptores celulares que agem como mediadores na adesão de componentes de células normais e neoplásicas e, por consequência, a lise do estroma com sua degradação, é considerada caminho preparatório para a invasão tumoral (RUNDHAUG, 2003; DECLERCK et al., 2004; PEREIRA et al., 2005).

A MEC também é substancialmente modificada por proteases produzidas por células de tumor ou células do estroma. Como resultado da atividade dessas proteases, célula-célula e as interações célula-MEC, são alteradas, novas moléculas biologicamente ativas são geradas. Na angiogênese, as substâncias da MEC podem atuar como reguladores positivos ou negativos na proliferação de células endoteliais e morfogênese vascular (DECLERCK et al., 2004).

O processo de formação de metástases depende de inúmeras interações entre as células malignas e o estroma (DECLERCK, 2000). A metastização é um processo complexo, formado por múltiplas etapas como o destacamento da célula alterada do sítio primário, passando pela degradação da membrana basal e da MEC migração para os vasos sanguíneos e linfáticos, ruptura da membrana basal vascular, emigrando-se das junções endoteliais, evasão do sistema de vigilância imunológica, adesão ao endotélio vascular de órgãos e tecidos distantes. A sobrevivência do tumor, muitas vezes, se dá pela neoangiogênese e proliferação no microambiente invadido (BETTENDORF et al., 2004; LOBÃO et al., 2011).

De acordo com Albert et al. (1997), há uma MEC especializada, em forma de lâmina sob a superfície basal dos tecidos epiteliais e endoteliais. Apresentam-se também em membranas de revestimentos, além de envolver células musculares, nervosas e adiposas, é denominada lâmina ou membrana basal (MB) e exerce diversas funções fisiológicas, funciona como barreira seletiva para o movimento celular e como filtro de moléculas, participa de migração de células, nutrição, sustentação, desenvolvimento embrionário e nos processos de regeneração, determina a polaridade das células e induz a diferenciação celular.

Ao microscópio eletrônico ela é trilaminar, tendo ao centro uma lâmina de colágeno IV (entactina) envolvido por duas porções claras, a superior chamada de lâmina lúcida (glicano) e a inferior, lâmina fibroreticular é constituída de fibronectina, heparina, proteoglicana fazendo conexão com a MEC (VENTURI et al., 2004; ERDEM et al., 2007).

Em CAE bucal pouco diferenciado ocorre pronunciada perda da expressão das lamininas e seus receptores (integrinas), quando comparadas às lesões pré-malignas e processos inflamatórios. Com o aumento das displasias, há uma descontinuidade linear na membrana basal pela degradação do colágeno IV, perda focal e deposição no estroma próximo as células invasoras neoplásicas (VENTURI et al., 2004). Os colágenos são classificados em mais de 25 tipos, quatro são mais comuns e cada um com características próprias, tanto em natureza química, como padrão de organização estrutural (fibrilas, feixes e fibras) (PEREIRA et al., 2005).

Vicent et al. (2005) citaram que a MEC afeta significativamente as células tumorais que se desprendem da massa tumoral, fazendo dispersão ou migração pela corrente sanguínea ou linfática até outras regiões e evadindo-se do aparato de vigilância imunológica. Estas células formam novos nichos de células tumorais e isto recebe o nome de metástase. Para fazer esta nova colonização e a expansão do processo de invasão (expansão clonal), as células neoplásicas precisam vencer barreiras como a membrana basal, os tecidos subjacentes, MEC intersticial, fazer a invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos (*intravasation*). Estes microambientes são degradados por meio de proteases produzidas por diversos tipos celulares, que promovem a fuga das células neoplásicas dos sítios primários (ALBINI et al., 2001), são divididas em cinco grupos: serinas, cisteínas, treoninas, proteínas aspárticas e as metaloproteinases, que é o objetivo desse estudo (DECLERCK, 2000).

2.4 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs), do inglês *matrix metalloproteinases*, constituem um grupo de enzimas proteolíticas (endopeptidases) que, coletivamente, são capazes de degradar e remodelar todos os componentes da MEC e das MB, estão diretamente relacionadas à progressão neoplásica (KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003; VICENT et al., 2005; CARPENA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Forma um conjunto multigênico de mais de 30 enzimas relacionadas geneticamente (REIS, 2013), zinco dependentes, que se mantêm em equilíbrio com seus inibidores específicos, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), do inglês *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*. São proteínas que apresentam pouca expressão em tecidos normais, mas são altamente marcadas em neoplasias (ROBINSON et al., 2003).

As MMPs agem fisiologicamente na arquitetura da MEC, regulam a matriz biológica pela modulação de fatores de crescimento, atuam na angiogênese, proliferação celular, remodelação tecidual, embriogênese, morfogênese do sistema nervoso central e dos órgãos, agem em todos os estágios da cicatrização, apoptose e funcionam muitas vezes como rota de fuga para a disseminação de células tumorais (FOLGUERAS et al., 2004; MOTT; WERB, 2004; CAVALHEIRO, 2008).

As MMPs influenciam a inflamação, resposta fisiológica de proteção cuja função é eliminar os patógenos e reiniciar uma reparação. Muitos tumores podem surgir a partir de áreas inflamadas, vistas como feridas que não cicatrizam (KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003).

As MMPs têm sido encontradas em quantidade elevada nestes casos, pois, em altos níveis, podem desencadear uma degradação não controlada e nova deposição de componentes da matriz extracelular, não cumprindo as etapas necessárias a uma cicatrização bem coordenada (ARAÚJO et al., 2011). Patologicamente podem ser observadas em artrites, doenças cardiovasculares, pulmonares, dermatoses bolhosas autoimunes, retinopatias diabéticas, feridas crônicas, psoríases e no câncer (PREPARANDO et al., 2002; PEREIRA et al., 2005; BREW; NAGASSE, 2010).

As principais células produtoras das MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais (BAKER et al., 2006; CARPENA et al., 2008 ARAÚJO et al., 2011;). A maioria das MMPs são secretadas nas células e ativadas extracelularmente por proteinases ou por ativação química *in vitro* (BREW; NAGASSE, 2010). Os diferentes tipos celulares expressam diferentes complementos

para as MMPs e não reagem necessariamente da mesma forma em resposta ao estímulo de ativação das metaloproteinases (BIKERDAL-HANSEN et al., 1993).

A identificação das MMPs ocorreu em torno de 1962 por Gross e Lampierre, que observaram uma enzima em cultura de fragmentos de pele de girinos capaz de degradar a tripla hélice de colágeno tipo I maduro. Com o passar do tempo, foram identificadas e classificadas em seis grupos de acordo com a especificidade do domínio, organização estrutural e substrato de degradação (NAVARRO et al., 2006).

Há 24 genes distintos que codificam as MMPs (FOLGUERAS et al., 2004). Em 2004, Lin et al. verificaram um pleomorfismo no gen da MMP-2 e associaram esse genótipo ao risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral. Indivíduos que apresentam o genótipo tipo CC tem duplicado o risco de desenvolvimento desse carcinoma quando comparados aos genótipos CT e TT.

Estas endopeptidases são secretadas na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimógenes, compostas por um pró-peptídeo sinalizador, um domínio catalítico e um domínio hemopexina. O pró-peptídeo, com cerca de 80 aminoácidos é responsável pela latência da enzima e precisa ser quebrado para a ativação com zinco no sítio ativo de ação catalítico (domínio catalítico) bem conservado (DECLERCK, 2000). O domínio catalítico contém um íon zinco, o que caracteriza estas enzimas (MMP-9, ácido aspártico e MMP-2, ácido glutâmico) (BJÖRKLUNG; KOIVUNEN, 2005). O domínio C-terminal hemopexina determina substratos e inibidores de cada MMP, que se envolvem com outras MMPs e TIMPs (Inibidores Teciduais de Metaloproteinases) e requer íons Ca^{++} para a sua atividade e estabilidade (Figura 1) (WESTERMARCK; KÄAHARI, 2002; FREITAS et al., 2011).

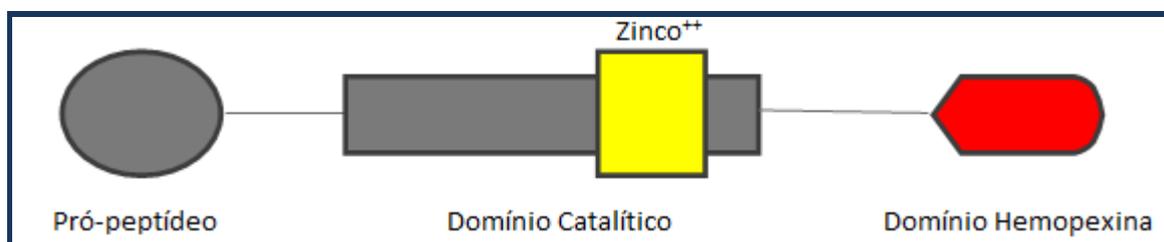


Figura 1 - Esquema da estrutura das MMPs.

Fonte: Cavalheiro, 2008.

As MMPs são ativadas no ambiente pericelular (citosol) dos tecidos por proteases como plasminas, tripsinas, triptases, ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e MMPs ativas (VICENT et al., 2005; SUN, 2010). Este processo de ativação intra ou extracelular das MMPs

é pH neutro-dependente (VICENT et al., 2005; NAVARRO et al., 2006; PEREIRA et al., 2006; CARPENA et al., 2008; SUN, 2010; DOI et al., 2011).

A clivagem das metaloproteinases faz-se através da quebra da ligação de cisteína Zn^{++} , com o envolvimento e a interação com outras MMPs e TIMPs. Algumas MMPs exibem domínios adicionais ou pequenas inserções de diferentes substratos (SOUZA; LINE, 2002; WESTERMARCK; KÄAHARI, 2002; RUNDHAUG, 2003).

O padrão de expressão de MMP em tumores varia com uma função da MMP e também o tipo de câncer (DECLERCK, 2000). Estas gelatinases são capazes de romper barreiras físicas como a MB e a MEC intersticial e participam diretamente do desenvolvimento tumoral pela regulação da angiogênese, o que proporciona nutrição, crescimento, disseminação do tumor e resistência às drogas (DECLERCK, 2000; CAVALHEIRO et al., 2008). Podem interagir com moléculas de adesão celular de variadas classes, pela degradação da e-caderina/catenina, o que facilita o movimento das células neoplásicas, causando alteração do microambiente celular (ZUCKER et al., 2001; FRANCHI et al., 2002).

Os níveis de MMPs nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis. A expressão das MMPs aumentam após sinalização das células tumorais, induzindo a degradação dos tecidos vizinhos, inicialmente com hidrólise do colágeno tipo IV, importante constituinte da membrana basal (MB), a partir desta quebra há invasão do estroma local, ultrapassando a membrana basal dos vasos sanguíneos e linfáticos (ROBINSON et al., 2003; ABREU et al., 2004; PEREIRA et al., 2006; CARPENA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008), isto sugere que a marcação intensa das MMPs leva a um prognóstico negativo, especialmente para pacientes portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (BORNEISTEIN; SAGE, 2002; ROBINSON et al., 2003; POLETTE et al., 2004; NAVARRO et al., 2006; PEREIRA et al., 2006).

As MMPs podem estar envolvidas em mecanismos de fuga do sistema imunológico circulante, através da interação das células neoplásicas com as plaquetas e inibição de algumas funções destas, entre elas, a proliferação de células imunocompetentes, como a célula *T helper* e a atividade das *natural killer* (GASSEN et al., 2005). O envolvimento de células neoplásicas por trombos plaquetários pode escondê-las do sistema imune e facilitar o extravasamento celular pela aderência deste trombo neoplásico ao endotélio (CAVALHEIRO et al., 2008). Foram notificados raros exemplos de correlação negativa das MMPs com os cânceres (DERYUGINA; QUILEY, 2006).

Em tumores, as MMPs podem ser produzidas tanto pelo estroma tumoral como pelas próprias células neoplásicas. Experimentos mostram evidências da cooperação ou sinergismo entre células neoplásicas e células do estroma na produção destas gelatinases (DECLERCK, 2000; FRANCHI et al., 2002; NABESHIMA, 2004; FREITAS et al., 2011).

O estudo destas endopeptidases em vários tipos de neoplasias tem demonstrado sua especificidade e utilidade como marcadores prognósticos, o que pode conduzir a pesquisas de fármacos dirigidos para metaloproteinases específicas e desenvolvimento de inibidores sintéticos, aumentando assim as possibilidades terapêuticas (CURRAN; MURRAY, 2000; NAVARRO et al., 2006).

As MMPs são classificadas de acordo com os substratos, que são semelhantes, porém não idênticos, são: A) collagenases (MMPs-1, -8, -13), que digerem a tripla hélice do colágeno; B) gelatinases (MMPs-2, -9), que atingem o colágeno IV e a gelatina desnaturada, membranas basais e laminina; C) estromelinas (MMPs-3, -10, -11) que degradam as proteoglicanas; D) matrilisinas (MMPs-7,-26), que degradam as proteoglicanas, fibronectinas e lamininas (MEDEIROS et al., 2012); E) metaloproteinases ligadas à membrana MMP-MMT (MMPs-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25), degradam além da gelatina, fibronectina e outros substratos de MEC (POLETTE et al., 2004); F) Outras MMPs (MMPs-12, -19, -20, -21, -27, -28, -29), capazes de degradar todas as partes da MEC e proteínas do tecido conjuntivo (SOUZA et al., 2002; BAKER et al., 2006; NAVARRO et al., 2006; SUN, 2010).

As gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A, MMP-9 ou gelatinase B), que são os objetos deste estudo, constituem um grupo que tem capacidade de degradar o colágeno desnaturado (gelatina), o colágeno I, IV, V, VII, o colágeno X (gelatinase A), o colágeno XI e XIV (gelatinase B) e lamininas (ROBINSON et al., 2003; POLETTE et al., 2004; PEREIRA et al., 2006; CARPENA et al., 2008).

A MMP-2 é parte constitutiva particularmente em células estromais (POLETTE et al., 2004); a MMP-9 em leucócitos normais e em células transformadas. A diferença mais notável é que a MMP-2 tem a capacidade de degradar o colágeno I nativo (SILVEIRA et al., 2007), a MMP-9 hidrolisa o colágeno tipo IV e as lamininas, componentes da MB (BJÖRLUNG; KOIVUNEN, 2005) Para ativação da MMP-2, é necessário o trio Pró-MMP-2 - TIMP-2 - MMP de membrana (PEREIRA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; CARPENA et al., 2008).

Em grandes concentrações, a MMP-2 estimula a atividade migratória dos fibroblastos durante a fase de proliferação das feridas e angiogênese, formando novos vasos, o que contribui e promove a cura acelerada (BORNEISTEIN; SAGE, 2002). A MMP-2 é a principal metaloproteinase produzida por fibroblastos da pele, e está envolvida em processos

patológicos, como lesões de pele cancerosas ou pré-cancerosas após exposição à radiação ultravioleta (ARAÚJO et al., 2011).

A expressão das MMPs-2 tem sido relacionada a inúmeros cânceres (FUNDYLER et al., 2004), entretanto, ainda há desacordo sobre sua ação em câncer de esôfago. Costa et al. (2002) e Felin et al. (2009) demonstraram que a MMP-2 parece não contribuir na carcinogênese deste câncer. Relataram que apesar da presença das MMPs-2 e -9 estarem bem estabelecidas depende de um contexto biológico, como por exemplo, a presença de regiões promotoras bastante complexas. Já Yamamoto et al. (2004) relacionou a hiperexpressão da MMP-2 em carcinoma de esôfago com o avanço do grau e do estadiamento.

A MMP-9 se expressa em tecidos normais em nível baixo ou está ausente. É associada à remodelação tecidual. Sua marcação, ativação e seletividade dependem do substrato. Sua localização à superfície da célula é essencial para a sua capacidade de promover a invasividade tumoral, aumento da vascularização e angiogênese (CURRAN; MURRAY, 2000). Esta gelatinase está associada ao pior prognóstico nas variedades dos cânceres humanos. Pode também estar envolvida no desenvolvimento de cistos e tumores odontogênicos com participação ativa na interação entre as células epiteliais e os componentes mesenquimais (KUBOTA et al., 2000; KUMAMOTO et al., 2003). Sua ativação se dá pela cascata plasmin e pela tripsina-2 (POLETTE et al., 2004).

As MMPs-9 são observadas em níveis mais altos em tumores metastáticos que nos não metastáticos. A produção é feita por células neoplásicas e estroma, sendo maior no parênquima. Acredita-se que as MMPs do estroma potencializam as do parênquima, apoiando a hipótese de que há uma interação entre as células neoplásicas e a MEC (HENRIQUE et al., 2012). Áreas de inflamação podem influenciar o desenvolvimento de tumores pelo aumento da MMP-9, levando a um pior prognóstico (KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003).

As MMPs-9 têm relação direta com o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), um importante indutor da formação de vasos e sangue, mediando à liberação do VEGF ligado à MEC. Desta forma, parece que a MMP-9 atua indiretamente no recrutamento de células endoteliais produzidas por diferentes células vasculares do músculo liso, endotélio e células inflamatórias. Este aumento da vascularização contribui para nutrição, manutenção e disseminação das células tumorais. Estas metástases pela angiogênese se dão pelo aumento da permeabilidade vascular e estão associadas à progressão e ao pior prognóstico de carcinomas (HENRIQUE et al., 2012).

A MMP-9 é excessivamente marcada em displasias angiogênicas e carcinomas invasivos. A diminuição da marcação destas MMPs *in vitro* mostra redução da proliferação

dos queratinócitos, da migração dos neutrófilos através da MB e a diminuição da incidência de tumores invasivos (YOSHIZAKI et al., 2002; PARIZI et al., 2010). Em câncer de esôfago, sua maior expressão depende da densidade das células tumorais e sua localização intratumoral (centro ou periferia do tumor) (ROBINSON et al., 2003).

As MMPs-2 e -9 têm merecido destaque por apresentarem importante papel nas doenças cardiovasculares, como a hipertensão, pois os níveis de MMPs-2 podem prejudicar o relaxamento vascular e causar hipertrofia arterial principalmente na camada média dos vasos, com a deposição excessiva de colágeno e elastina. Podem contribuir para disfunção e remodelamento vascular hipertensivo (GUIMARÃES et al., 2010).

