



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ADRIANA DA MOTA DELGADO

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA QUEILITE ACTÍNICA,
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA**

2013

ADRIANA DA MOTA DELGADO

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA QUEILITE ACTÍNICA,
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Co-orientadora: Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

São José dos Campos

2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Dra. Camila Porto de Deco

Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Márcia Sampaio Campos

Faculdade de Ciências da Saúde
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

São José dos Campos, 31 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Luis Eduardo, que sempre me incentivou em todas as minhas aspirações acadêmicas. Você é o verdadeiro Doutor!

A minha mãe Cidinha (in memorian) que viu o início, mas não conseguiu ver o fim dessa jornada! Mas como te prometi Mãe, eu serei sempre forte!

Ao meu marido Luis Otávio pelo suporte no lar, paciência com minhas ausências e amor!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Às minhas orientadoras, **Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante** e **Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, pela dedicação, lições partilhadas e paciência que tiveram comigo diante das dificuldades que enfrentei ao longo deste percurso.*

*A **Prof. Dra. Ana Lia**, pelo valioso auxílio a este trabalho e por seu exemplo de profissional irretocável!*

*A **Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango**, por todo o valioso auxílio com este trabalho e também pela amizade!*

*A todos os amigos amealhados ao longo desta Pós-graduação, em especial as amigas **Tábata de Mello Tera, Michelle Cardoso, Micheline Bica Guterres e Pamela Diniz**. Sem vocês teria sido muito mais difícil!!!*

Enfim, a Deus por ter me carregado no colo nos momentos em que eu simplesmente não conseguia mais caminhar!!!

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Professor Doutor Carlos Augusto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e aos docentes do Departamento de Biociências e Diagnóstico bucal.

Ao Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Especiais –CEBAPE, de maneira especial à Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes, pelas portas sempre abertas.

À Profa. Dra. Yasmin R. Carvalho pela imensa dedicação e enorme sabedoria.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, em especial as técnicas Ana Lourdes e Salete que me auxiliaram na confecção das laminas deste trabalho e sempre me incentivaram com uma palavra amiga.

A todos os funcionários do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação, representados por Silvana Alvares.

Ao Professor Assistente Ivan Balducci, pelo valioso apoio e orientação durante a elaboração da análise estatística

À CAPES pela concessão de bolsa.

“Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, sou grato a esses professores”

Khalil Gibran

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Matriz Extracelular	15
2.2 Metaloproteinasas de Matriz (MMP) e Inibidores Teciduais de metaloproteinasas (TIMPs)	17
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 Seleção das amostras	22
4.2 Procedimentos laboratoriais	24
4.3 Técnica imuno-histoquímica	24
4.4 Metodologia de análise do material	26
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Dados clínicos e resultados da análise histopatológica	30
5.2 Resultados da análise imuno-histoquímica com MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2	31
5.3 Intensidades das marcações de MMP-2 e -9 e TIMP-1 e -2	38
5.4 Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1	41
5.5 Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2	42
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	66
ANEXO	86

Delgado AM. Estudo Imuno-histoquímico da Queilite Actínica, do Carcinoma Epidermoide de Lábio e do Carcinoma Epidermoide de Língua [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

Desordens orais potencialmente malignas como a Queilite Actínica (QA) e neoplasias malignas como os Carcinomas Epidermoides (CE) apresentam comportamentos biológicos variáveis em função de diversos fatores teciduais que levam a desregulação do metabolismo celular. As Metaloproteinases de Matriz (MMP), endopeptidases responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, podem estar relacionadas com o comportamento biológico dos carcinomas. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e da MMP-9 e dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP) 1 e 2 na QA e nos CE de lábio e de língua e relacionar os resultados com as características histopatológicas das lesões com uma possível relação entre a QA e o CE de lábio. Para tanto, neste estudo foram analisados 35 casos de QA em lábio inferior, 32 casos de CE primário em lábio inferior e 34 casos de CE primário em língua, todos com diagnóstico clínico e histopatológico, do Ambulatório da Disciplina de Propeidêutica Estomatológica e da Disciplina de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos – UNESP, respectivamente. O grupo controle contou com 16 casos, sem alteração clínica ou histopatológica no tecido epitelial e sem inflamação, provenientes de biópsias realizadas na mesma instituição para confirmação do diagnóstico de hiperplasia fibrosa ou mucocelose. Os resultados foram submetidos à análise estatística. Pode-se observar que, em nossas amostras de QA e de CE de lábio e de língua, a MMP-2 e seu regulador, a TIMP-2, encontra-se subexpressa, assim como a MMP-9 e seu inibidor, a TIMP-1. A expressão de MMP-9 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os casos de QA e de CE, no entanto não se pode negar o claro aumento de expressão de MMP-9 nas lesões de QA quando estas são comparadas as lesões ao grupo controle. Portanto uma das maiores contribuições deste trabalho foi demonstrar que na Queilite Actínica realmente está presente um danoso comprometimento da matriz extracelular.

Palavras-chave: Queilite. Carcinoma de células escamosas. Metaloproteinases de Matriz. Inibidores Teciduais de Metaloproteinases.

Delgado AM. Immunohistochemical study of Cheilits actinic, squamous cell carcinoma of the lip and tongue squamous cell carcinoma [thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

Potentially malignant oral disorders as actinic cheilitis (QA) and neoplastic as squamous cell carcinomas (EC) of the lip and tongue, exhibit biological behavior that varies with several factors, such as genetic changes that lead to dysregulation of cellular metabolism. The aim of this study was to evaluate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) 1 and 2, using the technique of immunohistochemistry. MMPs are responsible for endopeptidase degradation of the extracellular matrix. Was investigated in QA and CE lip and tongue, the presence and activity of these proteolytic enzymes and a possible relationship between that and the transition from QA to EC lip; besides trying to relate the results with pathologic features and compare the found between the groups. For both the study included 35 cases of QA in the lower lip, 32 CE primary lip and 34 CE of tongue with clinical and histopathological diagnosis of Ambulatory Discipline Propedeutics Stomatological and Oral Pathology, Faculty of Dentistry Institute Science and Technology, São José dos Campos - UNESP, respectively. The control group was consisted of 16 patients without clinical or histopathological changes in the epithelial tissue and without inflammation; this material came from biopsies performed to confirm the diagnosis of other pathologies, such as fibrous hyperplasia and mucocele. The data collected in the morphometric were analyzed and subjected to statistical analysis. The study concluded that both MMP-2 as their regulator TIMP-2 are low expression in our samples of Actinic cheilitis, lip squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma of tongue, and that MMP-9 its main inhibitor, TIMP-1 also are understated in all our samples and that although statistically not significant, the expression of MMP-9 was found in AK lesions when compared to the control group which in our view demonstrates a strengthening in the fact that the cheilitis Actinica there but a harmful impairment of the extracellular matrix.

Keywords: Cheilitis. Squamous cell carcinoma. Matrix Metalloproteinases. Tissue Inhibitors of metalloproteinases.

1 INTRODUÇÃO

A Queilite actínica (QA) foi descrita por Ayres em 1923 ao relatar lesões labiais caracterizadas por uma inflamação crônica, especialmente do lábio inferior, cujo agente etiológico é a radiação solar. A QA ocorre mais frequentemente em indivíduos acima dos 45 anos de idade, leucodermas, com predileção pelo sexo masculino e não fumantes (Cavalcante et al., 2008). O lábio inferior é o local mais envolvido (Main, Pavone, 1994; Ibsen, Phelan, 1996) por estar mais exposto à radiação UV devido à protusão (Scheinberg, 1992). Este fato é bastante relevante no Brasil, pois sua economia está baseada na agricultura, pecuária e pesca onde os trabalhadores são constantemente expostos aos raios solares (Batista et al., 2010).

Clinicamente, o vermelhão do lábio tem um aspecto multifocal com a presença de manchas ou placas brancas, áreas eritematosas, aumento de volume (infiltração), perda da definição da linha divisória entre a pele e o vermelhão, enrugamento, descamação e sintomatologia de ressecamento e ardor (Main, Pavone, 1994; Cavalcante et al., 2008). Há outros aspectos clínicos da QA referidos na literatura, tais como, quadro agudo com edema e eritema, úlceras com cicatrização lenta (Main, Pavone, 1994; Laskaris, 2004), atrofia e perda de elasticidade (Bentley et al., 2003). É ainda descrita como uma condição difusa e discreta (Robinson, 1989) e que apresenta úlceras em cicatrização, porém sem seu desaparecimento por completo (Girard et al., 1980).

Microscopicamente, caracteriza-se por hiperqueratose (orto ou para), atrofia ou hiperplasia epitelial e acantose (Stanley, Roenigk, 1988; Main, Pavone, 1994; Kaugars et al., 1999; Cavalcante et al., 2008). Na lâmina própria apresenta elastose e na maioria dos casos inflamação

(Lundeen et al., 1985; Kaugars et al., 1999), sendo que vasos teleangiectásicos podem ser observados (Cavalcante et al., 2008). A elastose que é a degeneração basofílica do colágeno, irreversível, evidencia desintegração das fibras colágenas e formação de massas de material basofílico na lâmina própria (Cavalcante et al., 2008). A produção de material alterado decorrente da elastose solar pode evoluir para a formação da área espessada que se mostra na pele logo abaixo do vermelhão (Main, Pavone, 1994).

A QA corresponde a uma condição com potencial de transformação maligna e este evento ocorre entre 10 a 20% dos casos (Kronic et al., 1998; Pontes et al., 2005). A progressão para o carcinoma epidermóide de lábio pode ocorrer num período de 1 a 20 anos, caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente (Ayres, 1923; Cataldo, Doku, 1981; Main, Pavone, 1994; Santos et al., 2003). Os carcinomas epidermóide (CE) de lábio representam 25 a 30% de todos os cânceres orais e a maioria surge no vermelhão (Moore et al., 1999) e envolvem com frequência o lábio inferior (Ibsen, Phelan, 1996).

Em muitas condições fisiológicas e patológicas tais como a reparação de tecidos e invasão tumoral, a arquitetura do tecido e os limites de células do estroma são rearranjados, resultando em uma nova organização das estruturas pré-existentes (Giannelli et al., 1999).

Uma dessas condições patológicas são desenvolvimento de neoplasias, crescimento e invasão tumoral e metástases, onde de acordo com Nabeshima et al. (2002) as metaloproteinases da matriz (MMP) desempenham amplo papel, estando presentes até mesmo nos eventos mais precoces da carcinogênese,

Dessa forma o estudo das metaloproteinases de matriz, que são importantes proteases tradicionalmente associadas com a degradação da maioria dos componentes da matriz extracelular, participando dos processos de remodelamento tecidual e reorganização

angiogênica, bem como o estudo de seus inibidores teciduais, torna-se oportuno (Rodríguez et al., 2010).

Portanto diante das informações expostas, a avaliação de fatores que influenciam no prognóstico do câncer é importante para o conhecimento sobre o comportamento neoplásico e futuro desenvolvimento de terapia antineoplásicas (Alberts, 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pele é um órgão capaz de iniciar a resposta do sistema imune contra antígenos externos e um grande número de células dermais e epidermais participam das reações imunes da pele. Células de Langerhans e queratinócitos são responsáveis por iniciar a atividade imune, enquanto fibroblastos dermais, células dendríticas, mastócitos e células endoteliais mantêm e medeiam a resposta imune. A exposição à radiação UV pode alterar diretamente a função destas células, resultando em supressão da resposta imune (Ch'ng et al., 2006). A literatura tem relatos de que os raios UV induzem os mastócitos a sintetizar e liberar diversos mediadores tais como: histamina, interleucinas, triptases e metaloproteinases (Grimbaldeston et al., 2006).

O comportamento do carcinoma epidermoide do lábio não segue os mesmos padrões descritos para a pele e para a boca. Em relação à pele, a neoplasia no lábio tem maior probabilidade de desenvolver metástase, com taxas variando de 3% a 20%, todavia é de melhor prognóstico quando comparado ao câncer intraoral. Os carcinomas espinocelulares da pele provenientes de queratoses actínicas (análogo da queilite actínica crônica em pele) tem melhor prognóstico, com probabilidade de 0,5% a 3% de metastatizar, o que nos faz supor que, da mesma forma que na pele, o tumor que se origina de queilite actínica pode ter melhor prognóstico.

O crescimento neoplásico resulta de um desequilíbrio entre a proliferação e apoptose celular, influenciado pela angiogênese. Por sua vez, o potencial metastático é influenciado por alterações na interação célula-célula e célula-matriz (Pereira et al., 2005).

Assim, no processo de invasão tumoral as células neoplásicas interagem entre si, bem como com as células do estroma e com os componentes da matriz extracelular (Barros et al., 2011). O fronte invasivo tumoral tem grande significância biológica nas neoplasias epiteliais devido o acúmulo de células proliferativas heterogêneas (Araújo Júnior et al., 2009)

Para iniciar o processo de invasão e posteriormente produzir metástase, as células neoplásicas precisam degradar a membrana basal subjacente e a matriz extracelular (MEC) intersticial, o que é realizado pela ação de diversas proteases, secretadas por diferentes tipos celulares e que podem ser divididas em cinco grupos: serinas, cisteínas, treoninas, aspárticas e metaloproteinases. Destas enzimas, as que têm maior importância no comportamento maligno de neoplasmas são as metaloproteinases (MMPs), que desempenham um papel crucial em invasão e metástase (Vicente et al., 2005; Barros et al., 2011). Impola et al. (2004), por exemplo mostra, em seus resultados, que o grau de invasividade de carcinomas orais pode ser dependente do perfil de expressão de MMPs.