Robinson et al. (2003) avaliaram a marcação das MMPs-2 e MMPs-9 em CAEs orais com e sem metástases e observaram expressão mais intensamente marcada no grupo metastático, significativamente para as MMP-9. Franchi et al. (2002) avaliaram imunohistoquimicamente as MMPs-2 e -9 e não observaram correlação entre as expressões das MMPs estudadas e parâmetros clínicos, entretanto, tumores com a expressão da MMP-9 aumentada tiveram maior frequência de metástases linfáticas em comparação com os tumores com expressão baixa ou ausente em carcinomas de cabeça e pescoço.

Na superexpressão das MMPs, os estudos apontam a MMP-9 exercendo um papel mais marcante que a MMP-2 na invasão tumoral (FRANCHI et al., 2002; PINHEIRO, 2002; ERDEM et al., 2007). Para isso, a localização das MMPs-9 na superfície celular é essencial (CURRAN; MURRAY, 2000). Albin et al. (2001) sugeriram o relacionamento estreito da presença da MMP-2 com a característica das células cancerosas.

Deryugina e Quiley (2006) compararam o valor prognóstico das MMPs-2 e -9 em melanoma cutâneo, não relatando evidência prognóstica para a MMP-9 em melanomas primários, contradizendo o estudo realizado por Fundyler et al. (2003), sobre a expressão das MMPs-2 em carcinomas cutâneos, que propõe o uso desta como marcador de tumores para metástases e ser objeto de estudos pra drogas dirigidas. Souza e Line (2002) relataram que durante as metástases, as células tumorais produzem MMPs para degradar os tecidos vizinhos, invadindo os tecidos circunvizinhos, ultrapassando a superfície basal dos vasos sanguíneos.

A expressão das MMPs-2 e -9 foram verificadas *in vivo* e *in vitro*. A MMP-9 é um importante modulador da matriz extracelular em carcinomas epidermóides orais. A técnica de imunohistoquímica que marca todas as metaloproteinases, latentes e ativas, a de zimografia marca somente as formas ativas (MEDEIROS et al., 2012). A expressão das MMPs-2 e -9 em carcinomas epidermóides em células estromais humanas foi observada e segundo Araújo et al. (2011), sugerem que as células estromais e tumorais desempenham um importante papel na

invasão e metástases nestas neoplasias, com associação significativa do aumento da MMP-9 e o grau de diferenciação tumoral.

Para Franchi et al. (2002), a interpretação de resultados imunoistoquímicos da expressão das MMPs em pacientes com tumores é uma questão bastante complicada, devido a localização das MMPs nos tecidos específicos em torno do tumor, onde a população celular é heterogênea. Para os autores, não fica claro se há uma superexpressão de uma enzima ou inibidor específico ou se a superexpressão é resposta do hospedeiro ao próprio tumor.

A MMP-9 é crucial para o desenvolvimento da angiogênese. A expressão de MMPs pode variar entre microambientes de órgãos acolhedores das metástases e favorecê-las, dependendo da combinação das MMPs com o estroma, pois diferentes MMPs podem favorecer diferentes metástases em diferentes órgãos. Por exemplo, MMP-9 positiva em melanomas, dependendo da via de incursão, pode gerar metástase no pulmão, isto reflete a complexidade do processo metastático guiado pelas MMPs, que muitas vezes se expressa ou não no mesmo câncer. A MMP-9 é encontrada em carcinomas invasivos de mama, porém não é encontrado *in situ*, revelando diferentes padrões para diferentes tumores (DERYUGINA; QUILEY, 2006).

As atividades das MMPs são reguladas no nível da transcrição e vários fatores podem estar envolvidos nesta regulação, como: hormônios, citocinas e fatores de crescimento epidermal (EFG) (BAKER et al., 2002). Estes fatores são derivados de hepatócitos, fragmentos ativos da clivagem da MEC (DECLERCK et al., 2004; ARAÚJO et al., 2011), são efeitos resultantes, geralmente de sua atividade proteolítica (FREITAS et al., 2011).

Segundo autores as atividades das MMPs no substrato da matriz extracelular são reguladas por quatro vias: (POLETTE et al., 2004; MURPHY; NAGASSE, 2008).

1. Por regulação da transcrição nos genes das MMPs;
2. Por atividades de precursores;
3. Por diferentes especificidades de substrato;
4. Por inibidores de MMPs, os TIMPs.

Na Odontologia, as MMPs atuam nos processos fisiológicos como o início da mineralização dentária, remodelação do colágeno nos tecidos periodontais, processo de erupção dos dentes, e nos processos patológicos que acometem a cavidade bucal, atuam na destruição dos tecidos periodontais, lesões cariosas de raiz, metástases de tumores e desordens de articulação têmporomandibulares (NAVARRO et al., 2006).

As MMPs estão presentes na saliva, biofilme, esmalte, dentina, cimento e na placa dental. A principal metaloproteinase presente é a MMP-9, porém, na saliva secretada pela glândula parótida, não houve indicação da presença de gelatinases (HANNAS et al., 2007).

A MMP-2 tem sido detectada na camada odontoblástica da papila dental e no epitélio do esmalte do germe dentário humano, principalmente na fase tardia de campânula do desenvolvimento do germe dentário. Como observado por Cotrim et al. (2001), a expressão e atividade de MMP-2 aumentaram progressivamente do nascimento até o 15º dia de vida. Já, Figueiredo (2003) ressaltou que os níveis de MMP-9 no fluido gengival de sítios com perda de inserção em pacientes com periodontites foram significativamente maiores que outras MMPs. Eles demonstraram que a MMP-2, mas não a MMP-9, pode participar na remodelação e degradação da membrana basal e papila dental durante os estágios iniciais da morfogênese do dente humano.

O controle biológico das metaloproteinases ativas é feito pelos inibidores teciduais. São inibidores sanguíneos e teciduais que monitoram a ação destas endopeptidases através do controle da degradação dos tecidos, da invasão tumoral e das metástases. Ligam-se no sítio do zinco altamente conservado, agindo no nível de ativação e habilidades das MMPs de hidrolisar um substrato (BAKER et al., 2006).

Pinheiro (2002) observou que aplicações tópicas de óxido de zinco estimulam a cicatrização de feridas agudas e/ou crônicas. Além do Zn^{++} , outros sais metálicos ou bivalentes são capazes de inibir as MMPs, como o Cu^{++} , Hg^{++} e Sn^{++} em baixas concentrações (SOUZA et al., 2002; NAVARRO et al., 2006). Os sais de ouro têm sido usados no tratamento de artrite, pois o ouro se liga ao lado do metal pesado das MMPs, inibe o potencial do colagenolítico da enzima, impedindo assim a evolução do processo inflamatório e degradação dos componentes articulares característicos da artrite (NAVARRO et al., 2006).

Santos et al. (2004) avaliaram que o Zn^{++} , liberado pelo óxido de zinco e eugenol (ZOE), agem nas atividades gelatinolíticas pulpares, onde amostras de polpas foram cultivadas e analisadas por zimografia. A clorexidina revela a atividade inibidora das MMPs-2, -8 e -9 devido à sua composição e nível de ação: o cádmio e zinco inibem as metaloproteinases de matriz de esmalte *in vivo*, sendo que as MMPs-2 se mostram mais sensíveis à clorexidina em baixas concentração, que as MMPs-9 (GENDRON et al., 1999). Foi demonstrado que a tetraciclina inibe a colagenase do fluido gengival e dos tecidos, independente da dose (SOUZA et al., 2000).

Dentifrícios contendo citrato de Zn^{++} podem reduzir o desenvolvimento de inflamação gengiva em 25%. Sais de Zn^{++} também são usados como componentes ativos em dentifrícios

e enxaguatórios bucais, que podem reduzir o acúmulo de placa e a formação de cálculos (NAVARRO et al., 2006).

Quanto ao amálgama, o zinco e o cobre liberados são removidos pela saliva, induzem a diminuição das ações das MMPs na boca e a alta concentração destes metais na saliva pode interferir na cicatrização e remodelação tecidual. A atividade das MMPs em tecidos orais pode ser modulada por íons metálicos presentes no meio bucal, por conseguinte, a acumulação de metais em tecido conjuntivo pode interferir na formação e reabsorção dos componentes da matriz extracelular (SOUZA et al., 2000).

O mecanismo de ação do Zn^{++} , quando liberado por ZOE na inibição das MMPs (DECLERCK, 2000; SOUZA et al., 2000) ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que os íons metálicos interagem com os aminoácidos causando alterações estruturais que inativam a função catalítica dessas enzimas (VICENT et al., 2005). O zinco pode melhorar a saúde gengival por inibição direta das MMPs, presentes nos tecidos gengivais inflamados (SOUZA; LINE, 2002). Por isso há grande interesse em se observar a expressão das MMPs e uma maior atenção têm sido dadas aos quelantes de Zn^{++} para se desenvolver os inibidores sintéticos que serão usados nas terapias médicas e odontológicas, quando houver excesso de atividades nas MMPs nos tecidos (NAVARRO et al., 2006).

2.5 Inibidores de metaloproteinases

Os TIMPS são pequenas proteínas multifuncionais de 21-28 Kda (Kilodaltons), secretadas na superfície das células e fazem associações com proteínas da MEC e de outras células e regulam funções das atividades das formas ativas das MMPs (BAKER et al., 2002; ARAÚJO et al., 2011). Agem no nível da transcrição, ativação, inibição de zimógenes e hidrólise de determinados substratos (SOUZA; LINE, 2002). Além delas, MMPs podem controlar as atividades de diferentes tipos de metaloproteinases (ARAÚJO et al., 2011), como as alfa-2-macroglobulinas, presentes no plasma, também pode inibir as atividades das MMPs (FOLGUERAS et al., 2004; BJÖRKLUNG; KOIVUNEN, 2005).

Estas imunoglobulinas se ligam a sítio do zinco altamente conservado, atuando na ativação e habilidade das MMPs, na capacidade de hidrolisar o substrato, se ligam nas MMPs para retirá-las do ambiente extracelular (BIKERDAL-HANSEN et al., 1993; SOUZA et al., 2000 BAKER et al., 2002). Podem sofrer alterações dinâmicas moleculares induzidas por suas interações com determinadas MMPs (CURRAN; MURRAY, 2000). Estes inibidores

endógenos modulam a proliferação celular, aumentando ou diminuindo as ações das MMPs (BREW; NAGASSE, 2010).

Os TIMPs são multifuncionais, apresentam-se em quatro tipos (1, 2, 3, 4) presentes em todos os mamíferos. Os TIMPs humanos são 40% semelhantes em sequência entre si (BAKER et al., 2002; BREW; NAGASSE, 2010). O equilíbrio entre a produção das MMPs e os TIMPs representa um fator essencial para manter a homeostase da matriz extracelular (ALBINI et al., 2001). No desequilíbrio, os TIMPs são inativados e o processo de degradação de proteínas da MEC se torna exacerbado (CONSOLO et al., 2009).

TIMPs são os maiores inibidores das MMPs, porém este não é o seu único efeito biológico, pois algumas destas proteínas também induzem alterações na morfologia celular, estimulam o crescimento de vários tipos de células, estão envolvidos no desenvolvimento de células germinativas e têm efeito sobre a angiogênese, sendo capazes de suprimir eficazmente a neovascularização de tumores e o desenvolvimento de metástases em modelos experimentais (DERYUGINA; QUINGLEY, 2006), com a capacidade de reduzi-los. São secretados pelas células tumorais e por tecidos hospedeiros, podendo se ligar às formas ativas e latentes de muitas MMPs, funcionando como proteínas anti-metastáticas (ALBINI et al., 2001).

Estes inibidores exibem de 30 a 40% de homologia na cadeia de aminoácidos e possuem 12 resíduos de cisteína conservados (CURRAN; MURRAY, 2000). Os TIMPs -1, -2, -4 estão presentes na forma solúvel e o TIMPs-3 está fortemente vinculado à MEC. Os inibidores estão relacionados à promoção de crescimento celular, plasticidade sináptica e atividades antiangiogênicas e antiapoptóticas (BREW; NAGASSE, 2010).

A maioria das MMPs é inibida pelos TIMPs *in vitro*. O Tipo 1 (TIMP-1) e -2 (TIMP-2) representam membros bem caracterizados desta família de inibidores e apresentam atividades inibitórias contra todas as formas ativas e latentes de MMPs, embora os TIMPs-1 formem preferencialmente complexo com a MMP-9, o TIMP-2 atua sobre as MMPs-2 (BJÖRKLUNG; KOIVUNEN, 2005). A superexpressão destes inibidores reduz o crescimento das células tumorais (MURPHY et al., 1993).

A expressão dos TIMPs é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para o equilíbrio metabólico e estrutural da MEC (ALBINI et al., 2001). Sua ação inibitória é seletiva e reversiva e acontece de maneira balanceada, um TIMP para uma metaloproteinases (1:1) formando complexos TIMPs-MMPs, que tornam as proteases incapazes de se ligar ao substrato (SUN, 2010). A regulação coordenada entre TIMPs e MMPs é eficaz, mas com diferentes padrões de regulação, direciona a clivagem e a liberação

de fatores de crescimento importantes e, também, de receptores de superfície celular (BAKER et al., 2002) e podem sofrer alterações em suas dinâmicas moleculares induzidos por suas interações com proteases (BREW; NAGASSE, 2010). Os TIMPs agem através de fragmentos biologicamente ativos, liberados na degradação da MEC e pela interação direta de MMPs com macromoléculas da matriz, incluindo o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e o proteoglicano (VICENT et al., 2005; CAVALHEIRO et al., 2008).

Seu uso é restrito na terapia biológica, provavelmente devido à limitação imposta pela dose, que leva a sintomas nos músculos esqueléticos (mialgias). Estes possuem outras atividades fisiológicas além de suas capacidades inibitórias, por isso o cuidado para a ministração dos TIMPs sintéticos como agentes terapêuticos (BAKER et al., 2006).

O TIMP-2 é constitucional dos tecidos (CARPENA et al., 2008). Níveis elevados de TIMPs -1 e -2 em tecidos cancerosos estão associados ao pior prognóstico clínico em muitos tipos de cânceres, pelo fato de uma grande quantidade de MMPs, reporta a um grande número de células neoplásicas no mesmo microambiente, dando suporte a teoria do sinergismo (DERYUGINA; QUIGLEY, 2006; BREW; NAGASSE, 2010). O TIMP-2 é considerado inibidor de invasão e de metástases de células tumorais *in vitro* e *in vivo* e também da angiogênese e, às vezes, atua como ativador das MMPs pelo complexo ternário (BREW; NAGASSE, 2010), complexo tri-molecular formado pela MMP-14, TIMP-2 e Pró-MMP-2 na superfície da célula. A maior concentração de TIMP-2 é para inibir a ativação da pró-MMP-2 (CURRAN; MURRAY, 2000), os TIMPs -1 e -2 possuem receptores de superfícies que quando ativados fazem as vias de sinalização, que determinam o comportamento das células, frente a estas substâncias (BAKER et al., 2002).

Vários TIMPs sintéticos têm sido desenvolvidos na tentativa de controlar a síntese, a secreção e a ativação enzimática das MMPs. Foram testados em seres humanos, com baixa toxicidade, porém, com baixa eficácia. Foram usados derivados de tetraciclina, tentativas de inibição do RNA de interferência tentando diminuir a tradução do RNA na saída da célula, fazendo uma regulação negativa da síntese das MMPs (GIALELI et al., 2011).

Existem diversos tipos de inibidores sintéticos das MMPs, mas há controvérsias quanto aos resultados obtidos, pois as drogas apresentam pobre desempenho em ensaios clínicos, mostrando período de ação diferente daquele do câncer inicial. As MMPs têm diferentes funções nas etapas do câncer, o desafio é distinguir o papel específico de enzimas individuais em cada caso (MURPHY; NAGASSE, 2008).

Uma série de inibidores de MMP sintético foi concebida. O Batimastat® (British Biotch Inc. Oxford, Reino Unido), potente inibidor de largo espectro de MMPs, é um hidroxil

sintético, cuja estrutura imita a do colágeno, apresenta funções quelantes do íon zinco. Entretanto, os resultados foram abaixo do esperado. Este foi um dos primeiros medicamentos anti-MMP a ser clinicamente testado (ALVES et al., 2011).

Marimastat® é a segunda geração de inibidor sintético de MMPs, avaliado como agente anticâncer, o primeiro de administração via oral. O Prinomastat® (AG3340) foi também utilizado em testes clínicos sem resultado eficiente (ZUCKER et al., 2000). A Tetraciclina Modificada (Doxiciclina®) bem estabilizada é um agente antimicrobiano que possui propriedades inibitórias potentes, porém, não seletivas para as MMPs, quimicamente modificadas, testada com resultados notáveis no tratamento de doenças em que as MMPs desempenham papel patológico (GUIMARÃES, 2010).

Quanto a parâmetros de eficácia junto à terapêutica, como o uso de fármacos para regular a expressão das enzimas, está o desenvolvimento de drogas antitumorais, como os peptídeos miméticos, e os não peptídeos, os derivados de tetraciclina e os bifosfanatos, que interferem na ativação das MMPs (MORGUNOVA et al., 1999).

O objetivo das pesquisas como inibidores sintéticos é fazer com que estes se liguem ao local ativo da enzima e sejam específicos para certas MMPs com pouca ou nenhuma reação cruzada com outras MMPs. Os estudos buscam o desenvolvimento de um anticorpo potente e altamente seletivo para o uso nas terapias proteômicas, observando a fenotipagem do câncer. Estes fármacos devem visar os sítios fora dos domínios ativos das MMPs, relacionando-os aos substratos (exosítios), gerando uma nova classe de drogas seletivas (GIALELI et al., 2011).

2.6 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica (IHQ) é um método auxiliar de diagnóstico, sensível, de extrema importância e utilidade. É amplamente utilizada na diferenciação entre proliferações malignas e benignas, no diagnóstico histogenético de células anormais, na elucidação de dúvida de diagnósticos em neoplasias morfológicamente indiferenciadas, possibilitando a detecção de elementos tumorais, auxiliando o patologista na avaliação funcional e determinação do prognóstico de alguns tipos de tumores e na determinação de origem primária de neoplasias metastáticas de sítio primário desconhecido (SALLES et al., 2009). É usada na subtipagem de neoplasias para a seleção terapêutica, especialmente os menos diferenciados e metastáticos, e também na caracterização de produtos de secreção de células neoplásicas como hormônios, origem de carcinomas e identificação de micrometástases (BARRA, 2006).

O método permite que se faça uma leitura refinada da parte morfológica do espécime, pela marcação dos anticorpos. O uso de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina facilita sobremaneira a obtenção da amostra, análise e diagnóstico das lesões. A imunomarcação tem sido utilizada em vários trabalhos, por reação de precipitação, em áreas onde deve haver atividade proteolítica de progressão tumoral, pelo uso de anticorpos monoclonais ou policlonais, altamente específicos, idênticos e em abundância (YAMAMOTO et al., 2004).

Para os cortes histológicos é necessário pelo menos 6 a 8 horas de fixação do tecido, previamente clivado, em formol tamponado, antes da realização da técnica de imunohistoquímica. O excesso ou falta de fixação adequada dos cortes encobrem os sítios antigênicos, a demora na clivagem do material pode produzir autólise que também pode ser responsável pela negatização das reações para receptores (GOLDSTEIN et al., 2003; SALLES et al., 2009).

Os anticorpos monoclonais são os mais específicos em cortes histológicos, esfregaços, suspensões celulares, apresentam vantagens de baixo/moderado custo, alta sensibilidade e especificidade (YAMAMOTO et al., 2004).

Permite a análise de um ou de múltiplos antígenos simultaneamente, são aplicáveis em células vivas, detecção do tráfego celular, o uso de um antígeno em várias lâminas, com padronização e realização simples, necessitam de pequena quantidade de tecido, visualização através de microscópio comum e ampliação da reação com a biotina, porém, exige a desvantagem de mão de obra especializada, demora no processamento e preparações não permanentes (ALVES; ROMAN, 2005).

Os anticorpos policlonais são obtidos pela injeção de um antígeno peptídico específico em animais, produzindo uma resposta por estimulação secundária com o isolamento dos anticorpos a partir do soro. Uma mistura de anticorpos reconhece diversos epítomos, que são determinantes antigênicos e localizam o sítio exato da ligação do anticorpo na molécula do antígeno (receptores) (PINHO, 2005).

A técnica direta de IHQ faz uso de um anticorpo primário marcado com fluorescência ou cromógeno que reage com determinado antígeno e emite fluorescência ou coloração específica sem amplificação da reação, o que dificulta a interpretação. A técnica indireta é mais usada, com associação ao complexo avidina-biotina-enzima (ALVES; DeMELLO, 1999). O complexo é formado pela ligação de uma molécula (*streps*) avidina com várias de biotina, associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que pode conferir várias cores aos

antígenos teciduais marcados. As cores mais comuns são castanhas (marrom) (peroxidase + diaminobenzidina - DAB) e vermelhas (fosfatase alcalina + fast red). A técnica indireta é qualitativa em elementos presentes marcados ou em intensidade da reação (COSTA et al., 2002; SALLES et al., 2009).

A enzima peroxidase associada a um substrato cromógeno possibilita a identificação do local da reação antígeno-anticorpo, de especial utilidade nos casos dos mais difíceis diagnósticos, leva a indicação do prognóstico e do comportamento funcional. Pode acrescentar conhecimento quanto à histogênese, origem, desempenho maligno e benigno, detecção de áreas de micro invasão, identificação de micro metástases e produtos liberados na circulação (ALVES; DeMELLO, 1999; BARRA, 2006).

A técnica apresenta 3 etapas: a desidratação, quando há a retirada da água dos tecidos e substituição por álcool; a diafanização, substituição do álcool pelo xilol nos tecidos; a inclusão quando o xilol é substituído por parafina a 60 °C. Os blocos são submetidos a cortes de 2 a 5 micra e estendidos em lâminas previamente tratadas com organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano). As lâminas silanizadas são deixadas para secar por 24 horas em temperatura ambiente para melhor adesão dos tecidos e são levadas à estufa a 60 °C (BARRA, 2006).

No método avidina-biotina-peroxidase, a primeira reação é constituída pela incubação do anticorpo primário. Na segunda, o anticorpo é ligado à biotina e na terceira reação, a peroxidase se liga ao complexo avidina-biotina. Os procedimentos imunoistoquímicos devem obedecer a um protocolo, no qual os cortes passam por banhos de xilol de 5 minutos cada, reidratação em álcoois em graduação decrescente, três banhos em álcool absoluto, de 10 minutos cada, desparafinização e banhos em tampão fosfato salino (PBS), após o que ocorre o bloqueio e a recuperação antigênica utilizando 1% de albumina diluída em soro bovino, que serve para desmascarar alguns epítomos (menor porção do antígeno, capaz de produzir uma resposta imune) atingidos pela ação da formalina (BARRA, 2006).

O bloqueio da peroxidase endógena se faz com a solução de água oxigenada (10 volumes) a 3% em água destilada ou azida sódica, segue-se lavagem em água corrente e PBS. A recuperação antigênica (recuperação dos epítomos pelo calor) se faz de três maneiras:

- Digestão enzimática: Lâminas são incubadas em solução de tripsina 30mg% e cloreto de cálcio 34% em PBS, pH 7,9 durante 20 minutos a 37°C, seguindo-se lavagem em água corrente.

- Irradiação por micro-ondas: As lâminas são incubadas em solução de citrato 10 mM/pH 6,0 em forno micro-ondas (potencia máxima) por 9 minutos (2 vezes), esfriadas por 20 minutos em temperatura ambiente, seguindo-se de lavagem em água corrente.

- Incubação em calor úmido: as lâminas são incubadas em tampão de citrato 10 mM/pH 6,0 em panela de vapor por 30 minutos, seguindo-se em lavagem em água corrente (PINHO, 2005).

Após as etapas de recuperação antigênica, as lâminas são mergulhadas novamente em solução salina de PBS, depois incubadas com anticorpos específicos (policlonais ou monoclonais), diluído em tampão PBS, durante 16 h a 45 °C em câmara úmida. Segue-se o método de coloração que utiliza a alta afinidade da avidina ou estreptoavidina pela biotina. A avidina é uma proteína básica que possui quatro sítios de ligação com alta afinidade pela biotina. Para o sistema de revelação, existem vários reveladores no mercado brasileiro, porém, o de eleição é o 3', 3'- tetraidrocloro de diaminobenzidina – DAB, substância cromógena utilizada em radiografias. O DAB reage com a peroxidase contida no complexo avidina-biotina, precipitando-se como um pigmento acastanhado (ALVES; DeMELLO, 1999; ALVES; ROMAN, 2005; PINHO, 2005).

Em seguida, as lâminas são lavadas em água corrente por 5 minutos para serem submetidas à contra coloração com Hematoxilina. Os problemas na técnica são a inativação inadequada de enzimas endógenas, a injúria física dos tecidos por fixação inadequada, por autólise e reação cruzada inespecífica (BARRA, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão das MMPs-2 e -9 pelo método imunohistoquímico em espécimes de carcinoma epidermoide de boca.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão das MMPs-2 e -9 em células neoplásicas centrais e no *front* de invasão através do grau de marcação;

- Observar se as MMP-2 e -9 expressam-se no núcleo, citoplasma ou ambos, do *front* de invasão e de células neoplásicas centrais e se há diferença na expressão das metaloproteinases.

- Correlacionar a expressão das MMPs-2 e -9 com as características clínicas da amostra e da lesão;

- Correlacionar a marcação imunohistoquímica das gelatinases-2 e -9 com os escores de malignidade, estabelecidos por Bryne (1998), e a classificação do grau de diferenciação celular (OMS).

- Correlacionar a expressão imunohistoquímica das MMPs-2 e -9 com os valores de prognóstico da amostra.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Caracterização do estudo

O presente trabalho avaliou quantitativamente a expressão das MMPs-2 e -9 pelo método imunistoquímico em espécimes de carcinoma epidermoide de boca com diferentes graus de malignidade histológica.

4.2 Amostra

Foram selecionados 32 blocos de carcinoma epidermoide de boca/Prontuários, triados no serviço do Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho (FAODO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). (anexo 1).

Os critérios para inclusão foram casos de carcinoma epidermoide de boca, sem quimioterapias ou radioterapias prévias, com células preservadas, não alteradas pelas terapias. Material embocado em parafina em bom estado de conservação, quantidade suficiente para a obtenção de novos cortes histológicos e realização de experimento imunistoquímico para cada caso e de pacientes atendidos no período de 2004-2013.

Os critérios de exclusão foram carcinomas epidermóides emblocados em parafina com material insuficiente para a realização do experimento e/ou com grandes áreas de necrose, problemas de fixação e processamentos dos tecidos, má conservação dos blocos, dados incompletos e falhas nos registros dos prontuários, dúvidas diagnósticas, outros diagnósticos, casos fora do período estipulado e casos em que os pacientes tenham sido submetidos à quimioterapia e ou radioterapia coadjuvante.

O quadro apresenta a numeração dos blocos utilizados no presente estudo, seqüência e o ano (Anexo 2).

4.3 Análises morfológica de malignidade

Foram obtidos cortes histológicos de 5 micrômetros, estendidos em lâminas de vidro, submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE) e observados em microscopia óptica.

De acordo com Neville et al. (2009), o aspecto histopatológico do tumor relaciona-se com seu aspecto biológico. O sistema eleito para este estudo foi proposto por Bryne (1998), com análise de 4 aspectos: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório, com valores estabelecidos de 1 a 4 (quadro 1).

Foi realizada análise descritiva dos aspectos histomorfológicos dos espécimes com avaliação das células neoplásicas centrais e do *front* de invasão. Com a pontuação final dos escores, foi feita a somatória dos valores e uma classificação com finalidade de se obter uma projeção prognóstica (quadro 2).

Quadro 1 - Sistema de gradação de malignidade “modo de invasão” recomendado por Bryne (1998).

Parâmetros morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Altamente ceratinizado (+ de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco (+ de 75% de células maduras)	Moderado (50 a 75% de células maduras)	Intenso (25 a 50% de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, Bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n >15)	Dissociação celular pronunciada, em pequenos grupos e/ou individuais (n <15)
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Fonte: Sistema de gradação de malignidade, Bryne (1998).

Quadro 2 - Classificação dos escores quanto a valores de prognósticos Bryne (1998).

Valores	Valor Prognóstico
Somatória entre 4 e 8	Bom Prognóstico
Somatória entre 9 e 12	Prognóstico Moderado
Somatória entre 13 e 16	Mau Prognóstico

Fonte: Classificação de escores associados a valores de prognósticos, Bryne (1998).

Foi observada a classificação quanto à diferenciação em relação às células de origem e classificados em três graus (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) para posteriormente correlacioná-las com o grau de marcação imunoistoquímica, obedecendo a Classificação preconizada pela OMS, 1988 (quadro 3).

Quadro 3 - Classificação do grau de diferenciação preconizado pela OMS (1998).

GRAU de DIFERENCIAÇÃO- OMS	
PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
Pouco diferenciados (Indiferenciados)	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização
Moderadamente diferenciados mitótica	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
Bem diferenciado	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

Fonte: Lourenço et al. (2007). Classificações Histopatológicas para Câncer Oral.

A revisão histopatológica foi realizada por dois patologistas, de forma independente. Eventuais resultados conflitantes foram discutidos pelos mesmos para definição da análise.

4.4 Método imunoistoquímico

O método imunoistoquímico utilizado é um protocolo do manual de imunoistoquímica (ALVES; DeMELLO, 1999; PINHO, 2005; BARRA, 2006).

1- Novos cortes histológicos (3 micrômetros) em micrótomo rotativo manual para parafina (EK-micro-2).

2- Cortes foram estendidos em lâminas de vidro, previamente preparadas com organossilano (3-aminopropiltriétoxi-silano); Sigma Chemical Co®, St. Louis, MO, USA.

3- Estas lâminas foram desparafinizadas em xilol A, 30 minutos, xilol B, 20 minutos, hidratação de etanol em concentrações decrescentes por 5 minutos à temperatura ambiente.

4- Bloqueio da peroxidase endógena por solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (solução tampão salina fosfato), por 10 minutos.

5- Recuperação antigênica, em panela de pressão (pressão máxima, 15psi) Dako Target Retrieval Solution® (solução tampão citrato pH 6,0).

6- Os cortes foram submetidos à técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, incubadas com os anticorpos primários monoclonais (Rabbit Anti-Human MMP-2 (72 kDa) Collagenase IV, diluição 1/100, Rabbit anti-human MMP-9 (92 kDa) Collagenase IV, diluição 1/100, (Spring Bioscience®; CA:USA), 60 minutos à temperatura ambiente (TA).

7- Solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL, pH 7,4 por 5 minutos.

8- Amplificação da reação foi obtida com o sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Reveal Polyvalente HRP; Spring Bioscience®; CA: USA), solução *Reveal Complement* por 13 minutos e *Reveal HRP Conjugate* por 18 minutos a temperatura ambiente (SABP), segundo as orientações do fabricante.

9- Imersão em TRIS-HCL, duas trocas de 5 minutos cada.

10- Revelação da reação processou-se utilizando 3',3'-tetraidrocloro de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co®. MO:USA) em solução 1,2% com ativação por peróxido de hidrogênio por 3 minutos e lavagem em água corrente por 10 minutos.

11- Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Realizou-se a passagem em água corrente (duas vezes, por 5 minutos cada), seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos.

Como controle positivo, foram utilizadas amostras de cortes histológicos de carcinoma de mama e placenta, previamente conhecidas como positivas para os anticorpos pesquisados, seguindo as orientações do fabricante. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% diluída em solução salina fosfatada (PBS - pH 7,4).

As amostras foram avaliadas em microscópio Zeiss Plan-acharomat (415500-1800, Frankfurt, Alemanha), verificados campos histológicos de células neoplásicas centrais e *front* de invasão em aumentos de 100X e 400X. Após avaliação, foram capturadas imagens para arquivo no microscópio supracitado.

Foram analisadas as células neoplásicas coradas, considerando apenas expressões citoplasmáticas e nucleares nas células neoplásicas centrais e foram observadas as marcações em núcleo e citoplasma das células neoplásicas do *front invasivo*. Optou-se por trabalhar em quatro níveis de expressão de marcação para MMPs (ausente, fraca, moderada e intensa).

Quadro 4 - Características dos anticorpos utilizados para imunomarcação.

ANTICORPO/ CLONE	ESPECIFICIDADE	DILUIÇÃO	FONTE	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	TEMPO DE INCUBAÇÃO
E18014	MMP-2	1/100	SPRING BIOSCIENCE	CITRATO pH 6 10 min.	60 min. (TA*)
E3664	MMP-9	1/100	SPRING BIOSCIENCE	CITRATO pH 6 10 min.	60 min. (TA)

* TA – Temperatura Ambiente

4.5 Análise da imunoexpressão das metaloproteinases

A avaliação da expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em carcinomas epidermoides de boca foi feita individualmente, MMP-2 e MMP-9, em núcleos e citoplasmas de dois campos, nas células neoplásicas centrais e no *front* de invasão tumoral, no aumento de 100X e de 400X e classificou-se os resultados em quatro escores: 1) Ausente; 2) Fraca expressão: menos de 10% de células neoplásicas marcadas; 3) Moderada expressão: entre 10 a 50% de células marcadas; 4) Intensa: acima de 50% de células marcadas.

4.6 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o *Software* SPSS, versão 17.0 ou o Sigma Stat, versão 3.5, considerando um nível de significância de 5%.

A comparação entre os locais da lesão, em relação à idade dos pacientes, foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis. O mesmo teste foi utilizado na comparação entre os graus de diferenciação (pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado), tanto nas células neoplásicas centrais como no *front* de invasão, tanto para MMP-2 como para MMP-9, em relação ao escore de malignidade e também para comparação entre os prognósticos.

A avaliação da associação entre o local da lesão e as variáveis: gênero, enfartamento ganglionar, tabagismo, etilismo e uso de prótese foi realizada por meio do teste do qui-quadrado.

A comparação da marcação entre as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, tanto no núcleo como no citoplasma e no total, em células neoplásicas centrais e no *front* de invasão, em relação ao escore de malignidade, foi realizado por meio do teste de Wilcoxon.

O teste de Mann-Whitney foi usado na comparação entre gênero, faixas etárias e uso ou não de tabaco e álcool em relação à marcação, tanto nas células neoplásicas centrais como no *front* de invasão, para MMP-2 e -9.

A avaliação da correlação linear entre o escore de malignidade tanto nas células neoplásicas centrais como no *front* de invasão, de acordo com a imunohistoquímica para as MMP-2 ou MMP-9, e o escore total de marcação, foi realizada por meio do teste de correlação linear de Spearman. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráfico.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da gradação de malignidade

A classificação dos espécimes quanto a gradação de malignidade, observando os parâmetros estabelecidos por Bryne (1998) e somatória dos escores estão apresentados no Anexo 3.

A correlação dos valores obtidos na gradação histopatológica de malignidade, de acordo com a classificação de Bryne et al. (1998), relacionado à classificação dos prognóstico e grau de diferenciação, observa-se a relação de quanto mais alto os escores estabelecidos para a gradação histopatológica, pior o prognóstico da doença, porém, não foi estabelecido uma relação quanto o prognóstico e o grau de diferenciação da lesão.

Houve relação entre os escores de malignidade e o grau de diferenciação, confirmando o comportamento biológico da lesão, quando eles são moderados ou pouco diferenciados, quando já estão perdendo a similaridade com os seus tecidos de origem, fazendo uma transformação e proliferação difusa, tem um escore que varia de 9 a 16 no seu total, traduzindo assim a um prognóstico ruim da doença; estabelecendo uma relação indireta.

A amostra estudada teve os escores altos quanto ao pleomorfismo celular, pelo número de células maduras e alto padrão de invasão caminhando para difuso, que remete a ideia de carcinomas epidermóides com detecção tardia, pelo moderado infiltrado, de evolução adiantada pela pouca ceratinização, onde os queratinócitos já não cumprem a sua função que é produzir ceratina (Tabela 1). Confirmando os critérios do grau de diferenciação como moderado em uma frequência relativa de 20 indivíduos (62%) da amostra, com prognóstico moderado (Tabela 2).

Quadro 5 - Apresentação dos valores obtidos pela gradação histopatológica de malignidade, de acordo com a classificação de Bryne et al. (1998), classificação quanto ao prognóstico e grau de diferenciação.