2.1 Matriz Extracelular

A matriz extracelular é um espesso emaranhado de colágeno e elastina mergulhado numa base viscoelástica de proteoglicanos e glicoproteínas, ao passo que a membrana basal caracteriza-se por ser uma espécie de malha insolúvel e flexível de colágeno tipo IV e glicoproteínas, como a laminina, cujo papel na progressão e disseminação de tumores epiteliais é decisivo (Liotta et al., 1980; Curran, Murray, 2000).

A MEC desempenha diversas funções tal como funções estruturais e de proteção, incluindo suporte físico, resistência a tração, pontos de ligação para receptores de superfície celular, e como um reservatório para fatores de sinalização que modulam diversos processos, como angiogênese, resposta inflamatória, migração, proliferação e orientação celular (Badylak, 2002). Por exemplo, durante a angiogênese, as interações das células com a MEC, influenciam células endoteliais, ativando-as, e contribuindo para o recrutamento das células progenitoras endoteliais (Bauer et al., 2005).

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular intersticial e, em mamíferos, o colágeno tipo I representa cerca de 90% do total destas proteínas fibrosas. Sua clivagem é um evento essencial para que uma célula normal ou neoplásica possa se mover na matriz extracelular (Campos et al., 2007).

A degradação da MEC envolve mecanismos distintos sendo iniciada pela dissolução mediada pelas MMPs (Seabra, 2006). Stamenkovic (2000) relata que estudos indicam que muitas regiões dos inibidores das metaloproteinases (TIMPs) estão também envolvidos na formação de complexos com colagenases intersticiais, e que uma seqüência específica, a qual compreende duas das pontes dissulfeto da TIMP-1 é altamente efetiva em inibir a atividade colagenase. A proteólise do colágeno fibrilar resulta na produção de moléculas termicamente instáveis, que se desnaturam e assumem a forma de gelatina, que pode, então, ser degradada por outros membros da família MMP (Barros et al., 2011).

Ademais, não se deve perder de vista o fato de que a matriz extracelular pode influenciar os processos de invasão e migração celulares e a participação desses componentes torna-se importante, uma vez que a Queilite Actínica, como já foi descrito, é passível de transformação maligna (Araújo et al., 2007).

2.2 Metaloproteinases de Matriz (MMP) e Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP)

As MMPs são um grupo de endopeptidases responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais (Nagel et al., 2004; Navarro et al., 2006, Rezende et al., 2012). São agrupadas segundo as estruturas e substrato específico em: colagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromalisinas (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 e MMP-26) e metaloproteinases ligadas à membrana plasmática (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, também conhecidas como MT1-MMP a MT6-MMP, respectivamente) (Barros et al., 2011).

Há também alguns membros da família das MMPs que possuem características especiais que impedem sua inserção nos grupos supracitados, tais como a metaloelastase de macrófago, a estromalisina-3, MMP-19 e a enamelisina (Folgueras et al., 2004).

Há um alto grau de homologia entre as enzimas em cada grupo (cerca de 80%) e entre os grupos, aproximadamente 50% (Thomas et al., 1999).

Existem muitas conseqüências biológicas da proteólise produzida pelas MMPs. Substratos das MMPs incluem fatores de crescimento, receptores tirosina-quinase, moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas, e algumas próprias MMPs, gerando variadas respostas (Page-McCaw et al., 2007).

A atividade das metaloproteinases é, em parte, regulada pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (Sutinen et al., 1998). As TIMPs são pequenas proteínas multifuncionais que possuem peso molecular que gira em torno de 21 a 28 kDa e são secretadas na matriz extracelular. São expressas por muitos tipos celulares incluindo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais e são reguladas por citocinas tais como IL-1, IL-6, TNF- α , além de fatores de

crescimento semelhantes aos que controlam a expressão de MMPs (Docherty, Murphy, 1992; Sun, 2008). Quatro TIMPs (1, 2, 3 e 4) tem sido clonadas, purificadas e caracterizadas, apresentando muitas similaridades. Entretanto, elas exibem características estruturais distintas, bem como, propriedades bioquímicas e padrões de expressão diversos, o que sugere que cada TIMP possui um específico papel *in vivo* (Baker et al., 2002).

As MMPs desempenham papéis importantes em diversos processos fisiológicos e patológicos, bem como regulam diversos comportamentos celulares, tais como angiogênese, proliferação celular, apoptose, alteração da motilidade celular, efeitos sobre o sistema imunitário, modulação da bioatividade de quimiocinas e remodelação das membranas extracelulares (Jordan et al., 2004, Arakaki et al., 2009). Em situações de normalidade e/ou em tecidos adultos, os níveis de MMP geralmente encontram-se baixos ou mesmo não podem ser detectados (Barros et al., 2011).

A atividade das MMPs é regulada, em parte, como já foi descrito anteriormente, por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Docherty, Murphy, 1990) podendo também ser inativadas por eles (Diehl, 2007). Segundo Brew et al. (2000) as TIMPs são secretadas por células tumorais e pelo tecido hospedeiro, podendo se ligar a formas ativas ou latentes de muitas MMPs, funcionando como proteínas antimetastáticas. As TIMPs são capazes de inibir as MMPs solúveis através das interações com uma razão estequiométrica de 1:1, formando complexos TIMP-MMP que se tornam incapaz de ligar-se ao substrato. Sabe-se atualmente que as MMPs podem ser inibidas por um número diferente de TIMPs.

Cawston (1998) afirma que pelo fato das MMPs serem enzimas altamente potentes, estas são cuidadosamente controladas por uma série de mecanismos tais como: citocinas e outros agentes como fatores de crescimento que podem estimular a síntese e secreção de pró-

MMPs, a necessidade de prévia ativação dessas pró-MMPs, bem como a atuação das TIMPs na sua inibição, elemento este que também é regulado por fatores de crescimento. Cada proteína TIMP possui características únicas (Sekhon, 2010). Concha (2010) descreve que a TIMP-1 é mais limitada em seu alcance inibitório por possuir baixa afinidade com as MMPs ligadas à membrana tais como MMP-14, MMP-16 e MMP-24. A TIMP-1 é responsável pela formação de complexos preferencialmente com a pró-MMP-9. A TIMP-2 se liga à pró-MMP-2 facilitando sua ativação. A TIMP-3 inibe a MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-13 e liga-se tanto à pró-MMP-2 quanto à pró-MMP-9 e a TIMP-4 pode se ligar com a pró-MMP-2 e inibir as MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9 e MMP-14. Embora a TIMP-1 forme principalmente complexo com a MMP-9, enquanto que TIMP-2 atue com preferência sobre a MMP-2, ambos os inibidores têm atividade sobre um grande número de tipos celulares além de sua superexpressão possibilitar a redução de crescimentos tumorais, de acordo com Gomez (1997). Ainda no que se refere aos inibidores, a TIMP-2 é considerada inibidora de invasão e metástase de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo* (Henriet et al., 1999) e também da angiogênese associada a tumores (Murphy, 1993).

Alterações na homeostasia entre as MMPs e TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas com a remodelação não controlada da MEC, como artrite, câncer, nefrites, desordens neurológicas e fibroses, conseqüentemente, há maior degradação da matriz extracelular, o que facilita a invasão e metástase (Stamenkovic, 2000, Visse e Nagase, 2003). Além dos desequilíbrios nas atividades extracelulares de MMPs e TIMPs estarem associadas às patologias acima descritas, também há relatos na literatura em que se demonstra o envolvimento dessas proteases na patogênese da doença periodontal, na destruição de cartilagens e até mesmo em doenças cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio (Sutinen et al., 1998; Arakaki et al., 2009).

Um desequilíbrio na interação entre TIMPs e MMPs pode resultar em uma séria de estados patológicos tais como artrite, metástase tumoral, ou ainda doenças nas quais a perda de matriz extracelular é a maior característica (Ribeiro et al., 2008).

As MMP-2 e MMP-9 apresentam estruturas muito semelhantes, são pertencentes à subfamília das gelatinases e recebem esta denominação em função da sua capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina). O grupo das gelatinases é constituído por dois componentes: gelatinase-A ou gelatinase de 72kDa (MMP-2) e gelatinase-B ou gelatinase de 92 kDa (MMP-9) (Kubota et al., 2000; Diehl, 2007; Barros et al., 2011). De acordo com Navarro et al. (2006) a MMP-2 age hidrolisando o colágeno do tipo IV, que é um importante componente das membranas basais e atua como primeira barreira para a progressão de células epiteliais neoplásicas. A partir dessa hidrólise, há início, o processo de invasão tumoral. (Navarro et al., 2006; Barros et al., 2011).

Foi observado que a expressão aumentada de gelatinases possui significativa correlação com estágio, metástase em linfonodos e prognóstico reservado em câncer de cabeça e pescoço, principalmente em câncer oral e de laringe (Colombo, Rahal, 2009).

Devido ao importante papel das gelatinases no desenvolvimento do câncer, diversos autores têm relacionado os níveis de MMP-2 e MMP-9 com carcinomas de esôfago, orais, de endométrio, de pele, de laringe, entre outros (Pereira et al., 2006).

Fundyler et al. (2004) e Pereira et al. (2006) demonstram que altos níveis das MMP-2 e MMP-9 estão presentes em casos com grande potencial de invasão e metástase e que, particularmente a MMP-9, pode ser considerada um bom marcador a ser utilizado como fator prognóstico.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a expressão imuno-histoquímica das MMP-2 e -9 e dos seus inibidores teciduais, as TIMP-1 e -2, na queilite actínica, no carcinoma epidermoide de lábio e no carcinoma epidermoide de língua.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista (UNESP) sob o Protocolo n ° 001/2011-PH/CEP. (Anexo A) e também foi aprovado após apresentação ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia, da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos.

4.1 Seleção das amostras

Para este estudo foram selecionados 35 casos de QA em lábio inferior, 32 casos de CE em lábio inferior, 34 casos de CE em língua e 16 casos controle.

Todos os casos selecionados de QA e CE tinham diagnóstico clínico e histopatológico do Ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica e do Laboratório da Disciplina de Patologia, respectivamente, da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia - Unesp - Campus de São José dos Campos. Para controle foram selecionados casos sem alteração clínica e histopatológica e sem inflamação no tecido epitelial e nos tecidos adjacentes ao epitélio. O material dos casos controle foi proveniente de atendimento clínico com

realização de biópsias para confirmação de diagnóstico de patologias como hiperplasia fibrosa ou mucocele.

Os dados relativos à idade, gênero e etnia foram coletados dos prontuários de anamnese de cada paciente.

Para padronização do material foram estabelecidos alguns critérios de inclusão e de exclusão.

Foram incluídos na amostra casos de queilite actínica em lábio inferior e de carcinoma epidermoide localizados em lábio inferior e na língua, resultantes de biópsias emblocadas em parafina que encontrava-se em bom estado de conservação e em quantidade suficiente para a realização do estudo imuno-histoquímico. Para o grupo controle foi incluído no estudo material proveniente de biópsias realizadas para confirmação do diagnóstico de hiperplasia fibrosa ou mucocele, que apresentavam epitélio e tecido subepitelial sem alterações, que não apresentavam inflamação e, cujo material emblocado em parafina estava em bom estado de conservação e em quantidade suficiente para a realização da técnica imuno-histoquímica.

Foram excluídos da amostra os casos de QA e CE de lábio inferior e de língua de espécimes (biópsias) com material insuficiente ou com extensas áreas de necrose, assim como casos de pacientes com dados clínicos incompletos ou que tenham recebido tratamento prévio.

Para os casos controle foi excluído o material que apresentasse inflamação, mau estado de conservação ou quantidade insuficiente para obtenção de cortes histológicos satisfatórios.

4.2 Procedimentos laboratoriais

Os espécimes de biópsias foram fixados em formol a 10% e enviados para o Laboratório da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP onde foram submetidos a procedimento histotécnico. O material foi desidratado e incluído em blocos de parafina. Cortes de 5 μm foram corados por HE para análise morfológica e classificação histopatológica. Para coloração imuno-histoquímica foram realizados cortes semi-seriados de 3 μm .

4.3 Técnica Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos de 3 μm foram montados em lamínas de vidro tratadas com organossilano a fim de se evitar o descolamento durante a imuno coloração. A desparafinização foi realizada com xilol por 15 minutos a 60 graus, seguida por reidratação em álcool etílico em concentrações decrescentes. Os cortes foram então lavados em hidróxido de amônia a 10% por 5 minutos. De acordo com o anticorpo de interesse (Quadro 1) as lâminas foram submetidas a métodos de recuperação antigênica, posteriormente, bloqueou-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 1% (VWR International, Lutterworth, UK) ou Peroxi Block (Novocastra) conforme o anticorpo de interesse (Quadro 1). Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários (Quadro 1) conforme protocolo do fabricante. Incubação por 30 minutos com cada reagente do kit LSAB (DakoCytomation) ou Novocastra e em seguida,

com o cromógeno diaminobenzidina Impact DAB TM (Vector, Peterborough, UK) ou Novocastra de acordo com protocolo específico de tempo. Contra corou-se com Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Finalmente, procedeu-se desidratação em série de alcoóis etílicos, passagem em xilol e montagem de laminas com Vectamount H-5000 (Vector, Peterborough, UK). Controles positivos (Quadro 1) e negativos (ausência do anticorpo primário) foram realizados nas reações imuno-histoquímicas.

Quadro 1 – Anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico e respectivos clones, etapas de protocolo, controles e fabricantes

Especificidade	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Clone	17B11	15W2	63515	89025
Recuperação Antigênica	Citrato (BM 95°C) *	Citrato (BM 95°C) *	Citrato (BM 95°C) *	Citrato (BM 95°C) *
Bloqueio da Peroxidase	Peroxi Block®**	Peróxido de hidrogênio a 1%	Peroxi Block®**	Peroxi Block®**
Diluição	1: 40	1: 40	1:75	1:100
Tempo de incubação	1 hora	Overnight	1 hora	1 hora
Controles positivos	Intestino	Fígado	Placenta	Fígado
Fabricante	Novocastra**	Novocastra**	Novocastra**	Novocastra**

* BM – Banho Maria, ** Novocastra TM Lyophilized, Leica Microsystems

4.4 Metodologia de análise do material

As análises histopatológica e imuno-histoquímica de todos os casos foram realizadas por dois examinadores, forma independente, em microscopia de luz. Nova análise histopatológica das QA foi realizada, especificamente para esta pesquisa, considerando-se toda a extensão dos cortes histológicos. Foram avaliadas as alterações epiteliais correspondentes à caracterização de displasia epitelial baseada em critérios de arquitetura histológica e de aspectos citológicos e seguindo a Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2005 (Quadro 2).

Após a análise e descrição histopatológica cada caso de QA foi classificado de acordo com a proposta da OMS. Segue abaixo a descrição dos critérios para a classificação final em três categorias:

- **Displasia epitelial leve:** alterações arquiteturais limitadas ao terço basal do epitélio, acompanhada de poucas atipias citológicas;
- **Displasia epitelial moderada:** alterações arquiteturais no terço basal e se estendendo ao terço médio do epitélio. O grau de atipias citológicas encontrado pode aumentar o grau da displasia;
- **Displasia epitelial severa:** alterações arquiteturais encontradas em mais de dois terços do epitélio associadas a muitas atipias citológicas.

Quadro 2 - Padrões histopatológicos e citológicos de displasia epitelial, de acordo com os critérios da OMS (Barnes et al., 2005)

Características Arquiteturais	Características Citológicas
<p>Estratificação epitelial irregular</p> <p>Perda de polaridade das células basais</p> <p>Nº aumentado de figuras de mitose</p> <p>Mitoses em localizações superficiais anormais</p> <p>Queratinização prematura de células epiteliais isoladas</p> <p>Projeções epiteliais em forma de gota</p> <p>Pérolas córneas dentro das projeções epiteliais</p>	<p>Figuras mitóticas atípicas</p> <p>Hipercromatismo</p> <p>Variação anormal do tamanho celular</p> <p>Variação anormal da forma celular</p> <p>Proporção núcleo/citoplasma aumentada</p> <p>Aumento do tamanho nuclear</p> <p>Variação anormal da forma nuclear</p> <p>Aumento do nº e tamanho dos nucléolos</p> <p>Variação anormal do tamanho dos nucléolos</p>

Da mesma forma, nova análise histopatológica dos casos de CE de lábio e de língua foi realizada, especificamente para esta pesquisa, considerando-se toda a extensão dos cortes histológicos. As características morfológicas consideradas e a classificação para gradação histopatológica segundo a diferenciação celular utilizada foram as preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (Barnes et al., 2005), na qual temos:

- **Carcinoma Bem Diferenciado:** neoplasia madura que se assemelha ao tecido de origem,

com crescimento lento e que provavelmente irá metastizar mais tardiamente;

- **Carcinoma Moderadamente Diferenciado:** neoplasia intermediária entre o Bem e o Pouco diferenciado que se apresenta com certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica e com presença de pouca queratinização;
- **Carcinoma Pouco diferenciado:** neoplasia imatura com muito pleomorfismo celular e nuclear e com pouca ou nenhuma produção de queratina.

A coloração imuno-histoquímica foi avaliada através de análise descritiva e semiquantitativa. A intensidade da marcação foi verificada sendo dividida em três classes como: marcação fraca, moderada e forte. A metodologia para a quantificação da expressão dos anticorpos foi feita em quatro escores, de acordo com a quantidade de células marcadas, segundo Franchi et al. (2002), ou seja:

0 = negativa;

1 = positiva em menos de 10% de células epiteliais;

2 = positiva entre 10 e 50% de células epiteliais;

3 = positiva em mais de 50% de células epiteliais.

4.5 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do programa Graph Pad Prism. Os testes utilizados foram de Mann Whitney, com 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e resultados da análise histopatológica

Com diagnóstico de Queilite Actínica (QA) foram examinados 35 pacientes, sendo a maioria (82,35%) do sexo masculino e apenas 17,14% do sexo feminino, numa proporção homem:mulher de aproximadamente 5:1. A idade dos pacientes variou de 33 a 80 anos, com média de idade de 59,2 anos. Dos 35 casos todos pertenciam a indivíduos leucodermas (Tabela 1).

A Classificação Histológica do Grau de Displasia Epitelial nas QA mostrou grau moderado de displasia em 60% dos casos, displasia leve em 22,85% dos casos e displasia severa em 17,14% dos casos (Tabela 2).

A Classificação Histopatológica de Malignidade mostrou que vinte e um casos (65,62%) de CELa são bem diferenciados, seis casos (18,75%) são moderadamente diferenciados e cinco casos (15,63%) são pouco diferenciados (Tabela 3).

Dos 32 pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermoide de Lábio (CELa) a maioria (87,5%) é do sexo masculino e apenas 12,5% do sexo feminino, distribuídos em uma proporção homem:mulher de 7:1. A idade desses indivíduos variou de 29 a 83 anos, com média de idade de 63,3 anos e 100% eram leucodermas (Tabela 1).

Nos 34 pacientes com Carcinoma Epidermoide de Língua (CELi), 20 casos (58%) são homens e 14 casos (41,1%) são mulheres, o que constitui distribuição em uma proporção homem:mulher de 1,43:1,00, diferente da observada nos casos de QA e de CELa. A idade desses

pacientes variou de 27 a 80 anos, com média de idade de 55,9 anos. Quanto à etnia, 76,47% dos indivíduos são leucodermas, 20,5% são melanodermas, e uma ficha clínica não informava esse dado do paciente (Tabela 1).

Dos 16 casos utilizados como grupo controle, 50% são homens e 50% são mulheres, a idade dos indivíduos variou de 06 a 53 anos, com média de idade de 19,8 anos, 50% eram leucodermas, 43,7% melanodermas e 6,2% xantoderma (Tabela 1).

5.2 Resultados da análise imuno-histoquímica com MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2

Os resultados obtidos na marcação da MMP-2 mostraram que houve pequena e por vezes, até mesmo, inexistência da expressão dessa proteína em todos os grupos estudados (Figuras 13A, 14A, 15A e 16A). Nos casos de CELa percebeu-se que soma dos escores 1, 2 e 3 foi de 40,65% (Tabela 3). A proteína MMP-9 foi pouco expressa em todos os grupos estudados (Tabela 4 e Figura 2), mas a intensidade da expressão de MMP-9 mostrou-se claramente definida (Figuras 13B, 14B, 15B e 16B). No grupo controle, tanto para MMP-2 como para MMP-9, notou-se predomínio de expressão negativa (Tabelas 3 e 4 e Figuras 1 e 2).

As TIMP foram estatisticamente pouco expressas em todos os grupos de lesões estudadas, especialmente a TIMP-2 (Tabela 6 e Figura 4), As expressões de marcação das TIMP podem ser visualizadas nas figuras de 13C e D, 14C e D, 15C e D, 16C e D. Na TIMP-1 encontrou-se 62,5% de expressão positiva no CELa, distribuídos entre os escores 1, 2 e 3 (Tabela 5). O tratamento estatístico dos grupos Controle e QA mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0.0451 < 0.05$) para a TIMP-2. A análise estatística entre CELa e o CELi mostrou diferença estatisticamente significativa para TIMP-1 ($p=0.0018 < 0.005$) e limítrofe

($p=0.0490 > 0.05$) para a TIMP-2. Para as análises imuno-histoquímicas da MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2, não houve resultados estatisticamente significantes entre a maioria dos grupos de lesões estudadas.

Tabela 1 - Distribuição dos casos de QA, CELa, CELi e Controle segundo o gênero, idade e etnia dos pacientes

Amostra	QA		CELa		CELi		Controle	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Homens	29	82,3	28	87,5	20	58,8	08	50
Mulheres	06	17,1	04	12,5	14	41,1	08	50
Leucoderma	30	85,7	32	100	26	76,4	08	50
Melanoderma	02	5,7	0		07	20,5	07	43,7
Xantodermas	0		0		0		01	6,2
Dado não informado	0		0		01	2,9	0	
Média de idade	59,2		63,3		55,9		19,8	

Tabela 2 - Classificação das lesões de QA quanto ao grau de Displasia Epitelial, segundo critérios da OMS (2005)

Grau de Displasia da QA	n	%
Leve	08	22,8
Moderada	21	60
Severa	06	17,1
Total	35	100

Tabela 3 - Classificação das lesões de CELa e de CELi quanto ao grau histológico de diferenciação celular, segundo critérios da OMS (2005)

Grau de Diferenciação Histológica	CELa		CELi	
	n	%	n	%
Bem diferenciado	21	65,6	19	55,8
Moderadamente diferenciado	06	18,7	10	29,4
Pouco diferenciado	05	15,6	05	14,7
Total	32	100	34	100

Tabela 4 – Resultados referentes aos escores da marcação imuno-histoquímica de MMP-2 nos casos de QA, CE de lábio, CE de língua e do grupo controle

MMP-2	QA		CE de Lábio		CE de Língua		Controle	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Escore								
0	27	77,1	19	59,3	26	76,4	13	81,2
1	07	20	06	18,7	04	11,7	03	18,7
2	0	0	05	15,6	03	8,8	0	0
3	01	2,8	02	6,3	01	2,9	0	0
Total	35	100	32	100	34	100	16	100

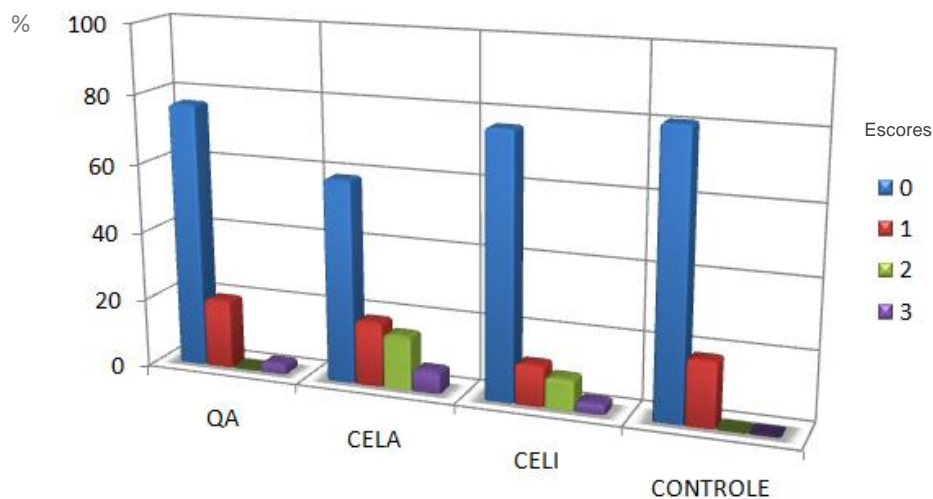


Figura 1 – Gráfico de colunas referente aos escores da marcação imuno-histoquímica de MMP-2 nas lesões estudadas.

Tabela 5 – Resultados referentes aos escores da marcação imuno-histoquímica de MMP-9 nos casos de QA, CE de lábio, CE de língua e do grupo controle

MMP-9	QA		CE de Lábio		CE de Língua		Controle	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Escore								
0	13	37,1	17	53,1	19	55,8	13	81,2
1	07	20	02	6,2	07	20,5	01	6,2
2	06	17,1	02	6,2	05	14,7	0	0
3	09	25,7	11	34,3	03	8,8	02	12,5
Total	35	100	32	100	34	100	16	100

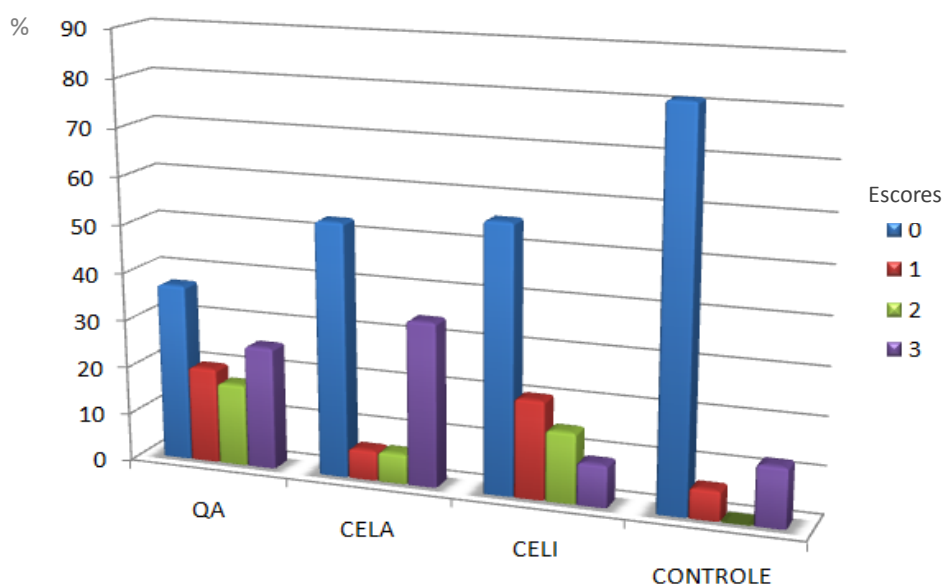


Figura 2 – Gráfico de colunas referente aos escores da marcação imuno-histoquímica de MMP-9 nas lesões estudadas.