CASO	SOMATÓRIA DOS ESCORES	PROGNÓSTICO	GRAU de DIFERENCIAÇÃO
1	14	Mau	Moderada/ diferenciado
2	11	Moderado	Moderada/ diferenciado
3	10	Bom	Moderada/ diferenciado
4	10	Bom	Bem diferenciado
5	14	Mau	Moderada/ diferenciado
6	6	Bom	Bem diferenciado
7	12	Moderado	Moderada/ diferenciado
8	9	Moderado	Moderada/ diferenciado
9	10	Moderado	Moderada/ diferenciado
10	11	Moderado	Moderada/diferenciado
11	11	Moderado	Moderada/ diferenciado
12	8	Bom	Moderada/ diferenciado
13	14	Mau	Moderada/ diferenciado
14	12	Moderado	Moderada/ diferenciado
15	11	Moderado	Pouco diferenciado
16	11	Moderado	Moderada/ diferenciado
17	10	Moderado	Pouco diferenciado
18	11	Moderado	Pouco diferenciado
19	8	Bom	Moderada/ diferenciado
20	9	Moderado	Pouco diferenciado
21	10	Moderado	Pouco diferenciado
22	8	Bom	Moderada/ diferenciado
23	11	Moderado	Moderada/ diferenciado
24	11	Moderado	Moderada/ diferenciado
25	11	Moderado	Pouco diferenciado
26	9	Moderado	Bem diferenciado
27	9	Moderado	Pouco diferenciado
28	10	Moderado	Moderada/ diferenciado
29	9	Moderado	Moderada/ diferenciado
30	6	Bom	Moderada/ diferenciado
31	8	Bom	Bem diferenciado
32	9	Moderado	Pouco diferenciado

Tabela 1 - Gradação de malignidade de carcinomas epidermoides de boca diagnosticados em pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFMS, no período de 2004 a 2013. Campo Grande (MS). (n=32)

Escores	1	2	3	4
Critérios				
Ceratinização	2	5	16	9
Pleomorfismo celular	5	8	14	5
Padrão de invasão	2	14	14	2
Infiltrado	9	17	6	0

*Conforme critérios de Bryne et al., 1998 – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A análise de gradação de malignidade resulta, para cada caso (n=32), o total de escores, entre 4 e 16, o que permite a classificação individual. Para a população estudada, a média de escores foi $10,09 \pm 1,96$ (média + desvio padrão).

Tabela 2: Frequências dos graus de diferenciação e prognósticos de carcinomas epidermoides de boca diagnosticados em pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFMS, no período de 2004 a 2013. Campo Grande (MS). (n=32)

Critérios	Frequência Relativa (absoluta)
Grau de diferenciação	
Bem diferenciado	12,5% (4)
Moderado/diferenciado	62,5% (20)
Pouco diferenciado	25,0% (8)
Prognóstico	
Bom	25,0% (8)
Moderado	65,6% (21)
Mau	9,4% (3)

*Conforme critérios de Bryne et al., 1998 – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com o local da lesão e as variáveis idades, gênero, enfartamento ganglionar, tabagismo, etilismo e uso de prótese.

Variável	Local da lesão					
	Gengiva	Lábio	Língua	Mucosa jugal	Palato	Assoalho
Idade (anos) (p=0,191)*						
	45,00±0,00	61,00±16,23	51,29±7,07	65,67±18,56	51,67±10,79	65,50±14,39
Gênero (p=0,651)**						
Feminino	0,0% (0)	11,1% (1)	42,4% (4)	22,2% (2)	11,1% (1)	11,1% (1)
Masculino	4,3% (1)	26,1% (6)	48,5%(10)	4,3% (1)	8,7% (2)	13,0% (3)
Enfartamento ganglionar (p=0,332)**						
Sim	0,0% (0)	8,3% (1)	41,7% (5)	16,7% (2)	8,3% (1)	25,0% (3)
Não	5,0% (1)	30,0% (6)	45,0% (9)	5,0% (1)	10,0% (2)	5,0% (1)
Tabagismo (p=0,095)**						
Sim	0,0% (0)	13,0% (3)	43,5%(10)	13,0% (3)	13,0% (3)	17,4% (4)
Não	11,1% (1)	44,4% (4)	44,4% (4)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
Etilismo (p=0,864)**						
Sim	5,3% (1)	15,8% (3)	47,4%(9)	10,5% (2)	10,5% (2)	10,5% (2)
Não	0,0% (0)	30,8% (4)	38,5% (5)	7,7% (1)	7,7% (1)	15,4% (2)
Uso de prótese (p=0,206)**						
Sim	0,0% (0)	14,3% (1)	28,6% (2)	28,6% (2)	0,0% (0)	28,6% (2)
Não	4,0% (1)	24,0% (6)	48,0%(1)	4,0% (1)	12,0% (3)	8,0% (2)

Os dados estão apresentados em média±desvio padrão da média ou frequência relativa (absoluta). * Valor de p no teste de Kruskal-Wallis. ** Valor de p no teste do qui-quadrado.

A distribuição dos pacientes de acordo com o local da lesão e as variáveis idades, gênero, enfartamento ganglionar, tabagismo, etilismo e uso de prótese está apresentada na

Tabela 3. Não houve associação significativa entre o local da lesão e as variáveis avaliadas neste estudo (teste do qui-quadrado, valor de p variando entre 0,095 e 0,864).

Foi observada uma tendência para o gênero masculino, tabagistas e etilistas, e a língua como o sítio de incidência a ser observado como atesta a literatura, porém o uso de prótese apresenta uma correlação negativa nos resultados da amostra (Tabela 3).

Tabela 4 - Resultados referentes à marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, de acordo com o gênero, faixa etária, uso ou não de tabaco e álcool.

Variável	Metaloproteinase		Valor de p*
	MMP-2	MMP-9	
Gênero			
Feminino	3 (2 – 4)	3 (3 – 4)	0,875
Masculino	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,500
Valor de p**	0,240	0,128	
Faixa etária (anos)			
Até 50	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	1,000
Mais de 50	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,375
Valor de p**	0,708	0,365	
Tabagismo			
Sim	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,250
Não	4 (3 – 4)	4 (3 – 4)	0,577
Valor de p**	0,625	0,454	
Etilismo			
Sim	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,500
Não	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,875
Valor de p**	0,788	0,493	

Os dados estão apresentados em mediana (mínimo-máximo). *Valor de p no teste de Wilcoxon; ** Valor de p no teste de Mann-Whitney.

Não houve correlação entre a marcação das metaloproteinases nos núcleos e nos citoplasmas e o escore de malignidade de um mesmo espécime, associadas a gênero, idade, tabagismo, etilismo.

5.2 Resultados da Imunoistoquímica

Os resultados referentes à marcação imunoistoquímica nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 estão apresentados na Tabela 5.

A expressão nos núcleos, tanto das células neoplásicas centrais como no *front* de invasão, marcados pelas MMPs-9 foi significativamente maior do que a MMP-2 nos mesmos locais (teste de Wilcoxon, $p < 0,001$). A marcação das MMPs-2 não foi expressiva no núcleo nem no citoplasma de células neoplásicas centrais e no *front* invasivo.

No citoplasma, não houve diferença entre MMP-2 e MMP-9, tanto em células neoplásicas centrais como no *front* de invasão em relação à expressão de marcação (teste de Wilcoxon, células neoplásicas, $p = 0,388$; *front*, $p = 0,064$). Porém, houve marcação entre os citoplasmas das células neoplásicas centrais e as células do *front* invasivo para as MMP-9 ($p = 0,003$) (Tabela 5).

Nos escores totais, a soma dos escores dos núcleos para MMP-2, não houve marcação, para a MMP-9 houve significância para a soma dos escores totais dos núcleos e citoplasma (células neoplásicas, $p < 0,001$; *front*, $p = 0,007$) (Tabela 5).

A marcação nos núcleos de todos os tipos de células não apresentou significância, porém, entre os citoplasmas de todos os tipos de células, registrou uma marcação para MMP-9 com $p = 0,003$ (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados referentes à marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunohistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.

Tipo celular/local	Metaloproteinases		Valor de p
	MMP-2	MMP-9	
Células neoplásicas centrais			
Núcleo	2 (1-4)	4 (2-4)	<0,001
Citoplasma	3 (1-4)	3 (1-4)	0,388
Total	3 (1-4)	4 (2-4)	<0,001
Front de invasão			
Núcleo	2 (1-4)	3 (2-4)	<0,001
Citoplasma	3 (1-4)	3 (2-4)	0,064
Total	3 (1-4)	3,5 (2-4)	0,007
Valor de p (entre totais)			
Entre tipos de células – núcleo	0,826	0,499	
Entre tipos de células – citoplasma	0,432	0,003	
Entre total	0,432	1,000	

Os dados estão apresentados em mediana (mínimo-máximo). Valor de p no teste de Wilcoxon

Estes resultados estão ilustrados na figura 2.

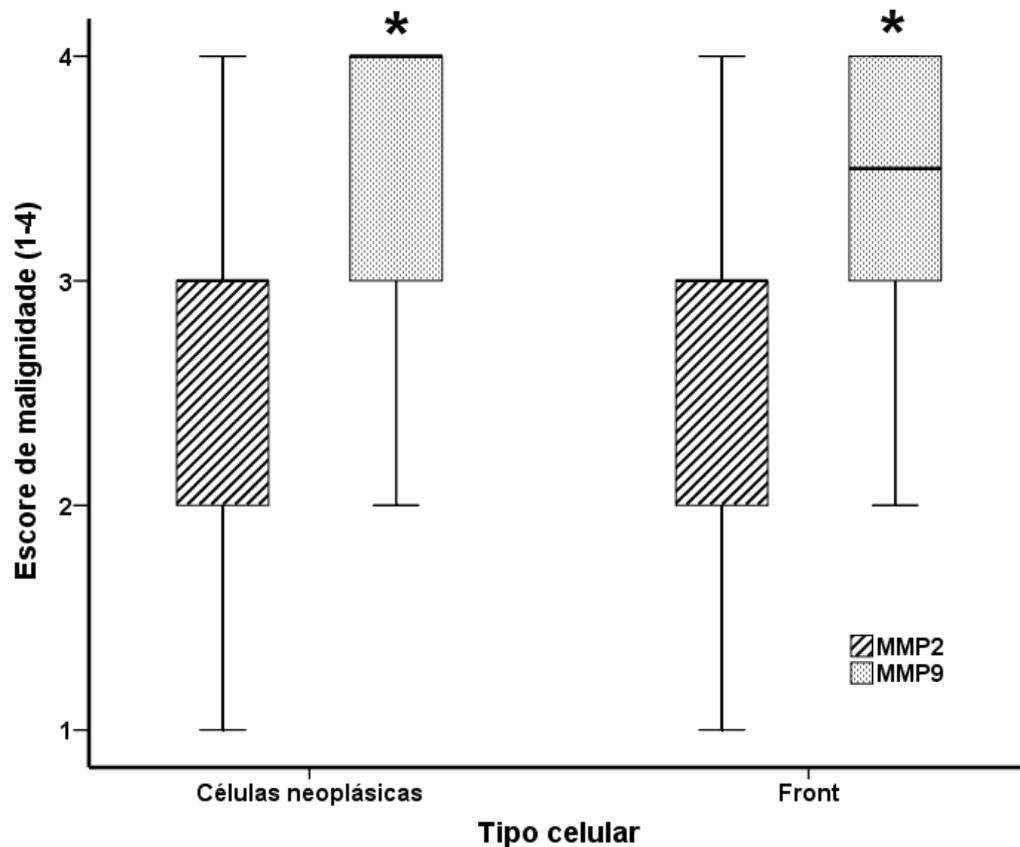


Figura 2 - Marcação total nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.

A linha horizontal em negrito representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a barra a faixa de variação. * Diferença significativa em relação à metaloproteinase MMP-2 (teste de Wilcoxon, células neoplásicas: $p < 0,001$; *front*: $p = 0,007$).

Houve maior marcação de MMP-9 em lesões classificadas como moderadamente diferenciadas tanto nas células neoplásicas centrais como no *front* invasivo e no total (Tabela 6).

Nos blocos, as metaloproteinases expressas foram observadas ao microscópio de luz com pigmentação acastanhada em núcleos e citoplasmas, com variada intensidade (Figuras 5, 8, 14). A positividade da expressão da marcação das MMP-2 e -9 foram observadas em dois locais diferentes, em células neoplásicas centrais e células neoplásicas do *front* invasivo.

O valor prognóstico referente ao escore total de grau de diferenciação foi considerado: Pouco Diferenciado para 18,8% (n=6) dos pacientes, Moderadamente diferenciado para 62,5% (n=20) dos pacientes e Bem Diferenciado para 18,8% (n=6) dos pacientes.

Os resultados dos escores de marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunohistoquímica para as metaloproteinases -2 e -9 e o grau de diferenciação histopatológica estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Marcação nas células neoplásicas centrais e do *front* de invasão, de acordo com a imunohistoquímica para as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e o grau de diferenciação histopatológica.

Metaloproteinase	Grau de diferenciação			Valor de p*
	Pouco	Moderado	Bem	
MMP-2				
Células neoplásicas centrais	3 (2 – 4)	2 (1 – 4)	3 (1 – 4)	0,264
<i>Front</i> de invasão	3 (2 – 3)	3 (1 – 4)	3 (2 – 4)	0,948
Valor de p**	0,375	0,240	1,000	
Total	4 (3 – 4)	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,620
MMP-9				
Células neoplásicas Centrais	4 (3 – 4)	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,631
<i>Front</i> de invasão	3 (3 – 4)	4 (2 – 4)	3 (2 – 4)	0,114
Valor de p**	0,750	0,375	1,000	
Total	3 (3 – 4)	4 (2 – 4)	4 (2 – 4)	0,053
Valor de p**				
Entre MMPs – célula neoplásica	0,500	<0,001	0,750	
Entre MMPs – <i>front</i>	0,500	0,011	1,000	

Entre MMPs – total	0,750	0,250	1,000
--------------------	-------	-------	-------

Os dados estão apresentados em mediana (mínimo-máximo). * Valor de p no teste de Kruskal-Wallis; ** Valor de p no teste de Wilcoxon.

Não houve diferença entre os graus de diferenciação em relação à marcação, tanto nas células neoplásicas centrais como no *front* de invasão e ambos (total), tanto para MMP-2 como para MMP-9 (teste de Kruskal-Wallis, valor de p variando entre 0,053 e 948). Também não houve diferença entre células neoplásicas centrais e *front* de invasão, em relação à marcação em nenhum dos diferentes graus de diferenciação, tanto para MMP-2, como para MMP-9 (teste de Wilcoxon, valor de p variando entre 0,240 e 1,000).

Nos tecidos com grau de diferenciação histopatológico pouco diferenciado e bem diferenciado, não houve diferença entre as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, tanto nas células neoplásicas centrais, como no *front* de invasão e no total (teste de Wilcoxon, valor de p variando entre 0,500 e 1,000), em relação ao escore de marcação. Por outro lado, nos tecidos com grau de diferenciação histopatológica moderado, o escore de marcação observado pela MMP-9 foi significativamente maior do que aquele para a MMP-2, tanto em células neoplásicas centrais (teste de Wilcoxon, $p < 0,001$), como no *front* de invasão ($p = 0,011$), porém, sem diferença entre as metaloproteinases no escore total ($p = 0,250$) (Tabela 7).

Não houve correlação linear entre a marcação das células neoplásicas centrais para a metaloproteinase MMP-2 e o escore total de marcação (teste de correlação linear de Spearman, $p = 0,438$, $r = -0,141$), assim como para o escore de marcação no *front* de invasão para a MMP-2 e o escore total de marcação ($p = 0,954$, $r = -0,010$). Também não houve correlação linear entre o escore de marcação das células neoplásicas para a MMP-9 e o escore total de marcação (teste de correlação linear de Spearman, $p = 0,117$, $r = 0,282$), o mesmo observado em relação ao o escore de marcação no *front* de invasão e o escore total de marcação ($p = 0,156$, $r = 0,256$).

Não houve correlação linear entre o grau de diferenciação e a expressão de marcação total para MMP-2 (teste de correlação linear de Spearman, $p = 0,823$, $r = 0,041$). O mesmo foi observado entre o grau de diferenciação e a expressão de marcação total para MMP-9 (teste de correlação linear de Spearman, $p = 0,953$, $r = -0,011$).

6 DISCUSSÃO

O termo câncer é utilizado genericamente para representar mais de 100 doenças, que tem crescimento desordenado e maligno, no qual as células invadem tecidos e órgãos e podem se espalhar por todas as regiões do corpo por metástases (INCA, 2012).

O carcinoma espinocelular é o câncer oral de maior incidência (NEVILLE et al., 2009). A degradação da MB, migração das células, quebra das adesões de célula-célula, célula-estroma, é um complexo processo que potencializa as dispersões das células mutadas (BAKER et al., 2002; BETTENFORF et al., 2004; SCULLY, 2005; CAVALHEIRO, 2008; ARAÚJO et al., 2011).

Em concordância com a literatura pesquisada, o carcinoma epidermoide de boca ocorre predominantemente em pacientes do sexo masculino, em torno de 60 anos, que apresentam o hábito do tabagismo e álcool (DEDEVITIS et al., 2004; COLOMBO; RAHAL, 2009), corroborando com a amostra estudada. Pontua-se o aparecimento dos carcinomas epidermoides em pacientes da terceira idade, mas a literatura apresenta uma diminuição média da faixa etária, em virtude ao aparecimento de vírus oncogênicos como o HPV e o Epstein-Barr (ANTUNES, AA; ANTUNES, AP, 2004; CARLI et al., 2009; COLOMBO; RAHAL, 2009).

O carcinoma de boca exhibe uma variabilidade no seu desenvolvimento, mas a literatura estabelece alguns parâmetros, como sendo a língua o local de maior agressividade, com maior dificuldade de tratamento, propensão de metastização em linfonodos cervicais (CARPENA et al., 2008; NEVILLE et al., 2009) com altas taxas de recorrência e produção de metástases (DANTAS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; ALVES et al., 2011).

Carvalho et al. (2001), Perussi et al. (2002), Oliveira et al. (2006) realizaram trabalhos em Campina Grande (PB), São Paulo (SP) e Ribeirão Preto (SP) respectivamente confirmam que o sítio mais acometido pelo carcinoma de boca é a língua, seguido de assoalho oral, com pior prognóstico e maior comprometimento linfonodal. Perussi et al. (2002) observaram ainda o predomínio da região jugal em pacientes idosos e lesões de língua nos jovens. Antunes e Antunes (2004), em Pernambuco, citaram lábios e língua como os sítios mais comuns, talvez pela região demográfica que o estado ocupa.