Tabela 6 – Resultados referentes aos escores da marcação imuno-histoquímica de TIMP-1 nos casos de QA, CE de lábio, CE de língua e do grupo controle

TIMP-1	QA		CE de Lábio		CE de Língua		Controle	
Escore	n	%	n	%	n	%	n	%
0	20	57,1	12	37,5	25	73,5	13	81,2
1	07	20	08	25	06	17,6	01	6,2
2	05	14,2	06	18,7	01	2,9	0	0
3	03	8,7	06	18,7	02	5,8	02	12,5
Total	35	100	32	100	34	100	16	100

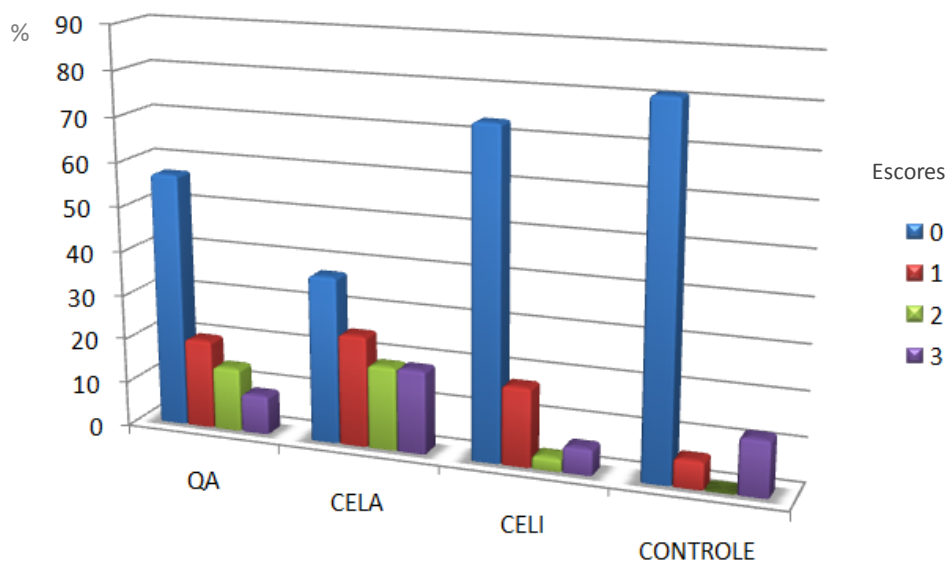


Figura 3 – Gráfico de colunas referente aos escores da marcação imuno-histoquímica de TIMP-1 nas lesões estudadas.

Tabela 7 – Resultados referentes aos escores da marcação imuno-histoquímica de TIMP-2 nos casos de QA, CE de lábio, CE de língua e do grupo controle

TIMP-2	QA		CE de Lábio		CE de Língua		Controle	
Escore	n	%	n	%	n	%	n	%
0	27	77,1	23	71,8	31	91,1	16	100
1	08	22,8	08	25	03	8,8	0	0
2	0	0	01	3,1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	35	100	32	100	34	100	16	100

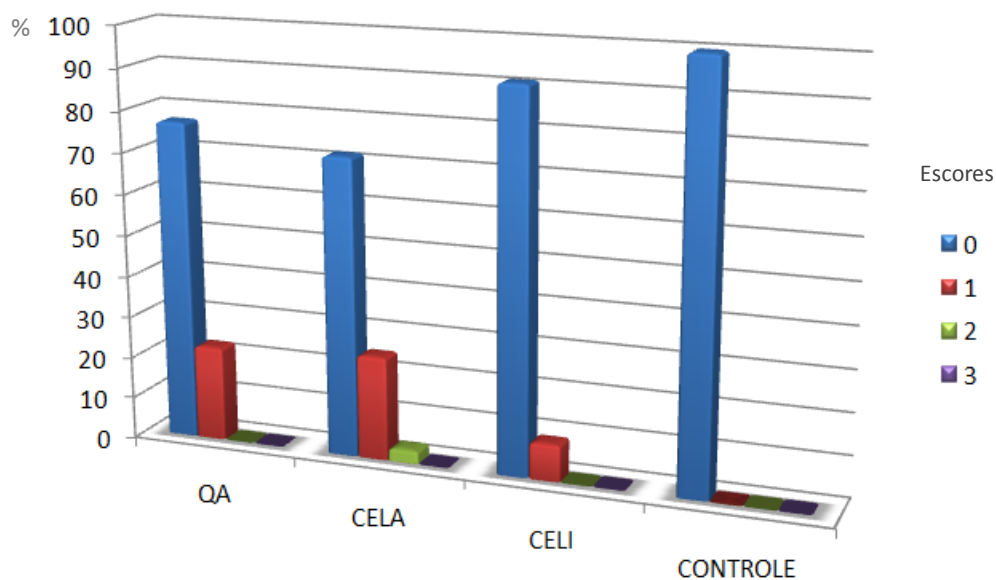


Figura 4 – Gráfico de colunas referente aos escores da marcação imuno-histoquímica de TIMP-2 nas lesões estudadas.

5.3 Intensidades das marcações de MMP-2 e -9 e TIMP-1 e -2

Na interpretação da intensidade das marcações observamos que a MMP-2, quando se expressou foi predominantemente de intensidade fraca, tanto na QA como no CELa e no CELi, havendo somente um caso de CELa de intensidade forte.

Nos casos das marcações por MMP-9, permaneceu a predominância da intensidade fraca. Porém houve um expressivo aumento de lesões com intensidade de expressão moderada e forte.

Quando avaliamos a intensidade de expressão das TIMP, a TIMP-1 teve maior intensidade de expressão em todos os grupos de lesões estudadas. O que não ocorreu em relação à TIMP-2.

No entanto, a intensidade de expressão tanto para TIMP-1 como para TIMP-2 foram notadamente fraca. Nos CELa evidenciamos que a TIMP-1 teve intensidade de expressão que variou principalmente de fraca a moderada e apenas dois casos com intensidade de expressão forte. Os dados expostos põem ser visualizados nas figuras a seguir.

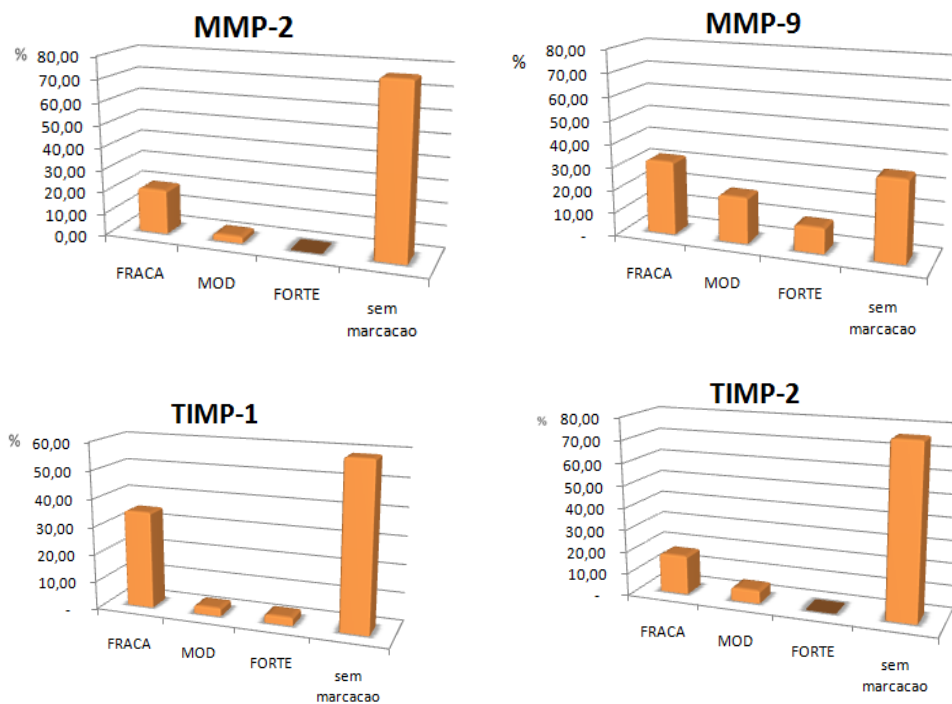


Figura 5 - Conjunto de gráficos de coluna demonstrando os padrões de intensidade de marcação encontrados em QA.

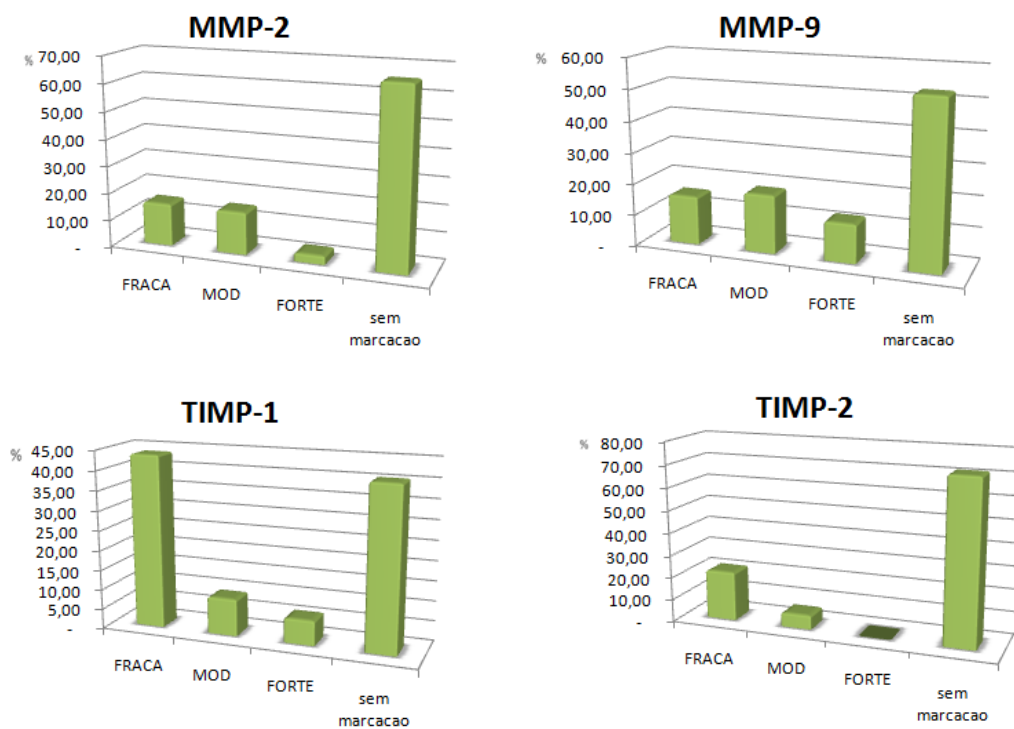


Figura 6 - Conjunto de gráficos de coluna demonstrando os padrões de intensidade de marcação encontrados em CEla.

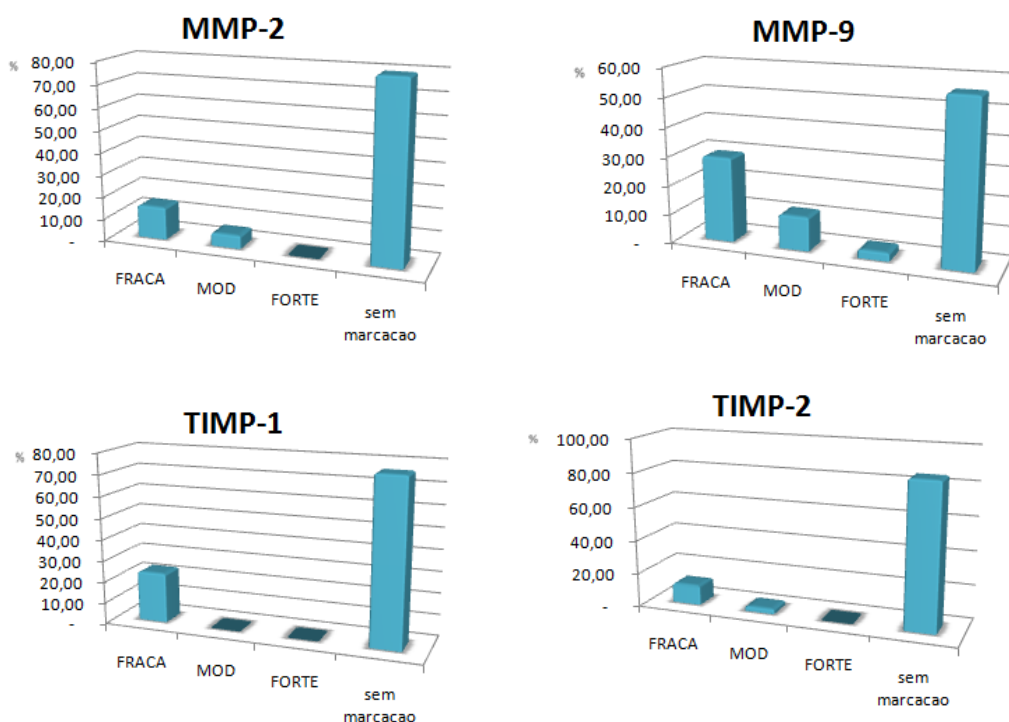


Figura 7 - Conjunto de gráficos de coluna demonstrando os padrões de intensidade de marcação encontrados em CEli.

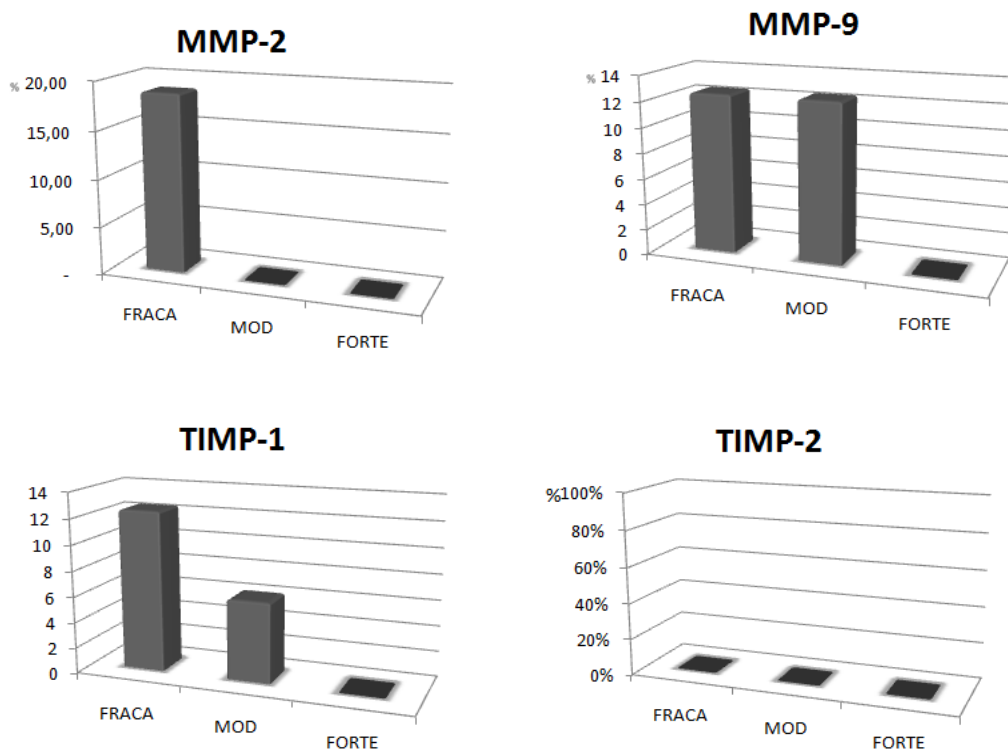


Figura 8 - Conjunto de gráficos de coluna demonstrando os padrões de intensidade de marcação encontrados no Controle.

5.4 Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1

É aceito na literatura que as TIMPs podem inibir qualquer das MMPs, no entanto, o complexo de ação mais conhecido é entre a MMP-2 e TIMP-2 e entre a MMP-9 e TIMP-1. A fim de verificarmos se tais complexos se expressaram em nossa pesquisa comparamos os escores obtidos para cada enzima (MMP-2 e MMP-9) e seus respectivos inibidores (TIMP-1 e TIMP-2), nos grupos de lesões estudadas.

Consideramos ainda nessa avaliação a relação da expressão desses com a classificação da OMS. Nos casos com QA avaliamos a relação complexo MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 com o grau de displasia e nos de CELa e CELi com o grau de diferenciação celular.

Para a QA, avaliamos o complexo MMP-2/TIMP-2 com o grau de displasia que deu valor de p insignificante ($p = 0.999 > 0.05$). Desses casos, 50% apresentaram predominância da enzima e os outros 50% predominância do inibidor (Apêndices A, B e C).

Dessa forma pudemos verificar que para a QA, tivemos formação do complexo MMP-2/TIMP-2 em menos da metade dos casos (incluídos nisto todos os 3 graus de displasia) o que nos deu um valor de p insignificante ($p = 0.999 > 0.05$) (Figura 9).

A presença da interação do complexo MMP-9/TIMP-1 pode ser verificada na maioria dos casos de QA ($p = 0.0093 > 0.05$) (Apêndices A, B e C e Figura 9).

Para os casos de CELa, houve formação do complexo MMP-2/TIMP-2 sem resultados estatisticamente significante ($p = 0.1758 > 0.05$). Observou-se predominância da expressão do inibidor sobre a metaloproteinase nos casos moderadamente diferenciados e nos pouco diferenciados a relação foi inversa. No complexo MMP-9/TIMP-1 o resultado estatístico insignificante se repetiu ($p = 0.7343 > 0.05$). Na relação desse complexo com a classificação da OMS, tivemos predomínio

da ação do inibidor nos casos com diferenciação moderada e nos casos pouco diferenciados a ação foi restrita as metaloproteinase (Apêndices D, E e F e Figura 10).

Para os CELi a formação de complexo MMP-2/TIMP-2 foi pobre e o resultado estatístico insignificante ($p=0.0746 > 0.05$). Detectamos a expressão desse complexo apenas em alguns casos com grau de bem diferenciado e pouco diferenciado. A formação do complexo MMP-9/TIMP-1 foi encontrada na maioria dos casos estudados, porem com resultado estatístico insignificante ($p=0.1117 > 0.05$). Tivemos maior expressão da metaloproteinase nos casos com diferenciação moderada e nenhuma expressão do inibidor nos casos com pouca diferenciação (Apêndices G, H e I e Figura 11).

Para o grupo controle obtivemos resultado significativo estatisticamente na formação do complexo MMP-9/TIMP-1 ($p = 0.0083$) (Apêndice J e Figura 12).

5.5 Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2

Mesmo sendo menos comuns, os complexos de ação entre MMP-2 e TIMP-1 e entre MMP-9 e TIMP-2 também foram tabulados e comparados.

Para a QA, avaliamos o complexo MMP-2/TIMP-1 com o grau de displasia que deu valor de p significante ($p = 0.0413 < 0.05$), com predominância da ação do inibidor sobre a enzima. A presença da interação do complexo MMP-9/ TIMP-1 pode ser verificada na maioria dos casos de QA ($p=0.0001 < 0.05$) onde predominou a ação da enzima sobre o inibidor (Apêndices L, M e N e Figura 9)

Para os CELa, houve formação do complexo MMP-2/TIMP-1 sem resultados estatisticamente significante ($p=0.0818 > 0.05$). Observou-

se predominância da expressão do inibidor sobre a metaloproteinase nos casos bem diferenciados e nos pouco diferenciados, nos casos moderadamente diferenciados a expressão foi igual para enzima e inibidor. No complexo MMP-9/TIMP-2 o resultado estatístico foi significativo ($p=0.0169 < 0.05$). Na relação desse complexo com a classificação da OMS, houve predomínio da ação da enzima nos casos bem diferenciados e com diferenciação moderada e nos casos pouco diferenciados a ação foi restrita as metaloproteinase (Apêndices O, P e Q e Figura 10).

Para os CELi a formação de complexo MMP-2/TIMP-1 obteve resultado estatístico insignificante ($p=0.8701 > 0.05$). Houve detecção da expressão desse complexo principalmente nos casos com grau de bem diferenciado e pouco diferenciado, sendo que nos pouco diferenciados a expressão foi restrita as metaloproteinases. A formação do complexo MMP-9/TIMP-2 pode ser verificada e o resultado estatístico foi significativo ($p=0.0005 < 0.05$). Nas três classificações (bem, moderado e pouco diferenciado) houve predominância da expressão da metaloproteinase sobre o inibidor (Apêndices R, S e T e Figura 11).

Para o grupo controle obtivemos resultado significativo estatisticamente na formação do complexo MMP-9/TIMP-2 ($p = 0.0093$) (Apêndice U e Figura 12).

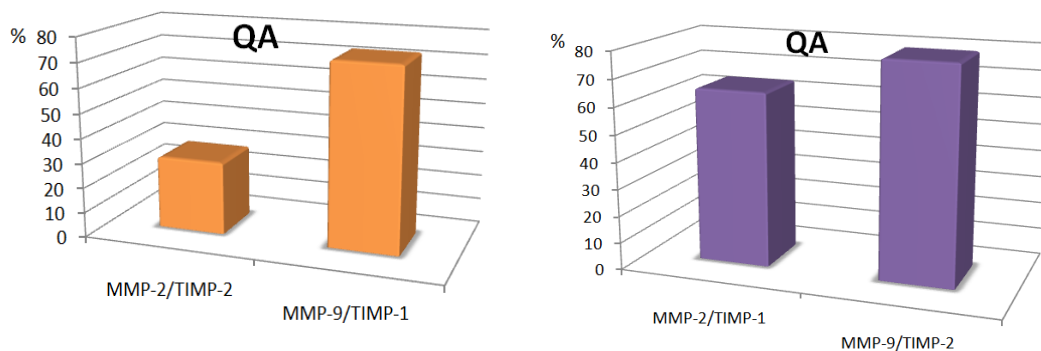


Figura 9 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 e complexos MMP-2/ TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em QA, respectivamente.

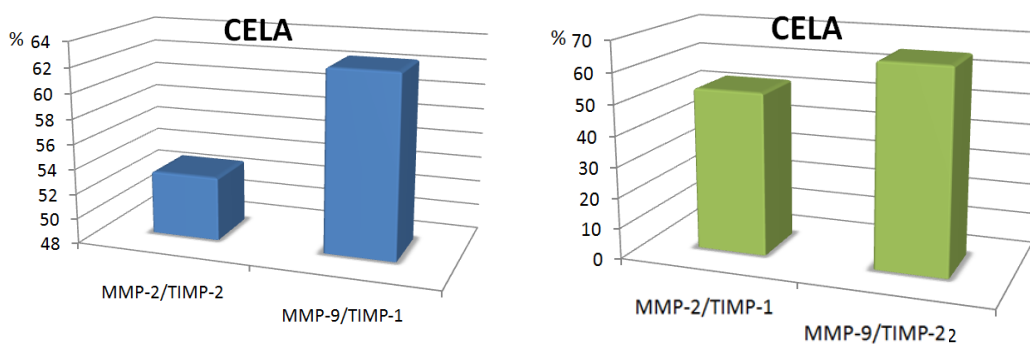


Figura 10 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 e complexos MMP-2/ TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em CE Lábio respectivamente.

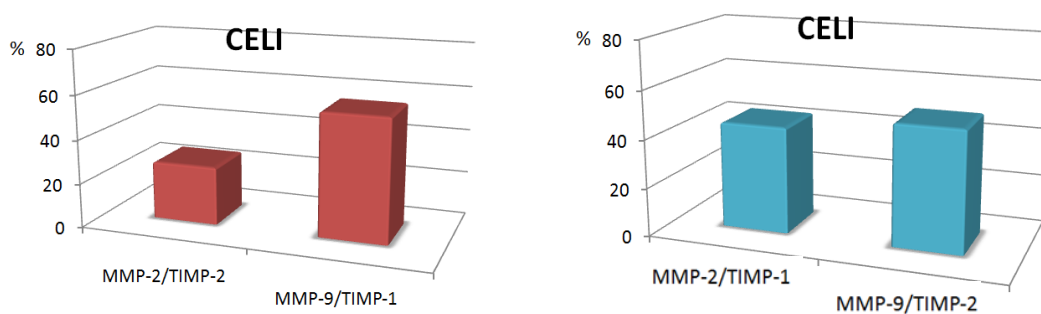


Figura 11 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 e complexos MMP-2/ TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em CE Língua respectivamente.

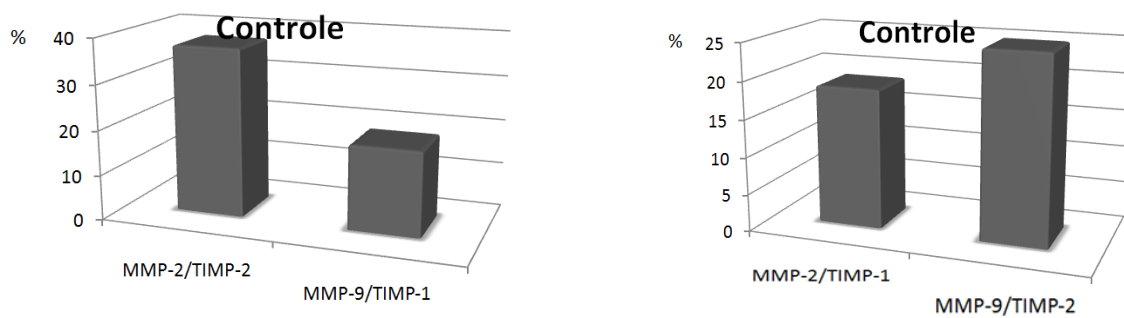


Figura 12 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 e complexos MMP-2/ TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em CE Língua respectivamente.

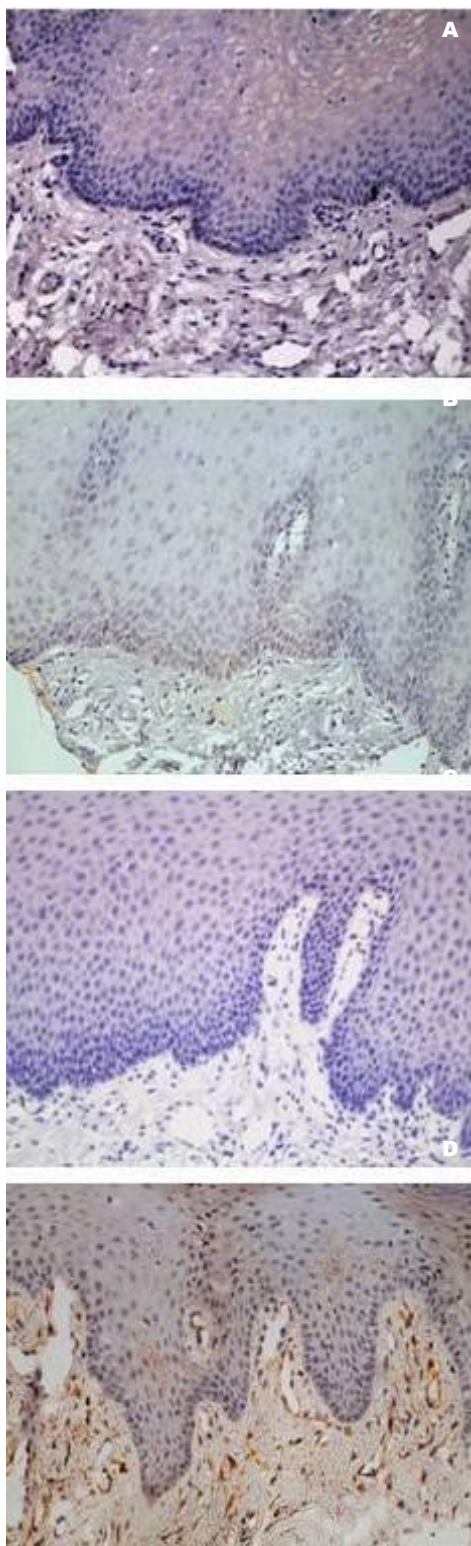


Figura 13 – Fotomicrografia - Grupo Controle (aumento de 200x): A) expressão de MMP-2; B) expressão de MMP-9; C) expressão de TIMP-2; D) expressão de TIMP-1.