Nos 32 blocos reavaliados da amostra, com a realização de novas leituras das lâminas em HE e novos cortes corados na técnica da imunistoquímica, de carcinoma epidermoide de boca, selecionados segundo parâmetros dos critérios de inclusão, como: ausência de tratamentos de quimioterapias e radioterapias o que pode, pela terapêutica, alterar as células neoplásicas centrais e as células do *front* de invasão, quanto ao número, forma, ação.

Nossos resultados demonstraram uma distribuição dos pacientes, dos locais das lesões e variáveis clínicas como o gênero, idade, hábitos, sendo que o carcinoma epidermoide de língua destacou-se para o gênero masculino (10 casos), com influências do tabagismo (10 casos) e do etilismo (9 casos) em uma tendência positiva, porém, para o uso de próteses totais e parciais, apresentou uma correlação negativa (12 casos).

As neoplasias são constituídas de população de células heterogêneas, onde as células tumorais das áreas centrais diferem substancialmente das células do *front* de invasão (BRYNE et al., 1992; KUROKAWA et al., 2005). O *front* invasivo parece apresentar uma característica mais agressiva, fornecendo assim características de informações prognósticas associadas às metaloproteinases em estudo. Por conseguinte, elegemos estas duas áreas para serem estudadas, associando as gelatinases-2 e -9 pelo volume de estudos já apreciados.

Adotamos o sistema de gradação de Bryne (1998), com o estabelecimento da somatória dos escores de 1 a 4, para os parâmetros morfológicos da lesão, para classificá-las quanto ao grau de malignidade, de 4-8 (bom prognóstico) baixo grau de malignidade, de 9-12 (Prognóstico moderado) moderado grau de malignidade, de 13-16 (mau prognóstico) alto grau de malignidade.

Porém, por mais que se tente estabelecer escores matemáticos para a gradação de malignidade com um caráter objetivo, os casos devem ser vistos individualmente, pois apresentam um aspecto subjetivo muito forte nos achados, que podem muitas vezes, levar a resultados conflitantes.

Há correlação significativa entre a classificação TNM, a gradação histológica e os prognósticos, auxiliando no direcionamento da terapêutica segundo a literatura (ABREU et al., 2004). Há correlação entre os escores histológicos de malignidade e o prognóstico, pelo comportamento biológico da lesão (DANTAS et al., 2003), porém, não houve neste estudo, correlação entre o prognóstico dos casos e os graus de diferenciação.

Sistemas de gradação devem ser analisados como uma informação a mais no tratamento, não pode ser visto como parâmetro único para o tratamento das lesões, por mais que eles apontem a agressividade delas.

No entanto, neste presente trabalho, a gradação histomorfológica de malignidade foi significativa na classificação dos prognósticos obtidos.

A agressividade de uma neoplasia depende das ações que estas conferem à habilidade de modificar o ambiente celular, utilizando os eventos fisiológicos para migrar através de barreiras teciduais. Despertando assim, o interesse no estudo das metaloproteinases que são enzimas proteolíticas que mostram características invasivas. Estas gelatinases acarretam a degradação do colágeno IV podendo levar à dispersão celular, à vascularização e à progressão dos mais diversos tumores (VENTURI et al., 2004).

A proposição deste estudo foi avaliar a marcação das MMP-2 e MMP-9 em duas áreas destas neoplasias, as células neoplásicas centrais, no intuito de associá-las ou não à progressão tumoral e nas áreas de *front* de invasão, associando-as ou não a invasividade neoplásica. Nestas áreas eleitas ainda fez-se uma segunda análise: se estas gelatinases marcadas estavam mais presentes nos núcleos para se avaliar as atividades nucleares ou se marcavam mais no citoplasma, já em fase de dispersão destas proteinases.

Esleu-se a imunistoquímica, como método de investigação, pela facilidade da utilização dos tecidos emblocados em parafina, o que facilita a obtenção da amostra.

Alguns estudos têm confirmado a relação das gelatinases com a agressividade das lesões de carcinoma epidermoide de boca (VICENTE et al., 2005) o que permitiria que as metaloproteinases pudessem ser usadas como marcadores de prognósticos com fins terapêuticos, porém, outros trabalhos não confirmam estes resultados (FRANCHI et al., 2002; ROBINSON et al., 2003). Pelos resultados de marcação com as metaloproteinases-9 junto ao estudo realizado, confirma os estudos de Curran e Murray (2000) e Navarro et al. (2006), reforçando a ideia de que a MMP-9 possa ser usada como fator de prognóstico, tanto nas células centrais do tumor, que está diretamente relacionada à progressão da neoplasia, como nas áreas de evolução do *front* invasivo.

A amostra de 32 blocos foram marcados com um padrão de coloração variado, que se classificou em 4 escores para fins estatísticos sendo: 1- negativo, 2- fraco, 3- moderado, 4- intenso. Este padrão determinou um escore que foi tratado estatisticamente, relacionando ao grau de malignidade histomorfopatológica das áreas neoplásicas centrais e do *front* invasivo, correlacionando-as aos dados clínicos da amostra, aos prognósticos e ao grau de diferenciação.

As possíveis diferenças de resultados, em diferentes trabalhos podem se apresentar pelas diferenças metodológicas, diferentes critérios de avaliação, processamentos teciduais e manuseio dos anticorpos.

Polette et al. (2004) reforçaram a teoria do sinergismo entre as células tumorais e estromais, na produção das MMPs- 2 e -9 e na aceleração da invasividade tumoral (DECLERCK, 2000).

A coloração abundante para a MMP-9 reflete claramente a importância desta enzima para a invasão do tecido adjacente do tumor pela destruição dos elementos da MEC, especialmente o colágeno IV (VENTURI et al., 2004). Demonstra a relação quanto à invasividade por esta gelatinase e à agressividade dos tumores, a interação entre células do estroma e as células neoplásicas que atuam em sinergia com as enzimas tumoral, no qual as células neoplásicas induzem as células do estroma a produzir enzimas proteolíticas (HENRIQUE et al., 2012) que facilitaria a dispersão de células dos sítios primários. A invasividade aos tecidos e órgãos adjacentes e o desenvolvimento do tumor propriamente dito, por neoangiogênese e neovascularização, e as células do estroma estimulariam as células tumorais a aumentarem sua atividade produtiva destas endopeptidases.

Neste trabalho a expressão das MMP-9 foi significativamente maior que as MMPs-2, que teve uma marcação inexpressiva.

Vicent et al. (2005) detectaram associação significativa entre o grau histológico de malignidade de carcinomas epidermóides de boca e a expressão imunohistoquímica das MMP-9 e a pouca expressão para a MMP-2, fato confirmado pelo nosso experimento. Já Lin et al., em 2004, não encontraram relação significativa entre a imunomarcação para MMP-2 e MMP-9 e o grau de diferenciação celular, sendo que neste estudo houve uma notória marcação para carcinomas epidermóides classificados como moderadamente diferenciados. Para Abreu (2004) e Neville et al. (2009), os tumores menos diferenciados recebem os números mais altos nas classificações de gradação histomorfopatológica de malignidade, indicando um pior prognóstico.

Os trabalhos de Bryne et al. (1989) detectaram correlação significativa com os prognósticos e gradação histológica de malignidade. Estes dados não se confirmaram neste estudo. As lesões de alto grau de malignidade exibiram uma marcação intensa para as metaloproteinases pesquisadas, com destaque para as MMP-9.

Utilizando o coeficiente de Spermán analisamos o escore total de malignidade e ao contrário de Barros (2006), não tivemos relação direta de resultados da imunomarcação para MMP-9 e MMP-2, sendo que a correlação não foi significativa neste experimento.

Acreditamos que os dados obtidos neste estudo possam contribuir para o conhecimento sobre o carcinoma epidermoide de boca em relação direta às gelatinases MMP-2 e -9. É importante que novos estudos, seguindo metodologia semelhante, sejam

investigados, para a comparação de resultados, porque a ampliação do conhecimento quanto ao mecanismo de progressão e desenvolvimento desta neoplasia, no que diz respeito à ação das metaloproteinases. O uso das MMPs como marcadores de prognósticos e o conhecimento da conduta biológica das lesões definirão as diretrizes terapêuticas, com escolhas de procedimentos mais adequados que possam inibir o desenvolvimento das lesões e de suas recorrências.

Conhecer o comportamento biológico das lesões é essencial para a adoção das medidas terapêuticas mais indicadas para cada caso, evitando terapias mais rigorosas que o quadro necessita escolhas de procedimentos inadequados que venham a trazer mais riscos de lesões recorrentes, aumentando a probabilidades de metástases.

Dessa forma o cuidado na busca de indicadores mais fidedignos para prognósticos, que junto com o estadiamento clínico do câncer, pelo sistema TNM, possa fornecer uma taxa assertiva maior nas medidas terapêuticas (COSTA et al., 2002).

Os estudos das MMPs-2 e -9 têm influência direta no desenvolvimento e conduta do câncer bucal, indicada pela intensidade do padrão de reatividade das MMPs, exibidos pelas neoplasias. Estas endopeptidases são elementos-chave na degradação da MEC e apresentam profundo envolvimento com a invasão tumoral e metástases, funcionando como indicadores de marcadores para pacientes portadores de carcinomas, principalmente os epidermoides.

Foi analisado o padrão de expressão das metaloproteinases em carcinomas epidermoides de boca, considerando a gradação histológica de malignidade, estabelecida pelo sistema proposto por Bryne (1998), que visou obter informações a respeito do potencial de invasão da neoplasia estudada, que possam contribuir para o melhor entendimento da sua conduta biológica, o que poderá vir a favorecer o entendimento e a eleição de medidas terapêuticas mais eficazes no controle, na busca incessante da cura, de respostas imediatas para esta enfermidade, que tem sido um problema para toda a classe científica e para toda a sociedade.

As MMPs individuais mostraram-se altamente expressivas em muitos tipos de tumor. Informações precisas sobre estas proteínas podem levar ao desenvolvimento de fármacos dirigidos, específicos a estas gelatinases. O controle das atividades das MMPs é um alvo promissor para as terapias das doenças (MORGUNOVA, 1999), sendo que elas trabalham como sinalizadores para as indústrias farmacêuticas que buscam o desenvolvimento de inibidores de MMPs sob vários focos, como a angiogênese, barrando a proliferação, a nutrição dos tumores e proporcionar marcadores que possam fornecer informações quanto ao desempenho biológico da lesão, em doses biologicamente ativas, o que vai exigir métodos

sensíveis, não tóxicos e não invasivos para monitorar os efeitos destas proteases sintéticas em atividade *in vivo* (DECLERCK et al., 2004). Informações precisas sobre quais e como as MMPs atuam e em quais tumores influenciam, possibilitará o desenvolvimento de fármacos específicos para estas MMPs, no combate ao câncer e suas metástases.

Diante da literatura, verificam-se as influências na MEC em várias funções celulares durante a carcinogênese, estando diretamente relacionada ao desenvolvimento dos carcinomas epidermóides e merecem uma atenção especial desses estudos quanto aos seus aspectos biológicos.

O conhecimento na identificação e quantificação da expressão das metaloproteinases permitirá sua utilização como marcador de prognóstico com maior sensibilidade e especificidades aumentando a precisão e precocidade nos diagnósticos ou eventuais lesões pré-invasivas o que favorecerá a eficiência do tratamento e o desenvolvimento de drogas dirigidas para MMPs específicas ou componentes inibidores para estas enzimas.

Acreditamos que os dados obtidos nesta pesquisa possa contribuir com conhecimento da relação dos carcinomas epidermóides de boca e as metaloproteinases, em especial as -2 e -9, com ampliação do desenvolvimento de estratégias farmacológicas como inibidores e drogas dirigidas mais eficientes com assertiva mais significante.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos por meio da técnica de imunistoquímica para verificar a expressão das metaloproteinases-2 e-9 em carcinomas epidermóides de boca, podemos concluir que:

- A imunomarcção da MMP-9 é mais significativa que a MMP-2 em núcleos de células neoplásicas centrais e núcleos do *front* invasivo de carcinoma epidermoide de boca. Há uma marcação expressiva no escore total de células neoplásicas centrais para a MMP-9, indicando um envolvimento nuclear intenso e atividade significativa desta metaloproteinase no desenvolvimento destas células neoplásicas centrais.

- No *front* de invasão a expressão das MMP-9 nos núcleos, corrobora a idéia de participação fundamental desta gelatinase, no processo de degradação das barreiras físicas, invasividade e metastização dos carcinomas epidermóides de boca. A marcação do citoplasma foi mais significativa para as MMP-9 do que para as MMP-2.

- Não há correlação entre as expressões das MMP-2 e -9, com as características clínicas da amostra, quanto á idade, gênero, hábitos (tabagismo, etilismo), uso de prótese e enfartamento ganglionar. Na amostra não há correlação entre o local da lesão e as características clínicas da amostra, porém, confirma a literatura a tendência de carcinomas epidermóides de boca, na língua, para homens com mais de 60 anos, que apresentam o hábito do tabagismo, etilismo e uma tendência negativa para o uso de prótese.

- Neste estudo não há correlação entre a imunomarcção das MMP-2 e -9 com os escores de malignidade obtidos pela somatória na classificação de Bryne, 1998. Quanto ao grau de diferenciação e marcação das MMP-2 e 9, há uma indicação significativa da marcação da MMP-9 em carcinomas epidermóides de boca classificados de moderadamente diferenciados, expressão está associada ao curso evolutivo (alta atividade), de caráter agressivo desta lesão.

- Este experimento não apresenta correlação das expressões destas gelatinase, MMP-2 e -9 com os prognósticos.

REFERÊNCIAS

Abreu MAMM, Pimentel DRN, Silva OMP, Blach IT, Michalany NS, Weckx LLM Chhirata, Alchorne MMA. Carcinoma espinocelular de lábio: avaliação dos fatores prognósticos. São Paulo. Rev Bras Otorrinol. 2004; 70(60): 766-2.

Agra IMG. Recidiva local de carcinoma epidermoide de boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos à cirurgia de resgate. São Paulo. Radiol Bras [online]. 2007; 40(5): 354-64.

Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia Molecular da Célula. 3 ed. Porto Alegre. Artes Médicas. 1997.

Albini AJH, Melchiori A, Santi L, Liotta AL, Brow PD, Stetler-Stevenson WG. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. J. Natl. Cancer Inst. 2001; 83(11): 775-9.

AL-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A, Al-Amro A. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. Oral Oncol. 2000; 36(2): 508-14.

Alves V, De Mello E. Manual de Imunoistoquímica. Marcadores de proliferação celular. Socied Bras Patol. 1999:182-4.

Alves MTS, Roman LCM. Estudo do efeito de distintos períodos de fixação em formalina e métodos de recuperação antigênica na técnica de imunoistoquímica. J Bras Patol Med Lab. 2005; 41(1): 43-9.

Alves CCM, Netto FOG, Sousa SF, Bernardes VF, Aguiar MCF. Carcinoma de Células Escamosa da Boca: Relação entre Graduação Histopatológica e Características Clínicas da Neoplasia. João Pessoa. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2011; 11(4): 485-9.

Amaral BA, Nonaka CFW, Freitas RA, Souza RA, Pinto LS. MicroRNAs - Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. Odontol Clin Cient. 2010; 9(2): 106-9.

Amorim AG, Amorim RFB, Freitas RA. Estudo epidemiológico do carcinoma epidermoide oral: análise de 85 casos. Recife. *Odontol Clin Cient*. 2002; 1(1): 41-5.

Amorim Filho FS, Andrade Sobrinho J, Carvalho MB, Novo NF, Juliano Y. Estudo de variáveis demográficas, ocupacionais e co-carcinogênicas no carcinoma espinocelular da base de línguas nas mulheres. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69(4): 472-8.

Antunes AA, Antunes AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. *Rev Bras Cancerol*. 2004; 50(4): 295-300.

Araújo RVS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. Metaloproteínas: aspectos fitopatológicos e sua importância na cicatrização. Salvador. *Rev Clin Med Biol*. 2011; 10 (1): 82-8.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002; 115: 3710-27.

Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. *Brit J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 44: 482-6.

Barra MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Rev AMRIGS*. 2006; 50(2): 173-84.

Barros SSLV. Expressão imuno-histoquímica de metaloproteínas em carcinoma epidermoide de lábio inferior e língua [tese]. Natal: Pós-graduação em Patologia Oral. 2006.

Batista AB, Ferreira FM, Ignácio SA, Machado MAN, Lima AAS. Efeito do tabagismo na mucosa bucal de indivíduos jovens: análise citomorfométrica. *Rev Bras Cancerol*. 2008; 54(1): 5-10.

*Estilo Vancouver apresentado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, publicadas inicialmente em 1979.

- Bettendorf O, Piffkos J, Bãnkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.* 2004; 40: 110-9.
- Bikerdal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Bikerdal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Role of matrix metalloproteinase human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993; 64(2): 474-84.
- Björklung M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cell. *Bioch. Biophys. Acta.* 2005; 1755: 37-69.
- Bornestein P, Sage EH. Matricellular proteins extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14: 608-16.
- Brasileiro Filho, GB. *Patologia Geral.* 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.
- Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Cancerol.* 2007; 53(1): 63-9.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional universality. *Bioch. Biophys. Acta (BBA) Mol Cell Res.* 2010; 180(1): 55-71.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18(8): 432-7.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleg R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive regions of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Oral Pathol Med.* 1992; 166(4): 375-81.
- Bryne M. Is the invasive *front* of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Disease.* 1998; 4(2): 70-7.

Carli ML, Santos SL, Pereira AAC, Hanemann JAC. Características clínicas, epidemiológicas e microscópicas do câncer bucal diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. *Rev Bras Cancerol.* 2009; 55(3): 205-11.

Carpina ABP; Francisco AAM, Bonamigo R.R. As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise de literatura. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2008; 36(6): 285-90.

Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Santana Filho M. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. *Rev Bras Cancerol.* 2008; 54(1): 49-56.

Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN, Fava AS. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermoide de cavidade oral do sexo feminino. *Rev Assoc Med.* 2001; 74(1): 68-73.

Carvalho SHG, Soares MSM, Figueredo RLQ. Levantamento epidemiológico dos casos de câncer de boca em um hospital de referência em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2012; 12(1): 47-51.

Cavalheiro BG, Junqueira CR, Brandão LG. Expressão das metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) e tecido inibidor de metaloproteinase 2 (TIMP-2), em carcinoma medular da tireóide: implicações prognósticos. *Rev Cien Med Biol.* 2008; 18(8): 865-71.

Cimardi ACBS, Fernandes APS. Câncer bucal – a prática e a realidade clínica dos cirurgiões-dentistas de Santa Catarina. *RFO.* 2009; 14(2): 99-104.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol.* 2009; 5(2): 165-74.

Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Inter J Mol Med.* 2009; 24(2): 143-52.

Costa ALL, Pereira JC, Nunes AAF, Arruda MLS. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica do carcinoma epidermoide oral. *Pesq Odont Bras.* 2002; 16(3): 216-20.

Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP, Colleta RD. Carcinoma espinocelular e suas variantes. *BCL.* 2002; 8(32): 313-9.

Curran S, Murray GI. Metaloproteinases de matriz: aspectos moleculares e seus papeis na invasão tumoral e metástases. *Eur J Canc.* 2000; 36(13): 1621-30.

Daniel FI, Granato R, Grando LJ, Fabro SML. Carcinoma de células escamosas em rebordo alveolar inferior: diagnóstico e tratamento odontológico de suporte. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(4): 279-83.

Dantas DDL, Ramos CCF, Costa ALL, Souza LB, Pinto LP. Clinical-Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. *Braz Dent J.* 2003; 14(1): 22-5.

De Clerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer.* 2000; 36(10): 1258-68.

Declerck YA, Mercurio AM, SM Stank, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix and cancers – a workshop of the path B study section. *Am J Pathol.* 2004; 164(4): 1131-9.

Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma epidermoide de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004; 70(1): 35-40.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix Metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25(1): 9-34.

- Doi RK, Valarini N, Barata TDJE, Benetti AR. O papel das metaloproteinasas no desenvolvimento de lesões cariosas. *Odontol Clin Cient. Recife*. 2011. Suplemento 1, 473-5.
- Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA, Ichik AT. Characterization of oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65 (9): 1725-33.
- Felin IPD, Grivicich I, Felin CR, Fredrigo CA, Rocha AB. Expressão imuno-histoquímica das metaloproteinasas -2 e -9 não está associada à progressão do carcinoma de células escamosas de esôfago. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(4): 317-23.
- Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: From new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 411-24.
- Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in carcinoma of head and neck. *Câncer*. 2002; 95(9): 1902-10.
- Freitas VS, Santos PPA, Freitas RA, Pinto LP, Souza LB. Oral Surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontology. *Oral Maxillofac Pathol*. 2011; 112(3): 112-7.
- Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Modern Pathology* 2004;17: 496-502.
- Gassen HT, Silva SO, Moraes SG. Carcinoma epidermoide da cavidade bucal. *Rev Med HSPV*. 2005; 17(36): 35-8.
- Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases- 2, -8 and -9 by chlorhexidine. *Clin Immunol*. 1999; 6:43.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos N K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS J*. 2011; 278(1): 16–27.

Goldstein NS, Ferkowicz M, Path A, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *AMJ Clin Pathol.* 2003; 120(1): 86-92.

Gonzales-Moles MA, Esteban F, Rodrigues-Archilla A, Ruiz-Avila I, Gonzales-Moles S. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol.* 2002; 38 (4): 394-7.

Gross J, Lampière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci.* 1965; 48(6): 1014-22.

Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Santos JET. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Rev Bras Hipertens.* 2010; 17(4): 226-30.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(1): 1-13.

Henriques ACG, Matos FR, Galvão HC, Freitas RA. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Sci.* 2012; 54(1): 105-11.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativas de incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro. INCA. 2012-2013. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012-2013>. Acessado em 10 de Março de 2013.

Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Review Article Matrix Metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003; 12: 109-25.

Kubota Y. Interleukin-1 α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic Jaw Cysts. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1423-30.

Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases. (Timp) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(2): 114-20.

Line SRP, Lopes MA, Zaia AA, Jorge Júnior J. As alterações gênicas e o desenvolvimento do câncer bucal. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1995; 49(1): 51-6.

Lin SC, Lo SS, Liu CJ, Chung MY, Huang JW, Chang KW. Functional genotype in matrix metalloproteinases promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33: 405-9.

Lobão WJ de M, Brandão CMM, Marinho PO, Lopes FF. Carcinogênese biológica do câncer oral. *Rev Cienc Saúde.* 2011; 13(1): 59-64.

Lopes AA, Oliveira AM, Prado CBC. Principais genes que participam da formação de tumores. *Rev Biol Cien da Terra.* 2002; 2(2): 138-42.

Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. *Rev Bras Cancerol.* 2007; 53(3): 325-33.

Lynch CC, Matrisian L. M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Rev. Differentiation.* 2002;70(9-10): 561-73.

Lung TOC, Tascau HA, Almasan O. Head and neck câncer: tratament, evolution and post. therapeutic survival-part 2: A decade's results 1993-2002. *J Cranio-Maxill Surg.* 2007; 35: 126-31.

Medeiros NI, Gomes JAS, Fares RCG. Detecção e quantificação da atividade enzimática das metaloproteinases e seus inibidores, através da técnica de zimografia. Pós em revista do Centro Universitário Newton Paiva. 2012.

Montoro JRMC, Hicz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, Mamede RCM. Fatores prognósticos carcinoma espinocelular de cavidade oral. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008; 74(6): 861-6.

Morgunova E, Tuuttila A, Ulrich Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *www.sciencemag.org Science*. 1999; 284(4): 23-5. Acesso em 13 de julho de 2013.

Mott JD; Werb Z. Regulation of matrix biology, matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16(5): 558-64.

Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler- Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF- induced human microvascular endotelial cell proliferation. *J Cell Physiol*. 1993; 157(2): 351-8.

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008; 29(5): 290-308.

Nabeshima K. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Internac*. 2004;52: 225-64.

Navarro VP, Nelson Filho P, Silva LAB, Freitas AC. The Participation of matrix metalloproteinases in the physiopathological - processes of the oral cavity. *Rev Odontol UNESP*. 2006; 35(4): 233-3.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Jerr EB. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

O'charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol*. 2003; 39(4): 386-90.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide em uma população brasileira. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(5): 385-96.

Organização Mundial de Saúde (OMS). CID-10/OMS. 5.ed. São Paulo: Centro colaborador da OMS, 1997. V.L.P. 181-7.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Manual for staging of câncer american joint commiktte e cancer. 1988: 27-32.

Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognostic factores in betel and tabacco related oral cancer. *Oral Oncol.* 2002; 38: 491-9.

Parise Júnior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000; 256p.

Parizi ACG, Parizi JLS, Barbosa RL, Nai GA. Comparação entre a concentração de mastócitos em carcinomas espinocelulares da pele e da cavidade oral. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(6): 811-8.

Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Petel OS. Activation of MMP2 amd MMP9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2005; 90: 81-88.

Pereira LAA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(1): 81-6.

Pereira AC, Carmo ED, Silveira VAS, Amadei SU, Rosa LEB. O papel das MMPs-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermoide. *Rev Bras Cancerol.* 2006; 52(3): 257-62.

Perusssi MR, Denardin OVP, Fava AS, Rapoport A. Carcinoma epidermoide de boca em idosos de São Paulo. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(4).

Pinheiro JJV. Estudo imunistoquímico e zimografia das metaloproteínas da matriz-2 e -9 no ameloblastoma/imnohistoquímica and zimografic study of matrix metalloproteinase -1 e -2 and -9 in ameloblastoma (tese doutorado). São Paulo. Faculdade de Odontologia da USP, 2002.

Pinho MSL. Imunoistoquímica: O estudo da biologia molecular ao alcance de todos. Rev Bras Coloproct. 2005; 25(2).

Polette M, Raby B, Gilles C, Chavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Eur J Câncer. 2004; 49:179-86.

Preparando AJH, Thorpe SJ, Miller K, Mangan M, Varley PG, Dudgeon T, Ward G, Turner C, Thorpe R. Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinase, matrilysin and stromelysin. Immun Lett. 2002;81(1): 41-8.

Ramalho LMP, Goes CF, Castro CRS, Aquino FC. Câncer de boca: papel dos genes reguladores da apoptose. Rev Odonto Ciência. 2002; 17(35): 90-5.

Reis ST. Análise de miRNAs envolvidos na regulação da MMP2 e MMP9 e seus reguladores e a implicação desta regulação no processo de invasão e migração celular do adenocarcinoma da próstata. FAPESP. 2013.

Ribeiro RIMA, Borges Júnior PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD, Loyola AM. Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. J Bras Patol Med Lab. 2008; 44(2): 115-21.

Robinson CM, Pedra AM, Shields JD, Huntley S, Paterson IC, Prime SS. Functional significance of MMP-2 and MMP-9 expression by human malignant oral keratinocyte cell line. Arch Oral Biol. 2003; 48:779-86.

Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. Clin Câncer Res. 2003; 9: 551-4.

Salles MA, Cúrcio VS, Perez AA, Gomes DS, Gobbi H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores de prognósticos e preditivos o câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(3): 213-22.

Santos MCLG, Souza AP, Gerlach RF, Trivelatto PC, Scarel-Caminaga RM, Line SRP. Inhibition of human pupal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxid cements. *J Oral Rehabil.* 2004; 31: 600-4.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma: from a Hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.* 2002; 38(3): 227-34.

Scully C. Epithelial biology. *Oral Diseases.* 2005; 11: 58-71.

Shott, S. *Statistics for health professionals.* London: W.B. Saunders Company. 1990.

Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. *J Bras Pathol Med Lab.* 2007;43(3): 203-9.

Soames JV, Southam JC. *Patologia Oral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mat.* 2000;16(2): 103-8.

Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2002;10(1): 1-6.

Souza Júnior AS. Etiopatogenia do câncer bucal: fatores de risco e de proteção. *Sábios. Rev Saúde e Biol.* 2006;1(2): 48-58.

Sun J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for their inflammatory response in cancer cells. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;43(3): 203-9.

Teixeira AKM, Almeida MEL, Holanda ME, Sousa FB, Almeida PC. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Rev Bras Cancerol.* 2009;55(3): 229-6.

Venturi BRM, Pamplona ACF, Cardoso AS. Carcinomas de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(5): 679-86.

Vicent JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41: 283-3.

Westermarck J, Kaähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB J.* 1999; 13:781-91(review) *Oncol Rep.* 2002;9: 607-11.

Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsuno K, Kusano M, Arimura Y, Takao E, Hinoda Y, Hosokawa M, Imai K. Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59: 3313-6.

Yamamoto H, Viniteketkumn A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirat T, Miyamoto N, Nosho K, Imsumran A, Fijita M, Hosokawa M, Hinoda Y, Imai K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2004;25(12): 2353-60.

Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M. Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication (Review). *Relatórios de Oncologia.* 2002. Spandidos- Publications.com.

Zucker S, Cao J and Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer Treatment. *Oncogene.* 2000; 19: 6642-50.

Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, Foda HD, Tompkins DC and Toole BT. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol.* 2001; 158(6).

ANEXO 1

Dados originais de variáveis clínicas (prontuários) da Amostra/Lesão de 32 blocos de carcinomas epidermoide de boca. Lab. de Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

Nº CASO	LOCAL*	GÊNERO	IDADE	TABAGISTA	ETILISTA	USO de PRÓTESE	ENFARTAMENTO GANGLIONAR
01	As	M	58	Sim	Não	Não	Sim
02	Li	M	59	Sim	Sim	Não	Não
03	Li	M	48	Sim	Não	Não	Sim
04	MJ	M	48	Sim	Não	Não	Sim
05	La	M	62	Sim	Sim	Não	Não
06	Li	F	58	Não	Não	Sim	Não
07	Li	M	50	Sim	Não	Não	Não
08	La	M	63	Não	Não	Não	Não
09	La	F	68	Não	Não	Não	Não
10	Li	F	50	Sim	Não	Sim	Não
11	Li	M	50	Sim	Sim	Não	Sim
12	P	F	47	Sim	Não	Não	Não
13	As	M	60	Sim	Sim	Sim	Sim
14	Li	M	50	Sim	Sim	Não	Não
15	Li	M	60	Sim	Sim	Não	Não
16	G	M	45	Sim	Não	Não	Não
17	Li	M	58	Sim	Sim	Não	Sim
18	La	M	53	Sim	Sim	Não	Sim
19	La	M	91	Sim	Sim	Sim	Não
20	Li	M	41	Sim	Sim	Não	Não
21	MJ	F	85	Sim	Sim	Sim	Não
22	As	M	57	Sim	Não	Não	Sim
23	MJ	F	64	Sim	Sim	Sim	Sim
24	Li	M	50	Não	Não	Não	Não
25	P	M	44	Sim	Sim	Não	Sim
26	As	F	87	Sim	Sim	Sim	Não
27	La	M	40	Não	Não	Não	Não
28	La	M	50	Não	Não	Não	Não
29	Li	M	62	Sim	Sim	Não	Sim
30	P	M	64	Sim	Sim	Não	Sim
31	Li	F	45	Não	Sim	Não	Não
32	Li	F	47	Não	Não	Não	Sim

*As: Assoalho de boca; G: Gengiva; La: Lábio; Li: Língua; MJ: Mucosa Jugal; P: Palato; F: Feminino; M: Masculino. **Fonte:** Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faodo/UFMS.

ANEXO 2

Numeração dos blocos utilizados no presente estudo.

Nº Caso	Prontuário – Faodo/UFMS	Nº Caso	Prontuário – Faodo/UFMS
1	48/04	17	131/09
2	128/04	18	140/09
3	38/05	19	11/10
4	135/05	20	14/10
5	174/05	21	24/10
6	267/05	22	61/11
7	02/06	23	68/11
8	35/06	24	116/11
9	37/06	25	117/11
10	178/06	26	129/11
11	194/06	27	132/11
12	242/07	28	141/11
13	24/08	29	30/12
14	95/08	30	57/12
15	119/08	31	21/13
16	39/09	32	33/13

ANEXO 3

Gradação de malignidade dos casos da amostra.

CASO	CERATINIZAÇÃO	PLEOMORF CELULAR	PADRÃO DE INVASÃO	INFILTRADO	TOTAL/ ESCORES
1	4	4	3	3	14
2	3	4	2	2	11
3	2	3	2	1	10
4	2	3	2	1	10
5	3	4	4	3	14
6	2	1	2	1	6
7	3	3	3	3	12
8	3	3	2	1	9
9	3	3	2	2	10
10	3	3	3	2	11
11	3	3	3	2	11
12	2	3	2	2	8
13	4	4	3	3	14
14	3	4	3	2	12
15	3	3	2	3	11
16	3	3	3	2	11
17	4	1	2	3	10
18	3	2	4	2	11
19	3	1	2	2	8
20	4	1	3	1	9
21	4	2	3	1	10
22	1	3	3	1	8
23	4	3	2	2	11
24	3	3	3	2	11
25	4	2	3	2	11
26	3	2	2	2	9
27	4	2	1	2	9
28	3	2	3	2	10
29	3	2	2	2	9
30	1	2	1	2	6
31	2	3	2	1	8
32	4	1	3	1	9

ANEXO 4

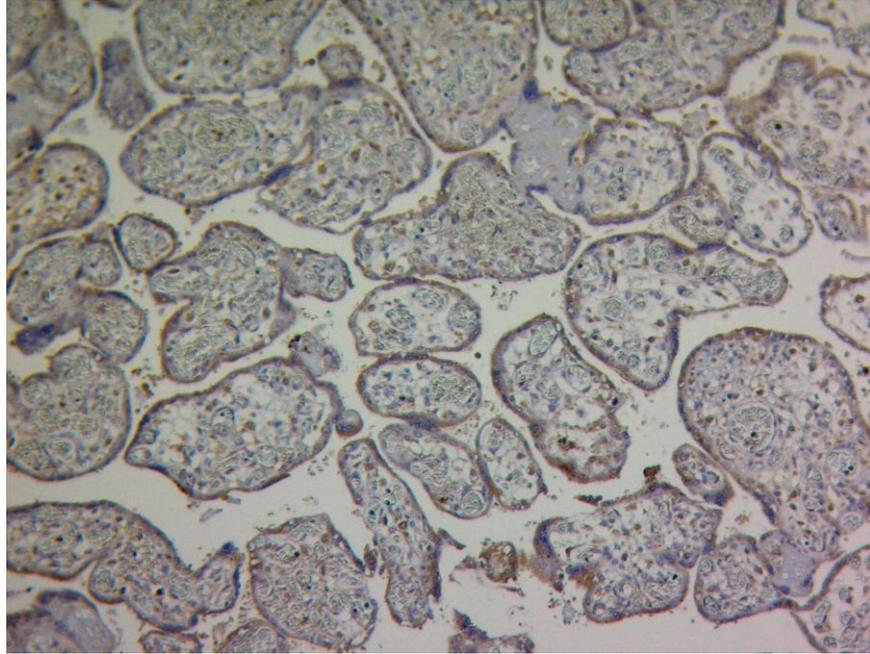


Figura 3 - Placenta – Controle positivo - Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 100X.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

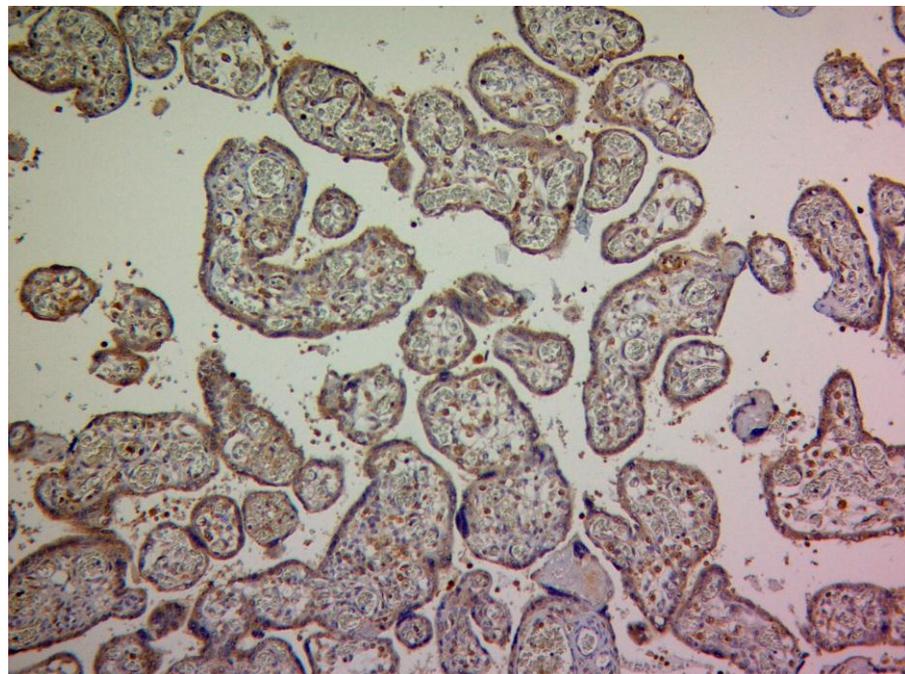


Figura 4 - Placenta - controle positivo para MMP-9. Expressão Imunoistoquímica em aumento de 100X. Notar reação positiva (cor marron) principalmente nas membranas basais.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

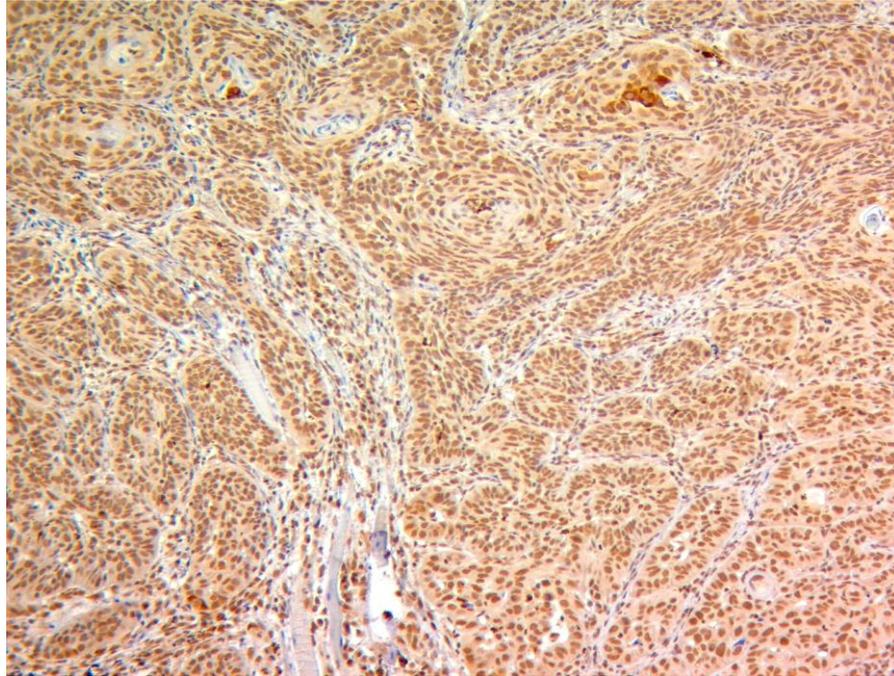


Figura 5 - Câncer de mama - controle positivo para MMP-9. Expressão Imunoistoquímica intensa (cor marrom) em núcleos e citoplasmas. Aumento de 100X.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

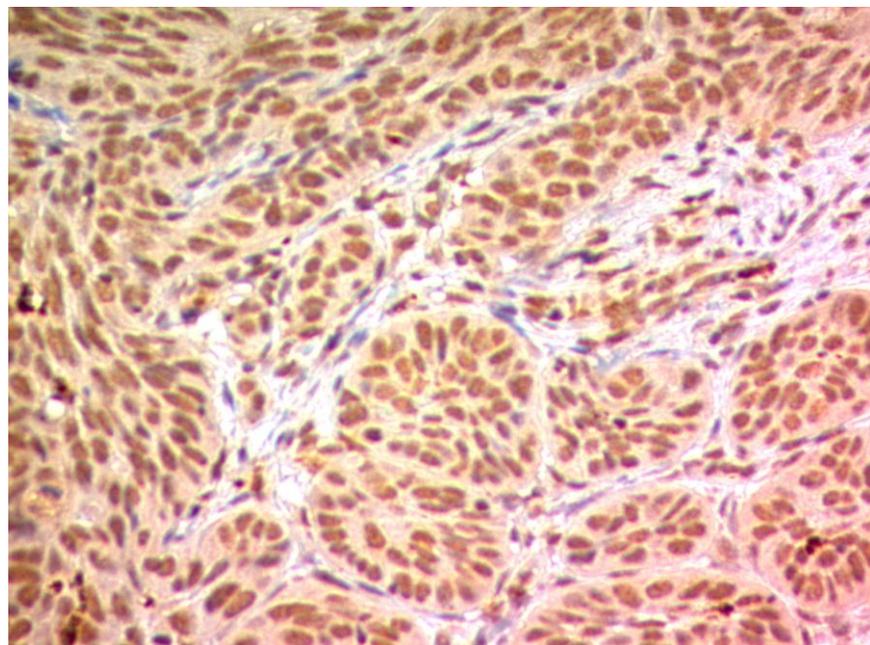


Figura 6 - Câncer de mama-controle positivo para MMP-9. Expressão imunoistoquímica intensa (cor marrom) para núcleos e citoplasmas. Aumento de 400X.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS

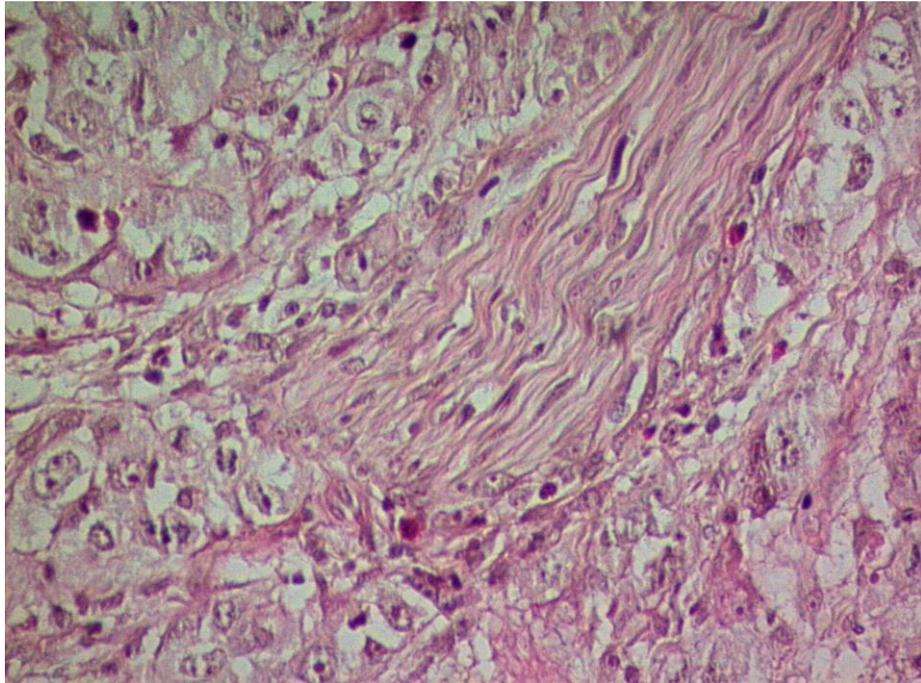


Figura 7 - CAE corado em HE. Aumento de 400X. (48/04)
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

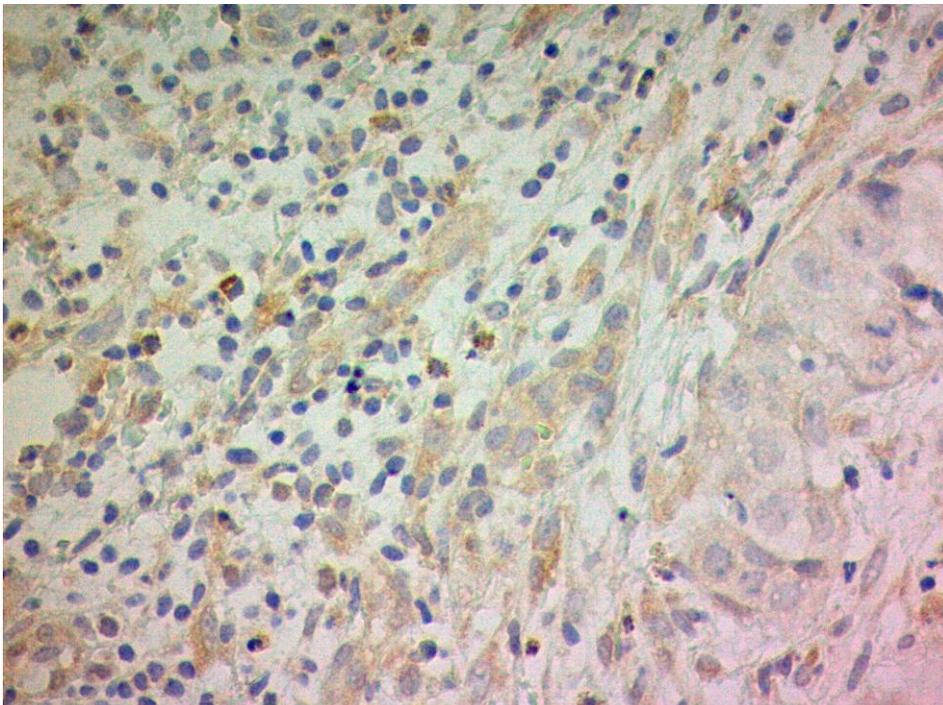


Figura 8 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 400X. Expressão fraca. (48-4). Pigmentos marrons dispersos na MEC.
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

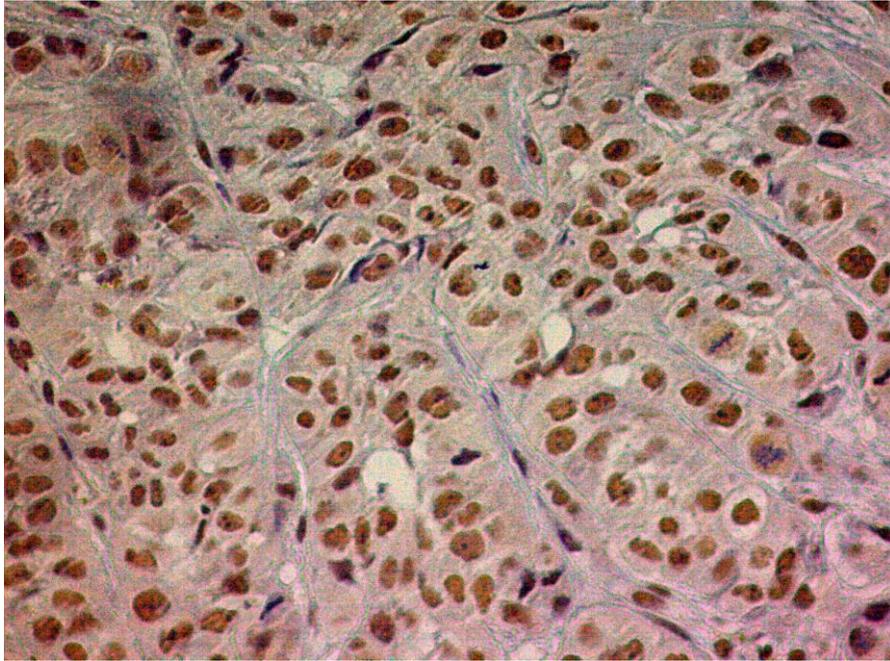


Figura 9 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento de 400X. Expressão intensa. (48/04). Notar intensa pigmentação celular (núcleos e citoplasmas) Células neoplásicas centrais
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

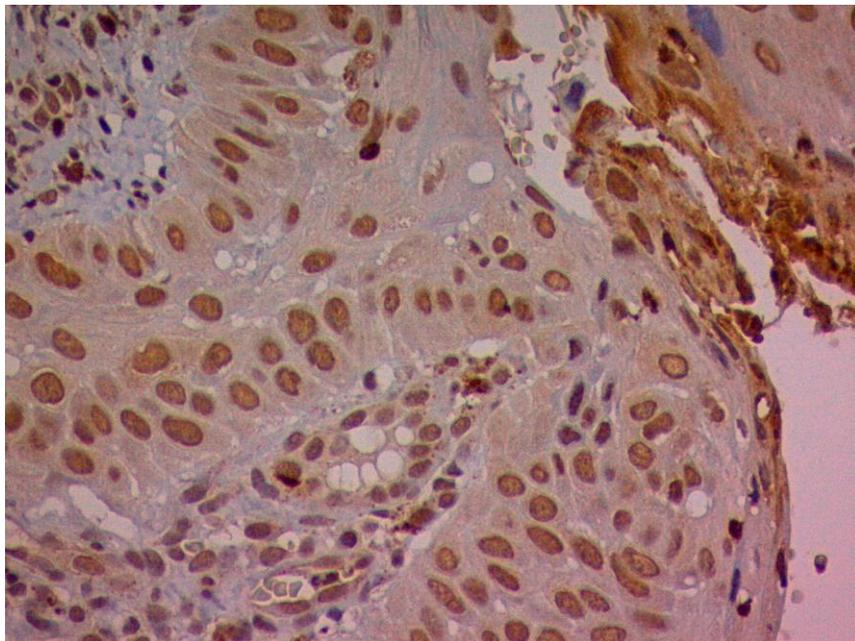


Figura 10 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento de 400X. Expressão intensa. (48/04). Pigmentos marrom de núcleos e citoplasmas (Campo2). *Front* de invasão
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

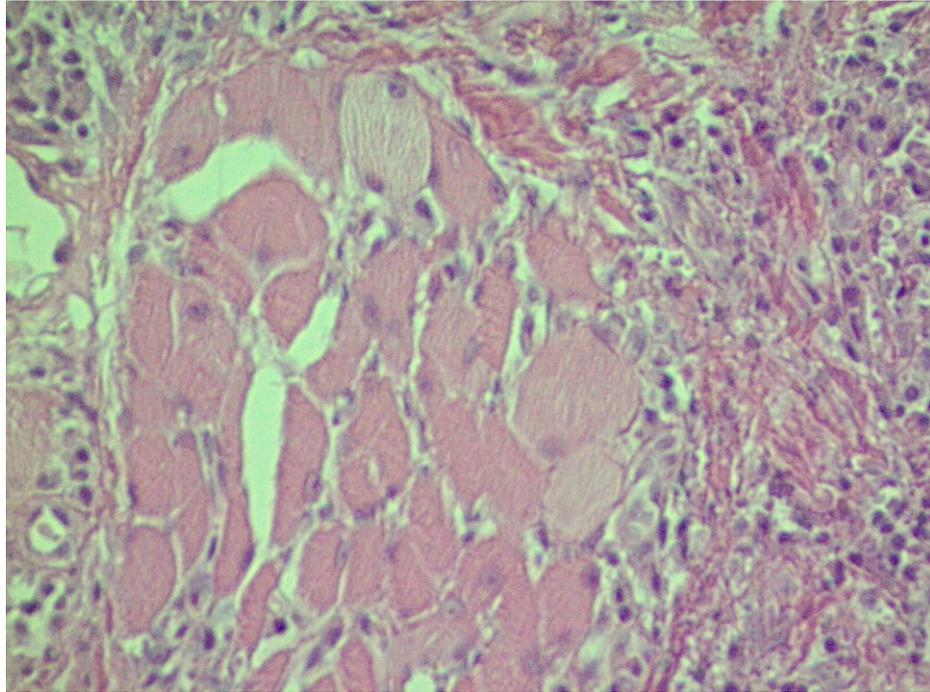


Figura 11 - CAE corado em HE. Aumento de 400X. (35/6).
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

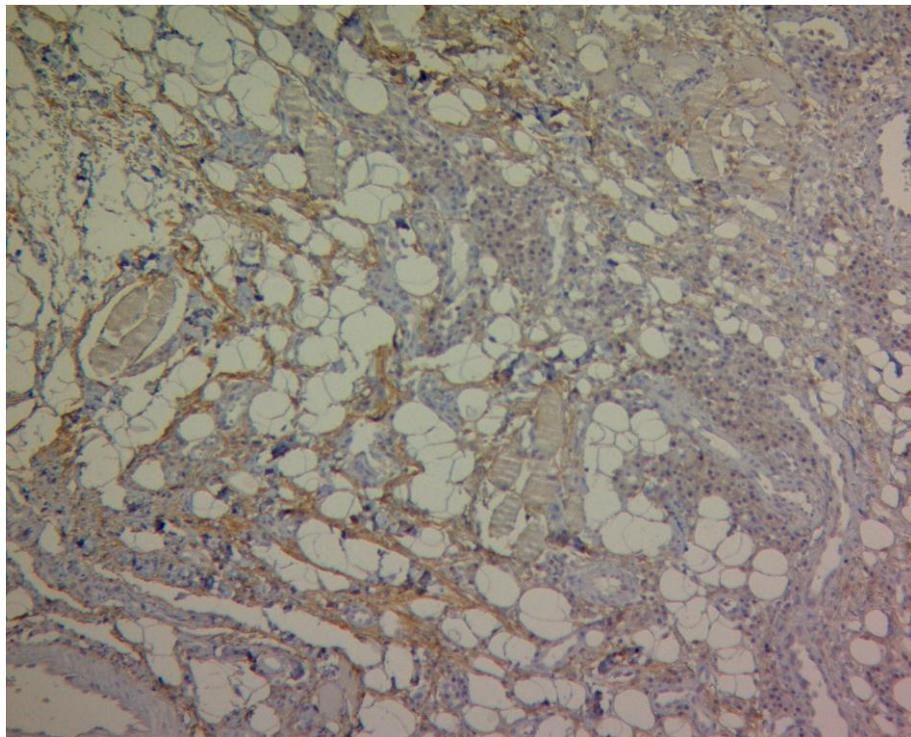


Figura 12- CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 100X. Expressão fraca. (35/6).
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

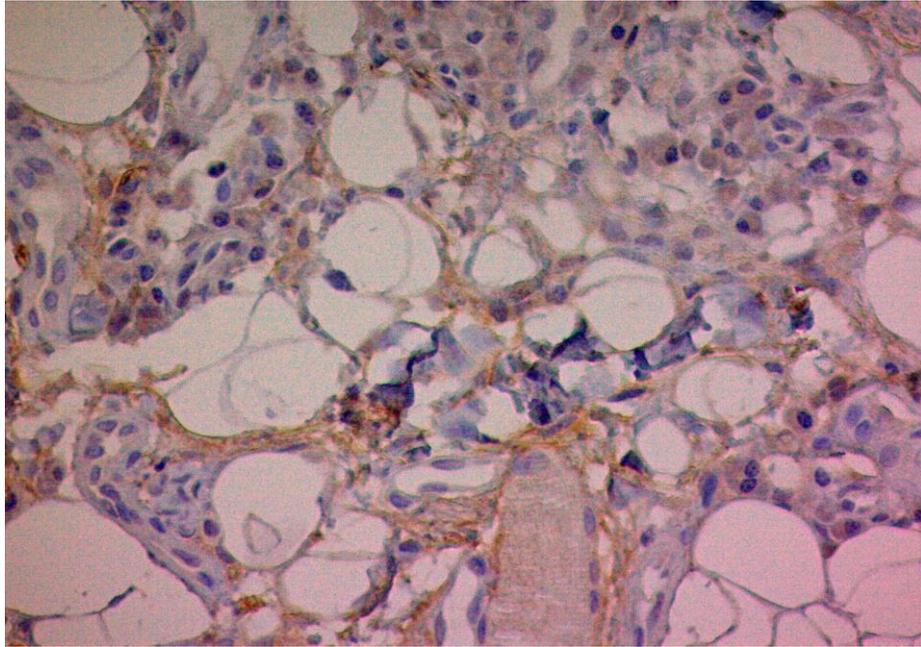


Figura 13 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 400X. Expressão fraca. (35/6)
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

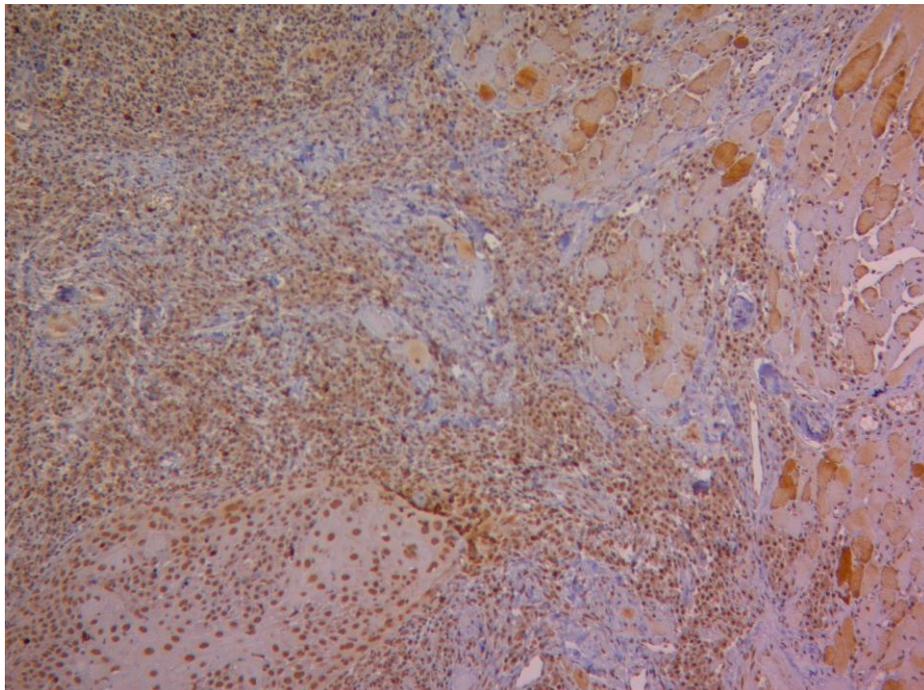


Figura 14 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento de 100X. Expressão Moderada. (35/6)
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

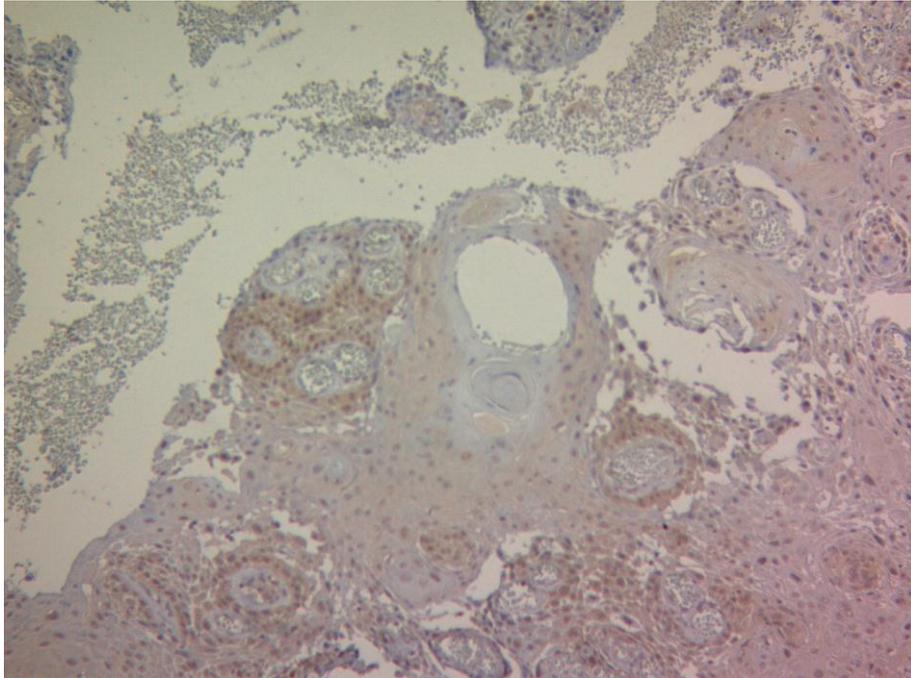


Figura 15 - CAE. Expressão imunoistoquímica para MMP-9 em aumento de 400X. Expressão Moderada.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

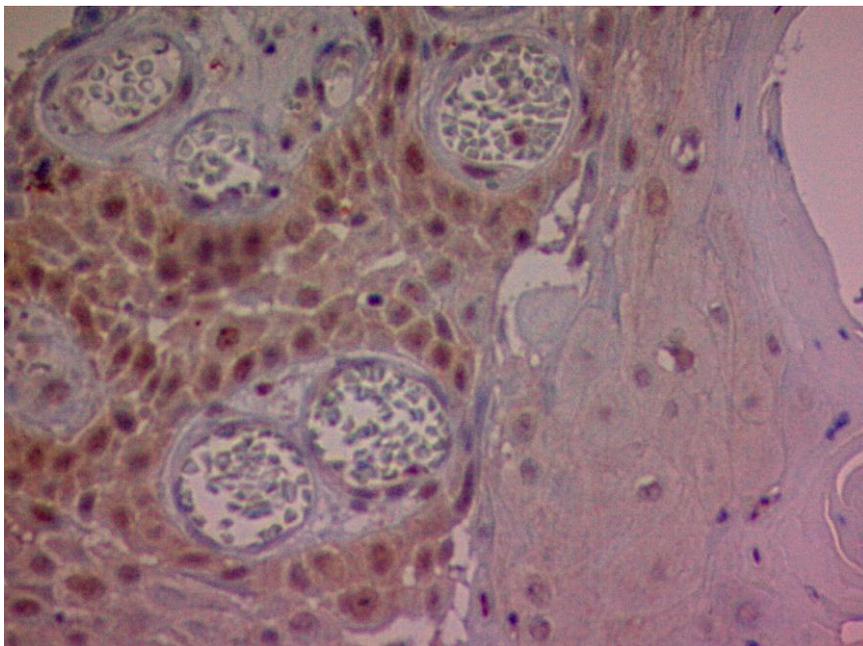


Figura 16 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 100X. Expressão fraca. (194/6).

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

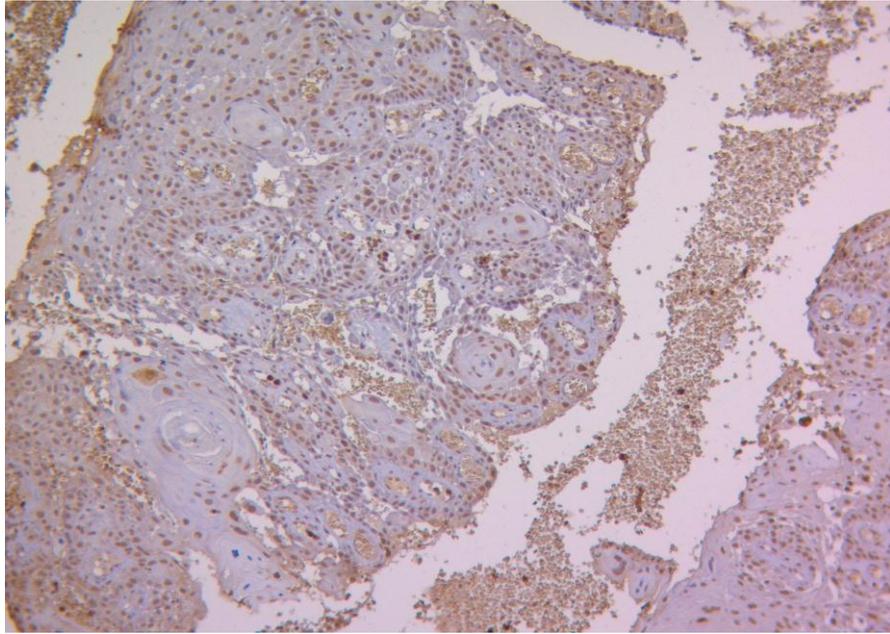


Figura 17-CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-2 em aumento de 400X. Expressão fraca. (194/6). Notar a intensidade da marcação (coloração mais leve).

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

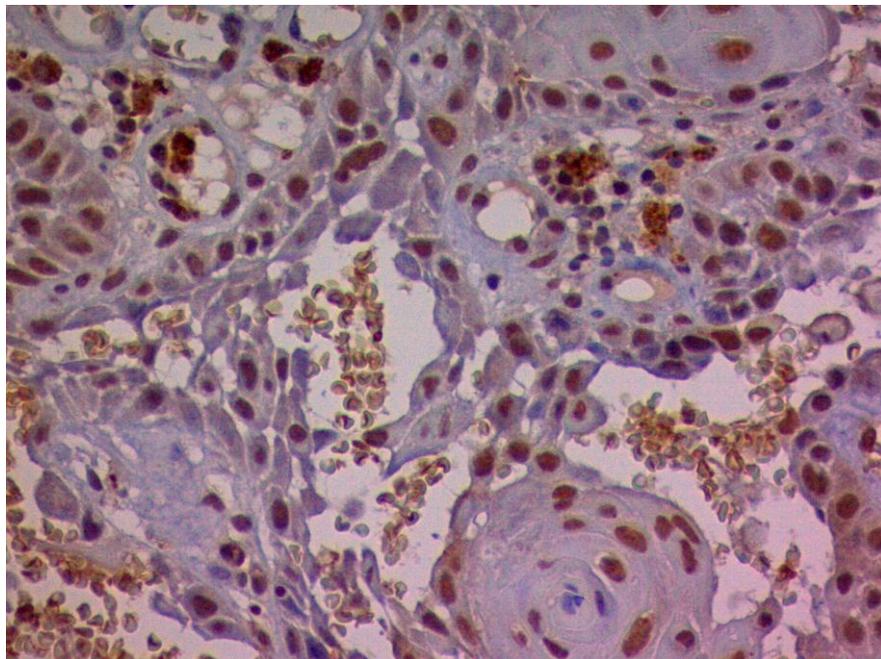


Figura 18- CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento 100X. Expressão intensa. (194/6).

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

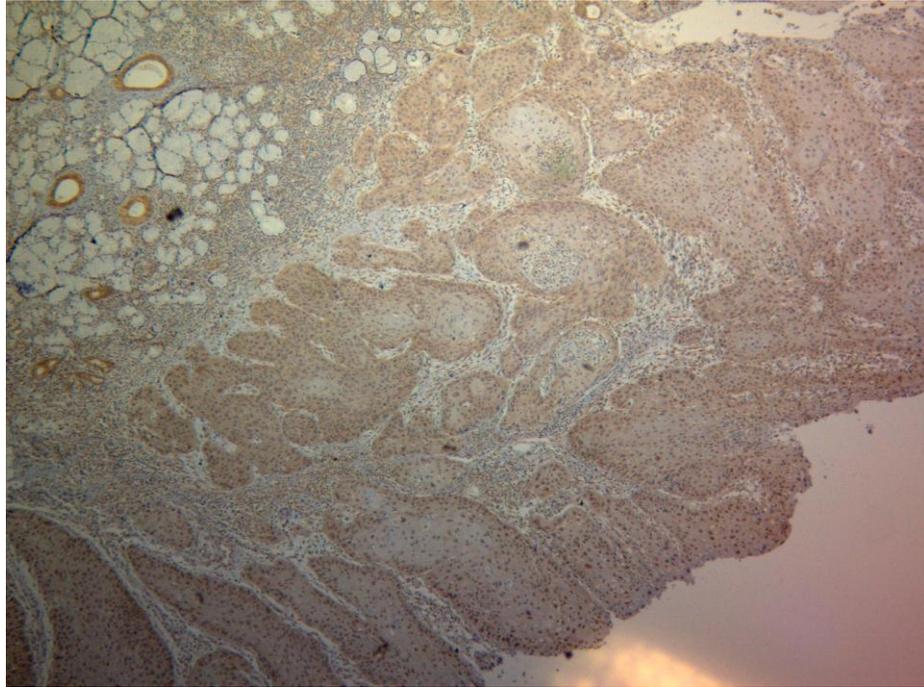


Figura 19 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento de 400X. Expressão intensa. (194/6). Notar o grau de coloração acastanhada forte.

Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

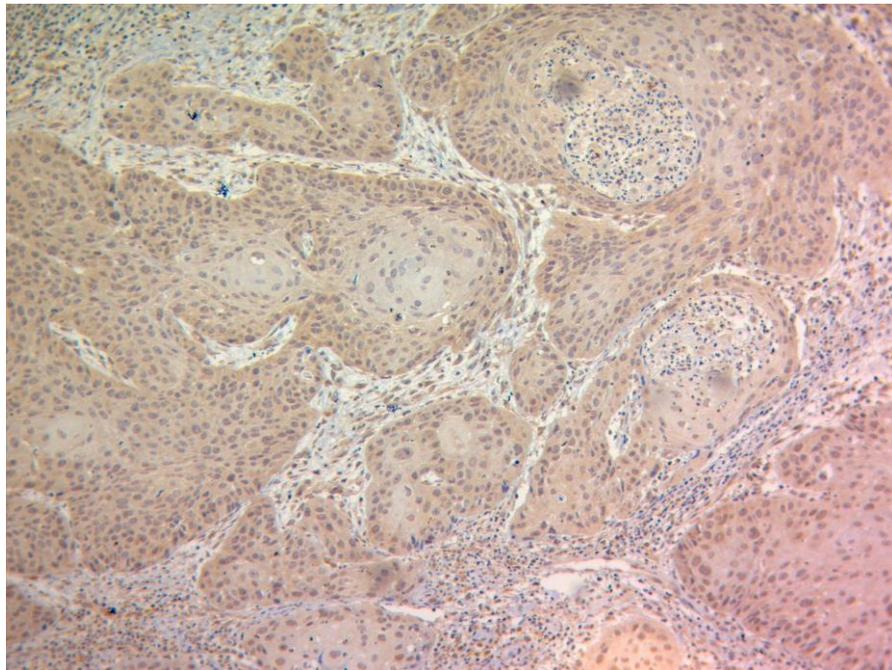


Figura 20 - CAE corado na técnica de imunoistoquímica para MMP-9 em aumento 100X. Expressão moderada (242/7) (Campo 1).
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

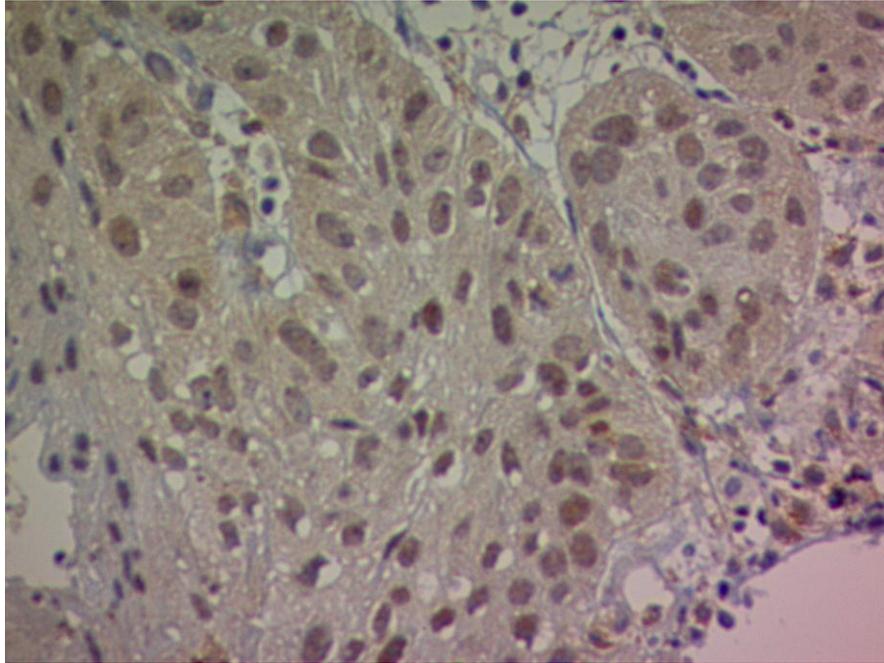


Figura 21 - CAE. Expressão imunoistoquímica de MMP-9 em aumento de 100X. Expressão moderada. (242/7) (Campo 2).
Fonte própria: Lab. Anatomopatologia, FAODO-UFMS.

APÊNDICE A

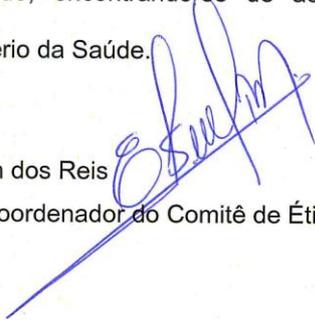


Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

O protocolo CAAE 01605312.9.0000.0021 da Pesquisadora Leyse Toscano Lopes intitulado "Expressão de metaloproteinases e seus inibidores em carcinomas epidermoides de boca", foi revisado por este comitê e aprovado, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Edilson dos Reis 
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 9 de outubro de 2013

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

Edilson dos Reis
Vice-coordenador
CEP/UFMS