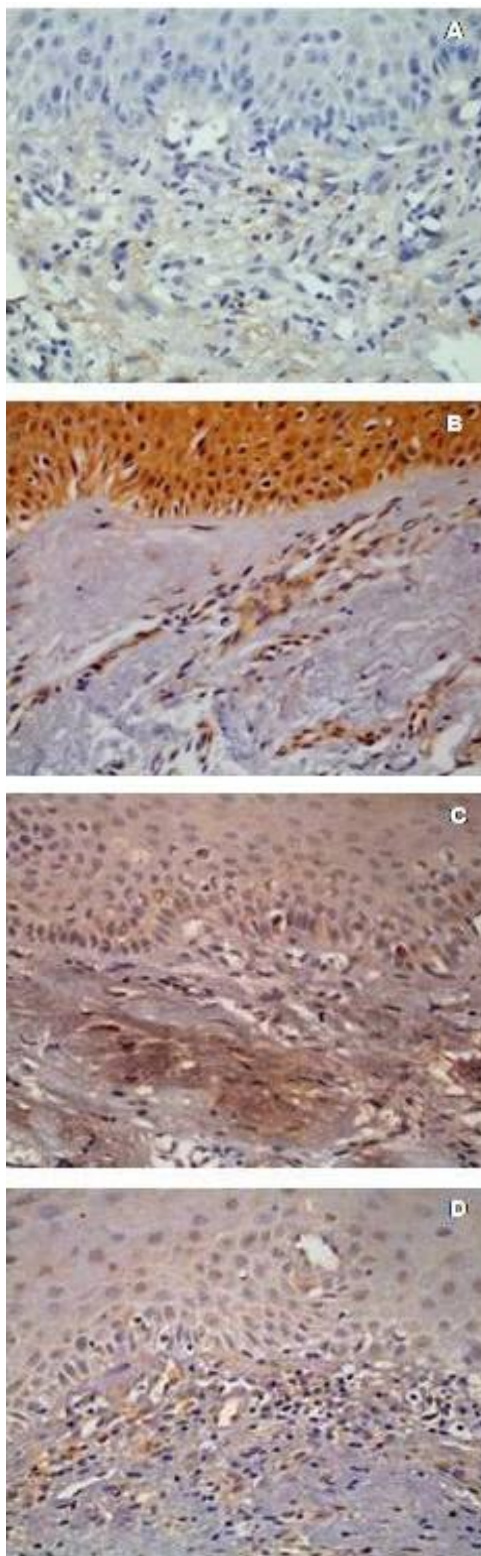


Figura 14 – Fotomicrografia - Grupo QA (aumento de 400x): A) expressão de MMP-2; B) expressão de MMP-9; C) expressão de TIMP-2; D) expressão de TIMP-1.

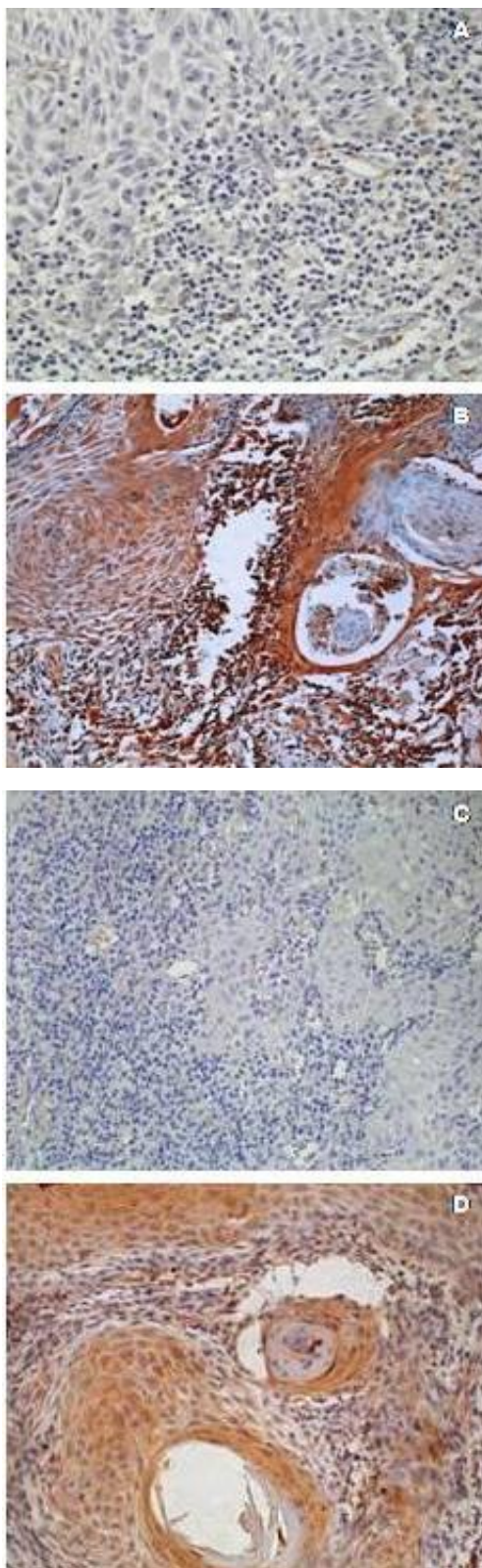


Figura 15 – Fotomicrografia - Grupo CELa (aumento de 200x): A) expressão de MMP-2; B) expressão de MMP-9; C) expressão de TIMP-2; D) expressão de TIMP-1.

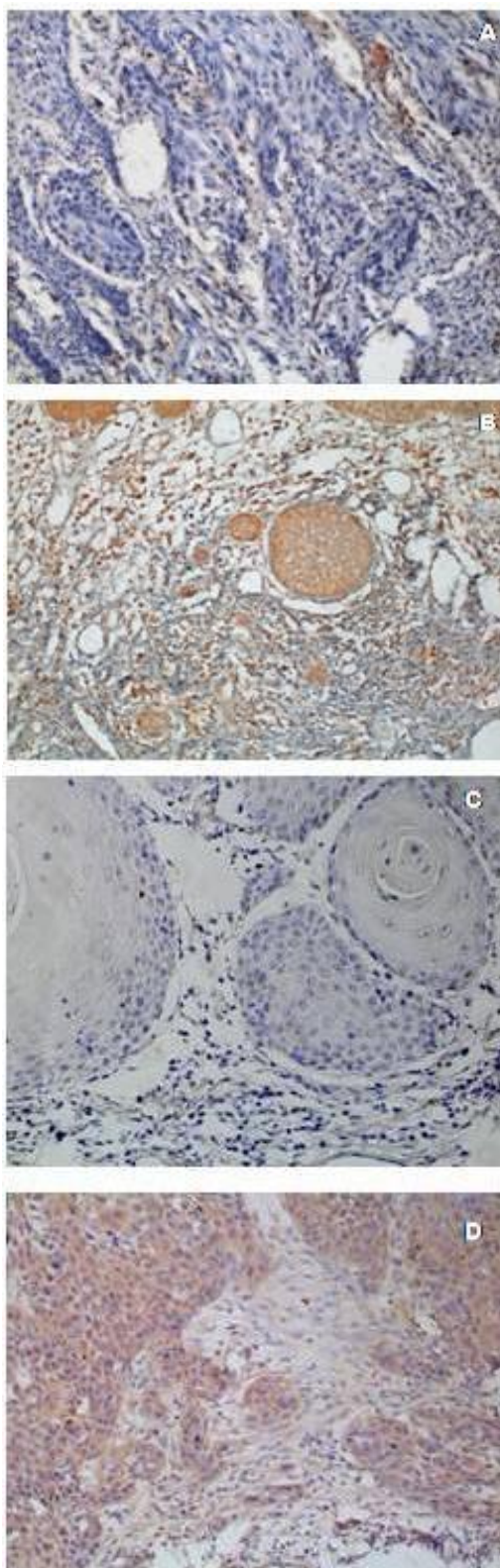


Figura 16 – Fotomicrografia - Grupo CELi (aumento de 200x): A) expressão de MMP-2; B) expressão de MMP-9; C) expressão de TIMP-2; D) expressão de TIMP-1

6 DISCUSSÃO

Alterações genéticas que causam desequilíbrios de regulação do crescimento podem levar à proliferação descontrolada, expansão do tumor primário e metástases. O fato desse crescimento não ser reprimido, segundo Liotta e Stetler-Stevenson (1991) não causam por si só os fenômenos de invasão e metástase, uma vez que este fenótipo mais agressivo exige alterações genéticas adicionais. Neste contexto, as metaloproteinases (MMP), devido ao seu papel na degradação dos elementos da matriz extracelular (MEC), mecanismo este conhecido por facilitar a invasão tumoral e levar a subsequente desenvolvimento de metástases, tornam-se um elemento chave na evolução do câncer.

Miranda (2002) observou imuno-histoquimicamente, em carcinomas epidermóides de lábio inferior e língua, que o colágeno IV e a laminina estavam praticamente ausentes na membrana basal peritumoral, na região do fronte invasivo, o que sugere atividade de enzimas proteolíticas.

Jordan et al. (2004) sugeriram que o nível de MMP-9 pode servir como um marcador de transformação maligna em displasias orais.

O trabalho de Freitas et al. (2011), é de grande interesse para nós, já que é um dos poucos, senão o único a avaliar a presença de MMP em lesões de QA. No que se refere à avaliação do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) frente a QA os trabalhos são ainda mais raros, porque não dizer pouco estudado. Neste mesmo estudo, Freitas et al., (2011) avaliaram a expressão de mastócitos (MC) e MMP-9 no carcinoma espinocelular e na queilite actínica. De acordo com estes autores, estímulos inflamatórios podem induzir a expressão de MMP-9 em várias células, como as células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e MC.

Nossos resultados concordam com essa afirmação no que se refere à expressão de MMP-9 na QA, já que mais de 60% da nossa amostra apresentou algum nível de marcação de MMP-9. Pode-se perceber que quando os grupos que estudamos foram avaliados entre si, a expressão de MMP-9 na QA quando comparada à expressão do mesmo anticorpo no grupo Controle mostra uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0097 < 0.05$), fato este que não se repete quando se compara a expressão de MMP-2 em QA com o grupo Controle ($p=0,7610 > 0.05$). A MMP-9 caracteriza-se ainda por ter tido fraca intensidade de expressão na maioria dos casos, porém percebe-se um expressivo aumento na quantidade das marcações com intensidade moderada e forte em comparação com a MMP-2.

A situação acima descrita pode ser explicada pelo fato de que a exposição prolongada à radiação UV permite que sejam ativadas as pró-MMPs, que induz a degradação da MEC (Pillai et al., 2005). Inomata et al., (2003) também relataram essa possível ligação entre a exposição à radiação UV e a degradação da membrana basal efetuada pelas gelatinases que são as MMP-2 e 9.

Ainda em relação à MMP-9 diversos estudos demonstram sua superexpressão em CE orais (Sutinem et al., 1998, Franchi et al., 2002; Impola et al., 2004, Jordan et al., 2004). Nossos estudos se alinham a esses resultados, já que embora não tenha havido significância estatística para os casos de QA, temos em mais de um terço da amostra (grupo QA e CE de lábio) expressão acima de 50% das células do epitélio da QA e do fronte de invasão/hot spot do CE de lábio.

Katayama et al. (2004) investigaram se a expressão de MMP-2 e MMP-9 tem valor preditivo para o curso clínico e prognóstico em estágios iniciais de CE oral. Tais autores utilizaram técnica imuno-histoquímica para avaliar a reatividade às gelatinases (MMP) de 53 espécimes dessas lesões. Os resultados indicaram que houve significante

correlação entre a expressão de MMP-9, mas não de MMP-2, com a ocorrência de metástase linfática ou à distância e com prognóstico pobre.

Em nosso estudo, no que se refere à MMP-2, pudemos perceber que nos casos onde houve sua expressão, esta se caracterizou por ser, em sua maioria, de intensidade fraca, tanto na QA como no CE de lábio e no CE de língua, havendo somente um caso de forte marcação em um espécime de CE de lábio.

Nos CE de língua obtivemos um índice de expressão menos significativo se comparada ao grupo CE de lábio e ao grupo de QA, o que contraria alguns trabalhos consultados (Yoshizaki et al., 2001, Barros et al., 2011, Mäkinen et al., 2012). No entanto, Korpi et al., (2008) estudando a expressão dos marcadores MMP-2, -7, -8, -9, -20 e -28, em quase noventa casos de CE de língua, afirmam ter encontrado evidências suficiente para associar apenas a MMP-8 aos índices de sobrevida de seus pacientes e que as demais MMP não demonstraram significância estatística na mesma situação.

Em um estudo sobre a degradação do colágeno tipo IV em CE de língua, Fan et al. (2012) perceberam que essa degradação estava intimamente relacionada com o aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9, e a conclusão do foi de que a MMP-9 possui uma função mais importante do que a MMP-2 durante o desenvolvimento do carcinoma.

Atribui-se ainda as MMP importante papel em processos fisiológicos, patológicos e comportamentos celulares, tais como angiogênese, proliferação celular, apoptose, efeitos sobre o sistema imunitário, modulação da bioatividade de quimiocinas e remodelação da MEC (Jordan et al., 2004; Arakaki et al., 2009). Entretanto em situações de normalidade e/ou em tecidos adultos, seus níveis geralmente encontram-se baixos ou mesmo não podem ser detectados (Barros et al., 2011).

Embora as MMP sejam classificadas com base na sua afinidade por substratos, encontramos certa sobreposição entre as

subclasses, em termos de suas afinidades, estabelecendo-se, portanto, uma não especificidade funcional, o que significa que as MMP não possuem necessariamente um único substrato definido. Esta promiscuidade pode ainda ter incremento em processos patogênicos como em um processo de invasão tumoral. Além disso, as atividades das MMP interferem umas com as outras na medida em que muitas delas podem ativar outras pro-enzimas o que sugere que a ativação controlada das mesmas pode envolver uma cascata, englobando diferentes membros da família das MMP (Cawston, 1998). Em nosso trabalho pode-se supor que tenha ocorrido esta promiscuidade funcional, isso porque houve ação da TIMP-1 sobre a MMP-2 e da TIMP-2 sobre a MMP-9, mecanismo que não é tão usual quanto à relação MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1.

Como descritos anteriormente a literatura nos informa que níveis das MMP nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis, entretanto, sua expressão apresenta-se substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas, apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase (Pereira et al., 2006, Kondratiev et al., 2008).

Pode-se dizer que comprovamos, mesmo que parcialmente, tal fato, visto que a expressão das MMP foi praticamente inexistente no grupo Controle e este representava o epitélio de indivíduos com pouca ou nenhuma alteração inflamatória degenerativa do colágeno IV.

A atividade das MMP é regulada por expressão gênica através da ativação da pró-enzima e pela TIMP que inativa a MMP. Um aspecto relevante da dinâmica do funcionamento das MMP na fisiopatologia tumoral é que sua expressão pode ocorrer tanto em células neoplásicas quanto em células estromais e endoteliais peritumorais (McCawley, Matrisian, 2001). Estas últimas, provavelmente, receberiam sinais bioquímicos originados do tumor, como fatores de crescimento e citocinas (Uria et al, 1997).

Altos níveis de TIMP-1 encontrados em fragmentos de tecidos tumorais têm sido associados a um mau prognóstico. Sekhon, (2010), por exemplo, descreve esse comportamento da TIMP-1 em pacientes com câncer de mama primário. De acordo com esses dados, podemos presumir que o baixo nível de expressão de TIMP-1 observado na amostra dos grupos que estudamos, pode estar associado a um bom prognóstico.

Nagel et al., (2004) nos explicam que a TIMP-1 possui potencial para estimular a proliferação celular. Gray et al., (1992) descreveram que em CE oral e em lesões displásicas há baixa/insignificante expressão do gene TIMP-1. Em nossa pesquisa também verificamos baixos níveis de expressão de TIMP-1.

Vicente et al., (2005) relata em seu estudo que avaliou a expressão de TIMP em CE orais que a expressão de TIMP-1 não se correlacionou com os parâmetros clínicos e patológicos. No entanto a expressão de TIMP-2 foi significativamente correlacionada com o tamanho dos tumores, mas não encontrou também correlação com o grau histológico dessas lesões.

Culhaci et al. (2011) estudou a expressão de MMP-13 e TIMP-1 em CE da cabeça e pescoço e encontrou aumento da expressão de desses marcadores em tumores altamente invasivos, porem não houve relação significativa entre essa expressão e idade, sexo, local do tumor e grau histológico. Além disso, os níveis de coloração para a MMP-13 não se correlacionaram com os níveis de coloração de TIMP-1, os levando a concluir que a expressão da MMP-13 e TIMP-1 parecem desempenhar um papel importante na determinação da capacidade invasiva do CE de cabeça e pescoço. E que, o equilíbrio entre a expressão de MMP e de TIMP não tem importância para a invasão do tumor tanto quanto a super expressão. Em nossa pesquisa não tínhamos informações suficientes para averiguar o modo de invasão tumoral e correlacionar com o grau histológico.

A maioria dos trabalhos consultados correlaciona a expressão dos marcadores com o modo de invasão tumoral ou com estadiamento do tumor. Yoshizaki et al. (2001), por exemplo correlaciona a expressão dos marcadores em estudo com metástase em linfonodos cervicais e o estadiamento clínico da lesão. Considerando a correlação da alta expressão de MMP-2 a pacientes com metástase em linfonodos cervicais positiva e estagio clinico avançado.

Em nosso trabalho, a correlação da intensidade da marcação com o grau histológico nas lesões de CE e QA encontramos expressão de moderada a intensa para MMP-9, principalmente nos casos de displasias moderada e severa. Para os CE de lábio pudemos notar que o marcador MMP-9 aparece na displasia bem diferenciada com intensidade tendendo a moderada. Para os CE de língua notamos a ocorrência da quase totalidade de intensidade fraca em todos os marcadores.

Por fim no que se refere às TIMP não pudemos ver nenhuma correlação entre sua expressão e a intensidade para todos os marcadores, talvez possamos entender esse resultado como positivo do ponto de vista de valor prognóstico, já que geralmente, de acordo com a literatura consultada (Brehmer et al., 2003; Sekhon, 2010), altos valores de TIMP estão associados a piores prognósticos.

Porém a literatura sobre as TIMP ainda é muito controversa e mais estudos devem ser feitos a fim de que o papel desses inibidores seja melhor esclarecido.

7 CONCLUSÃO

Tanto a MMP-2 quanto seu regulador TIMP-2 estavam subexpressos na QA, no CE de lábio e no CE de língua. O principal regulador da MMP-9, a TIMP-1, também demonstrou subexpressão nas lesões estudadas.

Em relação a MMP-9 foi observada expressão na QA e no CE lábio, mesmo que estatisticamente esta não tenha sido significativa. Em comparação com o grupo Controle, a QA teve expressão significativa e isso pode demonstrar um reforço na sinalização de que na Queilite Actínica há de fato um danoso comprometimento da matriz extracelular.

8 REFERÊNCIAS*

Abreu MAMM, Silva OMP, Pimentel DRN, Hirata CHW, Weckx LLM, Alchorne MMA et al. Queilite actínica adjacente ao carcinoma espinocelular do lábio como indicador de prognóstico. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006;72(6):767-71.

Agra IMG. Recidiva local de carcinomas epidermóides da boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas e de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos à cirurgia de resgate [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, USP - Universidade de São Paulo; 2007.

Alberts B. Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre: Artes Médicas; 2004.

Araújo CP, Barros AC, Soares de Lima AA, Azevedo RA, Ramalho L, Santos JN. Estudo histológico e histoquímico da elastose solar em lesões de queilite actínica. Rev Ciênc Méd Biol. 2007;6(2):152-9.

Araújo Júnior RF, Freitas ML, Lima ICSM, Emiliano GBG, Araújo RM, Ramos CCO. Aspectos Histoquímicos da Membrana Basal Associados a Variáveis Clínicas em Carcinoma Epidermoide Oral Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2009;9(2):223 -7.

Arakaki PA, Marques MR, Santos MCLG. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. J Biosci. 2009;34(2):313-20.

Ayres S. Chronic actinic cheilitis. J Am Med Assoc. 1923;81(14):483-6.

Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Semin Cell Dev Bio. 2002;13(5):377- 83.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;1(115):3719-27.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sindransky D. World Health Organization classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Barros SSLV, Henriques ACG, Pereira KMA, Medeiros AMC, Galvão HC, Freitas RA. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Arch Oral Biol.* 2011;56(8):752-60.

Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RDCG, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):74-9.

Bauer SM, Bauer RJ, Liu ZJ, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC. Vascular endothelial growth factor-c promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. *J Vas Surg.* 2005;41(4):699-707.

Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician.* 2003;49:1111-6.

Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. Diseases of the bucal mucosa and the lips. In: Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. Malignant tumors. Germany: WB Saunders; 1993.

Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2003;6(3):217-22.

Brew K, Dinakarpadian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1):267-83.

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial Collagenases as Markers of Tumor Progression. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4823-30.

Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Wound healing. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2007;20(1):51-8.

Cataldo LE, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981;7(12):989-90.

Cavalcante ASR, Anbider AL, Carvalho YR. Actinic cheilits: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(3):498-503.

Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today.* 1998;4(3):130-7.

Ch'ng S, Wallis AR, Yuan L, Davis FP, Tan TS. Mast cell and cutaneous malignancies. *Mod Pathol.* 2006;19(1):149-59.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol.* 2009;55(2):165-74.

Concha HAR. Papel das metaloproteínas de matriz nas alterações da barreira hematoencefálica em ratos submetidos à sepse severa. [dissertação]. Criciúma (SC): Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC; 2010.

Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer.* 2004;4(1):42.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *Europ J Cancer.* 2000;36(13):1621-30.

Diehl ES. A Expressão Imunoistoquímica das Metaloproteínas de Matriz 2 e 9 no Melanoma Cutâneo Primário [dissertação]. RS: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRG; 2007.

Docherty AJP, Murphy G. The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(1):469-79.

Fan HX, Li HX, Chen D, Gao ZX, Zheng JH. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and CollIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):90.

Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. (2004). 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 the Head and Neck. *Cancer.* 2002;95(9):1902-10.

Freitas VS, Santos PPA, Freitas RA, Pinto LP, Souza LB. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(3):342-8.

Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Modern Pathology.* 2004;17(5):496–502.

Giannelli G, Pozzi A, Stetler-Stevenson WG, Gardner HA, Quaranta V. Expression of Matrix Metalloprotease-2-Cleaved Laminin-5 in Breast Remodeling Stimulated by Sex Steroids. *Am J Pathol.*1999;154:1193-201.

Girard KR, Hoffman BL, Viejo M. Actinic cheilitis: report of case. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Radiol Endod.* 1980;50(1):21-4.

Gomez DE. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111-22.

Gray ST, Wilkins, RJ, Yunt K. Interstitial Collagenase Gene Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol.* 1992;141 (2):301-6.

Grimbaldeston MA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochem Photobiol Sci.* 2006 Feb;5(2):177-83. Review.

Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsay M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol.* 2007;8(10):1095-104.

Henriet P, Declerck YA, Blavier L. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS.* 1999;107(1):111-9.

Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen T, Lee S, Furukawa M. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2000;89(4):715-23.

Ibsen OAC, Phelan JA. *Oral Pathology for the dental higienist.* Philadelphia: W B Saundes; 1996.

Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H et al. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol.* 2004; 202(1):14-22.

Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K, Kobayash K, Tsunenaga M. Possible Involvement of Gelatinases in Basement Membrane Damage and Wrinkle Formation in Chronically Ultraviolet B-exposed Hairless Mouse. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):128-34.

Jordan RCK, Macabeo-Ong M, Shiboski CH, Dekker N, Ginzinger DG, Wong DTW et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA Is associated with progression of oral dysplasia to cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6460–5.

Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):634-40.

Kaugars G, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Radiol Endod.* 1999;88(2):181-6.

Kleemann RU, Krockner D, Cedraro A, Tuischer J, Duda, GN. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(11):958-63.

Kondratiev S, Douglas R, Gnepp DR, Yakirevich E, Sabo E, Annino DJ, et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. *Hum Pathol.* 2008;39(3):337-43.

Korpi JT, Kervinen V, Mäklin H, Väänänen A, Lahtinen M, Läärä E, et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer.* 2008;98(4):766-75.

Krunic ML, Garrod DR, Madani S, Buchanan MD, Clark RE. Immunohistochemical staining for desmogleins and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Cancer.* 1998;77(8):1275-9.

Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. 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.

Laskaris G. Atlas colorido de doenças da boca. In: Laskaris G. Neoplasias malignas. Sao Paulo: Artes Medicas; 2004.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res (Suppl)*. 1991; 51(18):5054s-9s.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980;284:67-8.

Lundeen RC, Langlais RP, Terezhalmay GT: Sunscreen protection for lip mucosa: a review and update. *J Am Dent Assoc*. 1985;111(4):617-2.

Main JHP, Pavone M. Actinic cheilits and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994; 60(2):113-6.

Mäkinen LK, Häyry V, Atula T, Haglund C, Keski-Säntti H, Leivo I, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, -8, -9, and -13 in oral tongue cancer. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(5):394–9.

McCawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression: Defining the soil round the tumor seed. *Current Biology*. 2001;11(1):25-7.

Miranda JL. Expressão de proteínas da matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua [tese]. Natal (RN): Faculdade de Odontologia: UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2002.

Moore SR, Jonhson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and etiology. *Bucal Dis*. 1999;5(3):185-95.

Murphy AN. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*.1993;157(2):351-8.

Nabeschima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int*. 2002;52(4):255–64.

Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology*. 2004;44:222–31.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(4):233-8.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. 2007;8(3):221-33.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB et al. 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 MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. Rev Bras Cancerol. 2006;52(3):257-62.

Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. Int J Cosmet Sci. 2005;27(1):17-34.

Pontes HAR, Aguiar MCF, Mesquita RA, Pontes FSC, Silveira Júnior JB. Immunodetection of repair protein hMSH2 in actinic cheilitis and normal labial mucosa. Rev Bras Cancerol. 2005;51(1):23-30.

Reiss MLV. Revisão das metaloproteinases envolvidas em processos tumorais. Rio de Janeiro: Centro Municipal de Saúde Américo Veloso; 2002.

Rezende CEB, Souto RP, Rapoport PB, Campos L, Generato MB. Cholesteatoma gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by RT-PCR. Braz J Otorhinolaryngol. 2012;78(3):116-21.

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

Robinson JK. Actinic cheilitis: a prospective study comparing four treatment methods. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1989;115(7):848-52.

Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. Biochim Biophys Acta. 2010;1803(1):39–54.

Santos JN, de Souza SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. J Cutan Pathol. 2003;30(4):237-42.

Scheinberg RS. Carbon dioxide laser treatment of actinic cheilitis. *West J Med.* 1992;156(2):192-3.

Seabra FRG. Análise imunohistoquímica das metaloproteínas da matriz (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) na doença periodontal [tese]. Natal (RN): Faculdade de Odontologia: UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2006.

Sekhon BS. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res Rep Biol.* 2010;(1):1-20.

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

Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Biol.* 2000;10(6):415-33.

Stanley RJ, Roenigk RK. Actinic cheilitis: treatment of the carbon dioxide laser. *Mayo Clin Proc.* 1988;63(3):230-5.

Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Ananthanarayan V, Munshi HG. Transforming growth factor- β 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression. *Mol Cancer Res.* 2008;6(1):10-20.

Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 1998;77(12):2239-45.

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999;35(3):227-33.

Uría JA, Stahle-Backdahl M, Seiki O, Fueyo, A, Lopez-Otin C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res.* 1997;57(21):4882-8.



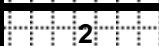
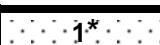




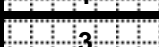
Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernández Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41(3):283-93.

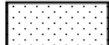
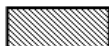


Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.

Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)*. 2001;95(1):44–50.

APÊNDICE A - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em QA (1)

Quadro 3 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referentes à classificação leve (OMS) em QA

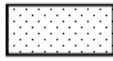

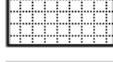


QA	Classificação leve	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
9112	L	0	0	 3***	0
9825	L	1	1	0	0
10241	L	0	0	 3	0
10263	L	0	0	 2	1
10519	L	 1*	0	 3	0
10760	L	0	0	 1	0
10891	L	0	0	 1	0
10935	L	0	 1**	 3	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE B - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/ TIMP-1 em QA (2)

Quadro 4 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/ TIMP-1 referentes à classificação moderada (OMS) em QA

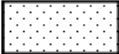



QA	Classificação moderada	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
8169	M	0	0	1	2 ****
9688	M	0	0	2 ***	1
9696	M	0	0	3	0
9817	M	0	0	1	1
9887	M	0	0	3	1
9976	M	1*	0	1	0
10047	M	0	0	0	3
10359	M	0	0	0	0
10480	M	0	0	3	0
10530	M	0	0	0	1
10661	M	0	0	2	2
10825	M	1	0	0	0
10856	M	0	0	0	3
10890	M	0	0	0	3
10906	M	0	0	3	1
10926	M	1	1	0	1
10946	M	0	1**	0	2
11117	M	0	1	2	0
11149	M	0	0	1	2
11222	M	0	1	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE C - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em QA (3)

Quadro 5 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referentes à classificação severa (OMS) em QA






QA	Classificação severa	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
9729	S	0	0	2	2
9862	S	1	1	0	0
9888	S	1*	0	0	0
10034	S	3	0	2***	0
10457	S	0	0	1	0
10759	S	0	1**	3	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE D - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Ce de lábio (1)

Quadro 6 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao CE de lábio bem diferenciado (OMS)

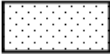


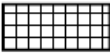

Ce de lábio	Classificação: Bem diferenciado	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
3836	B	0	0	1***	0
7382	B	0	0	0	0
7869	B	0	0	0	0
7880A	B	0	2**	3	2
9107	B	0	1	0	3****
9108	B	0	0	2	2
9294	B	0	0	0	0
9409	B	0	1	0	0
9592	B	0	1	0	3
9895	B	3*	0	3	3
9950	B	0	0	3	3
9956	B	0	0	0	0
10253	B	1	0	3	1
10441	B	0	0	0	3
10501	B	1	0	0	1
10505	B	0	0	0	3
10697	B	1	0	3	2
10972	B	1	0	0	0
11082	B	2	0	3	2
11213	B	2	0	3	2
11815	B	1	1	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE E - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1e, Ce de lábio (2)


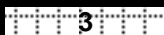

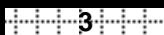

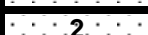
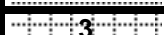
Quadro 7 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao CE de lábio moderadamente diferenciado (OMS)


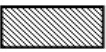


Ce de lábio	Classificação: Moderadamente diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
6581	M	0	0	0	1****
7104	M	0	0	2***	0
8476	M	0	0	0	0
9545	M	1*	0	1	1
10881	M	0	1**	0	1
10904	M	0	1	0	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE F - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Ce de lábio (3)

Quadro 8 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao CE de lábio pouco diferenciado (OMS)

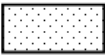

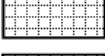


Ce de lábio	Classificação: Pouco Diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
7625	P	0	0	 3***	0
8369	P	0	0	 3	1
9732	P	0	 1**	 3	2
10503	P	 2*	0	0	0
11210	p	 2	1	 3	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE G - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Ce de língua (1)

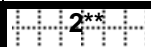


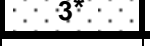
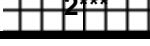


Quadro 9 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao Ce de língua bem diferenciado (OMS)





Ce de língua	Classificação: Bem diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
4657	B	1*	0	1***	0
4721	B	0	0	3	3
5630	B	1	0	3	0
7069	B	0	1**	0	0
7236	B	0	0	2	1
7338	B	0	0	0	0
7398	B	0	0	0	1****
7640	B	0	0	0	0
7849	B	0	0	2	0
8265	B	0	0	1	3
8543	B	2	0	0	0
8947	B	0	0	1	0
9700	B	0	0	0	1
10077	B	0	0	0	1
10414	B	0	0	0	1
10532	B	0	1	0	0
10708	B	0	0	0	0
10734	B	0	0	0	0
10852	B	0	0	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE H - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Ce de língua (2)

Quadro 10 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao Ce de língua moderadamente diferenciado (OMS)


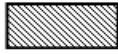
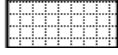

Ce de língua	Classificação: Moderadamente diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
6039	M	0	0	 2**	0
6943	M	0	0	 2	0
8870	M	0	0	 1	0
8879	M	 3*	0	0	 2***
9294	M	0	0	 3	0
9863	M	0	0	0	0
10592	M	0	0	0	0
10727	M	0	0	0	0
10882	M	0	0	0	0
10939	M	0	0	 2	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ***  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE I - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Ce de língua (3)

Quadro 11 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao Ce e língua pouco diferenciado (OMS)



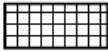

Ce de língua	Classificação: Pouco Diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
2955	P	0	0	0	0
3751	P	1	1	1***	0
6593	P	1*	0	1	0
7313	P	1	0	1	0
9352	p	0	1**	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE J - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em Controle (1)

Quadro 11 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 referente ao grupo Controle

Controle	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
6758	0	0	1	1
7206	0	0	0	2***
7939	1*	0	0	0
7949	0	0	0	0
7950	0	0	0	0
8019	0	0	0	0
8067	0	0	0	0
8815	0	0	0	0
8835	0	0	3**	0
8853	1	0	0	0
8864	1	0	3	0
9310	0	0	0	0
9348	0	0	0	0
10236	0	0	0	0
10251	0	0	0	0
10264	0	0	0	2

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ***  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE L - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em QA (1)

Quadro 12 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 referente classificação leve (OMS) em QA






QA	Classificação leve	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
9112	L	0	0	3***	0
9825	L	1*	0	0	1****
10241	L	0	0	3	0
10263	L	0	1**	3	0
10519	L	1	0	3	0
10760	L	0	0	1	0
10891	L	0	0	1	0
10935	L	0	0	3	1

- * Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- ** Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- *** Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- **** Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
- Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE M - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em QA (2)

Quadro 13 - Complexos MMP-2/TIMP-1-e MMP-9/TIMP-2 classificação moderada (OMS) em QA

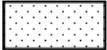

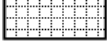


QA	Classificação moderada	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
8169	M	0	2**	1***	0
9688	M	0	1	2	0
9696	M	0	0	3	0
9817	M	0	1	1	0
9887	M	0	1	3	0
9976	M	1*	0	1	0
10047	M	0	3	0	0
10359	M	0	0	0	0
10480	M	0	0	3	0
10530	M	0	1	0	0
10661	M	0	2	2	0
10825	M	1	0	0	0
10856	M	0	3	0	0
10890	M	0	3	0	0
10906	M	0	1	3	0
10926	M	1	1	0	1****
10946	M	0	2	0	1
11117	M	0	0	2	1
11149	M	0	2	1	0
11222	M	0	0	0	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE N - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em QA (3)

Quadro 14 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 classificação severa (OMS) em QA






QA	Classificação severa	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
9729	S	0	2**	2***	0
9862	S	1*	0	0	1****
9888	S	1	0	0	0
10034	S	3	0	2	0
10457	S	0	0	1	0
10759	S	0	0	3	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE O - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Lábio (1)

Quadro 15 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 referente ao Ce de lábio bem diferenciado (OMS)




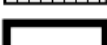
Ce de lábio	Classificação: Bem diferenciado	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
3836	B	0	0	1***	0
7382	B	0	0	0	0
7869	B	0	0	0	0
7880A	B	0	2**	3	2
9107	B	0	3	0	1***
9108	B	0	2	2	0
9294	B	0	0	0	0
9409	B	0	0	0	1
9592	B	0	3	0	1
9895	B	3	3	3	0
9950	B	0	3	3	0
9956	B	0	0	0	0
10253	B	1	1	3	0
10441	B	0	3	0	0
10501	B	1	1	0	0
10505	B	0	3	0	0
10697	B	1	2	3	0
10972	B	1*	0	0	0
11082	B	2	2	3	0
11213	B	2	2	3	0
11815	B	1	0	0	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE P - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Lábio (2)

Quadro 16 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 referente ao Ce de lábio moderadamente diferenciado (OMS)





Ce de lábio	Classificação: Moderadamente diferenciados	MMP-2	TIMP-2	MMP-9	TIMP-1
6581	M	0	1*	0	0
7104	M	0	0	2**	0
8476	M	0	0	0	0
9545	M	1	1	1	0
10881	M	0	1	0	1***
10904	M	0	1	0	1

- *  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- **  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ***  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE Q - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Lábio (3)

Quadro 17 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 referente ao Ce de lábio pouco diferenciado (OMS)






Ce de lábio	Classificação: Pouco Diferenciados	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
7625	P	0	0	3***	0
8369	P	0	1**	3	0
9732	P	0	2	3	1
10503	P	2*	0	0	0
11210	p	2	1	3	1

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE R - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Língua (1)

Quadro 18 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 referente ao Ce de língua bem diferenciado (OMS)

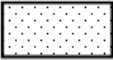

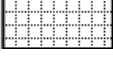

Ce de língua	Classificação: Bem diferenciados	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
4657	B	1*	0	1***	0
4721	B	0	3**	3	0
5630	B	1	0	3	0
7069	B	0	0	0	1
7236	B	0	1	2	0
7338	B	0	0	0	0
7398	B	0	1	0	0
7640	B	0	0	0	0
7849	B	0	0	2	0
8265	B	0	3	1	0
8543	B	2	0	0	0
8947	B	0	0	1	0
9700	B	0	1	0	0
10077	B	0	1	0	0
10414	B	0	1	0	0
10532	B	0	0	0	1****
10708	B	0	0	0	0
10734	B	0	0	0	0
10852	B	0	0	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- ****  Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE S - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Língua (2)

Quadro 19 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 2 referente ao Ce de língua moderadamente diferenciado (OMS)

Ce de língua	Classificação: Moderadamente diferenciados	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
6039	M	0	0	2 ^{***}	0
6943	M	0	0	2	0
8870	M	0	0	1	0
8879	M	3 [*]	2	0	0
9294	M	0	0	3	0
9863	M	0	0	0	0
10592	M	0	0	0	0
10727	M	0	0	0	0
10882	M	0	0	0	0
10939	M	0	1 ^{**}	2	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE T - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Ce de Língua (3)

Quadro 20 - Complexos MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 2 referente ao Ce de língua pouco diferenciado (OMS)

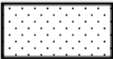
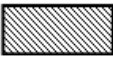


Ce de língua	Classificação: Pouco Diferenciados	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
2955	P	0	0	0	0
3751	P	1*	0	1	1
6593	P	1	0	1**	0
7313	P	1	0	1	0
9352	p	0	0	0	1***

- * Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- ** Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
- *** Ação do inibidor TIMP-1 sobre a enzima
- Borda destacada demonstra possível formação do complexo

APÊNDICE U - Painel demonstrativo dos escores considerando os complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 em Controle (1)

Quadro 21 - Complexos MMP-2/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 2 referente ao grupo Controle

Controle	MMP-2	TIMP-1	MMP-9	TIMP-2
6758	0	1**	1***	0
7206	0	2	0	0
7939	1*	0	0	0
7949	0	0	0	0
7950	0	0	0	0
8019	0	0	0	0
8067	0	0	0	0
8815	0	0	0	0
8835	0	0	3	0
8853	1	0	0	0
8864	1	0	3	0
9310	0	0	0	0
9348	0	0	0	0
10236	0	0	0	0
10251	0	0	0	0
10264	0	2	0	0

- *  Ação da enzima MMP-2 sobre o inibidor
- **  Ação do inibidor TIMP-2 sobre a enzima.
- ***  Ação da enzima MMP-9 sobre o inibidor
-  Borda destacada demonstra possível formação do complexo

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janete@fojce.unesp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **001/2011-PH/CEP**, sobre “**Estudo imunoistoquímico da queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio e carcinoma epidermóide intrabucal**”, sob a responsabilidade de **ANA SUELI RODRIGUES CAVALCANTE**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 22 de fevereiro de 2011.



Profa. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora