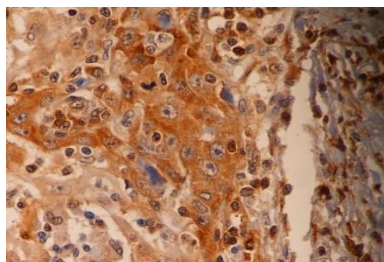
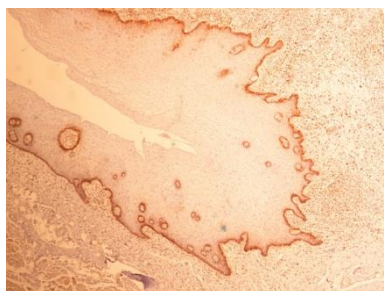
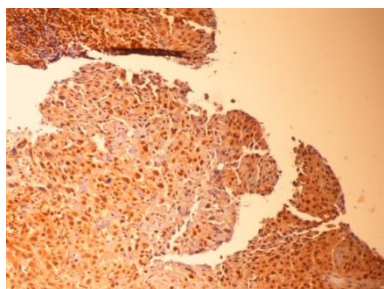


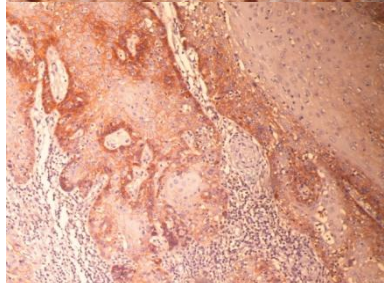
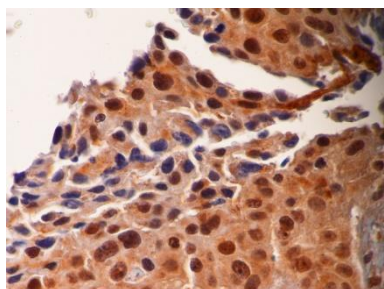
Avaliação da expressão do RKIP e CD147 em carcinomas da cavidade oral



Maria Teresa Barreira Capela



Dissertação de Mestrado em Oncologia



2011

Maria Teresa Barreira Capela

Avaliação da expressão do RKIP e CD147 em carcinomas da cavidade oral.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Lúcio José de Lara Santos.

Categoria – Doutoramento

Afiliações – Instituto Português de Oncologia; Instituto Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto; Universidade Fernando Pessoa.

Co-orientador – Mestre Maria do Céu Costa.

Categoria – Mestre

Afiliação – Universidade Fernando Pessoa

O meu agradecimento:

- Ao professor Doutor Lúcio Santos, por me ter dado a oportunidade de trabalhar com ele, por todos os ensinamentos que me transmitiu e pela paciência que teve comigo.
- À minha co-orientadora, mestre Céu Costa, pelo apoio que me deu durante todo o trabalho, pela aprendizagem das técnicas laboratoriais e pela sua disponibilidade para me ajudar.
- Ao Dr. Manuel Jácome, pelo auxílio com as amostras utilizadas.
- Ao Prof. Dr. Rui Manuel Reis, da Universidade do Minho, pelo auxílio no trabalho realizado.
- À Universidade Fernando Pessoa por conceder o espaço para a realização deste trabalho.
- Ao IPO pela disponibilização das amostras e processos utilizados na realização deste trabalho.
- À Catarina, minha colega inseparável do laboratório, não só por toda a ajuda neste trabalho mas também por todo o apoio, pela paciência, por todas as brincadeiras, cantorias, e bons momentos que me proporcionou, tornando sempre o ambiente de trabalho muito animado e prazeroso.
- Ao técnico Ricardo, da Universidade Fernando Pessoa, pela ajuda que me deu com o material necessário para a execução da parte laboratorial.
- À D. Alcinda, mãe da Catarina, pela valiosa ajuda concedida e pela sua simpatia.
- Às minhas colegas de casa preferidas, Rita, Armanda, Catarina e Filipa, pelo apoio, pela amizade e por me tirarem de casa para momentos de descontração.

Agradecimentos

- Aos colegas do mestrado, em especial à Sofia e ao Hernâni, por todos os momentos de convívio, brincadeiras e de força para a continuação do trabalho.
- Aos meus pais, pelo apoio em todas as decisões que tomei. Sem eles nada disto seria possível.

ADH3 – *Alcohol Dehydrogenase Type 3*

Akt – *Protein kinase B*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

CD147 – *Cluster of differentiation 147*

Cdc25 – *Cell division cycle 25*

EGFR – *Receptor do factor de crescimento epidérmico*

EMMPRIN- *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*

EMT- *Epithelial to Mesenchymal Transition*

ERK- *Extracellular signal-regulated kinase*

FAK- *Focal Adhesion Kinase*

GDP- *Guanosine diphosphate*

GPCR – *G protein-coupled receptor*

GRK2 – *G protein-coupled receptor kinase 2*

GTP- *Guanosine triphosphate*

HSP – *Heat shock protein*

JAK – *Janus kinase*

MAP – *Mitogen-activated protein*

MAPK- *Mitogen-activated protein kinase*

MAPKK- *MAP Kinase Kinase*

MCT – *Monocarboxylate transporter*

MEC – *Extracellular matrix*

MEK- *Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase*

MHC – *Major histocompatibility complex*

MMPs- *Matrix Metalloproteinases*

NF- κ B – *Nuclear factor κ B*

PASW Statistics- *Predictive Analytics SoftWare*

PBS – *Phosphate buffered saline*

PEBP- *PhosphatidylEthanolamine-Binding Protein*

PKC – *Protein kinase C*

PP2A – *Protein phosphatase 2*

RAF- *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RAS – *Rat sarcoma virus*

RKIP- *Raf Kinase Inhibitory Protein*

TCSF – *Tumor collagenase stimulatory factor*

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor.*

Introdução.....	XI
1.1. Cavidade oral:	14
1.2. Epidemiologia:	16
1.3. Factores de risco:	17
1.3.1. <i>Factores genéticos:</i>	18
1.3.2. <i>Infecção:</i>	18
1.3.3. <i>Pré-neoplasia:</i>	18
1.3.4. <i>Tabaco:</i>	19
1.3.5. <i>Mutações:</i>	19
1.4. Carcinoma da cavidade oral:	20
1.4.1. <i>Patologia:</i>	20
1.4.2. <i>Sintomas:</i>	21
1.4.3. <i>Morfologia:</i>	22
1.4.4. <i>Métodos de diagnóstico:</i>	22
1.4.5. <i>Estadiamento:</i>	22
1.4.6. <i>Tratamento:</i>	23
1.4.7. <i>Características clínicas:</i>	23
1.4.8. <i>Importância do diagnóstico precoce:</i>	25
1.5. Biomarcadores com potencial de diagnóstico:	26
1.6. Via de sinalização MAPKKK ou RAS-RAF-MEK-ERK:	27
1.6.1. <i>Modo de actuação:</i>	28
1.6.2. <i>Genes Raf:</i>	28
1.6.3. <i>Gene MEK:</i>	29
1.6.4. <i>Gene ERK:</i>	29
1.7. RKIP, proteína inibitória da cinase Raf :	30
1.7.1. <i>Funções:</i>	31
1.7.2. <i>Papel no cancro:</i>	31
1.7.3. <i>Papel na metastização:</i>	32
1.8. CD147:	34
1.8.1. <i>Funções:</i>	34
1.8.2. <i>Papel no cancro e na metastização:</i>	37
Objectivos.....	40

2.1. Objectivo gerais:	42
2.2. Objectivos específicos:	42
3.1. Variáveis de estudo:.....	46
3.2. Definição das variáveis de estudo:	46
3.3. Material e Métodos:.....	47
3.3.1. <i>Anticorpos</i> :.....	47
3.3.2. <i>Metodologia</i> :.....	47
3.3.3. <i>Avaliação e quantificação da imunoreactividade</i> :	48
3.3.4. <i>Análise estatística</i> :	49
Resultados.....	50
4.1. Significado de prognóstico das variáveis clínico-patológicas:.....	52
4.2. Expressão do RKIP no tumor e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:	54
4.3. Significado de prognóstico da expressão de RKIP no tumor:	56
4.4. Expressão do RKIP na frente de invasão e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:.....	57
4.5. Significado de prognóstico para a expressão de RKIP na frente de invasão:	59
4.6. Correlação entre expressão do RKIP na frente de invasão e no tumor	61
4.7. Expressão do CD147 e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:	62
4.8. Significado de prognóstico da expressão de CD147:	64
4.9. Correlação entre expressão do CD147 e a expressão do RKIP na frente de invasão e no tumor:.....	65
Discussão	66
Conclusão	72
Referências	76
Anexos	92
Anexo I	94
Anexo II	96

O carcinoma da cavidade oral é 15º tipo de cancro mais frequente a nível mundial. Os hábitos tabágicos e o consumo de álcool representam os factores etiológicos mais importantes. Este tipo de tumores afecta predominantemente homens acima dos 45 anos e nos últimos anos a sobrevivência global tem-se mantido na ordem dos 56%. Devendo-se este número a um diagnóstico tardio da doença.

O prognóstico nestes tumores parece estar relacionado com o estágio em que se encontra e com a invasão linfática regional. Dando ênfase à importância do estabelecimento de um diagnóstico precoce nas primeiras fases da doença.

O RKIP, responsável pela inibição da cinase Raf, actua como modulador de diferentes vias de sinalização. Esta molécula está envolvida em diferentes actividades fisiológicas incluindo a reprodução e actividade neural, actuando também como modelador da apoptose e da metastização, por regulação das vias de sinalização MAPK, receptores da proteína G e via do NF- κ B. Muitas das vias de sinalização em que o RKIP está envolvido estão habitualmente desreguladas em tumores, daí que se propõe um papel do RKIP na progressão tumoral.

O CD147, também chamado de indutor da matriz extracelular de metaloproteínases (EMMPRIN), é uma proteína transmembranar que tal como o nome indica é responsável pela indução da produção de várias metaloproteínases. Devido a esta capacidade, a EMMPRIN é uma candidata à regulação, a montante, de várias doenças incluindo tumores e doenças inflamatórias.

Há já alguns anos foi reconhecido que a EMMPRIN é um importante modulador da troca de informação no estroma tumoral sendo responsável por promover a sua formação. Vários grupos têm alertado que o CD147 se encontra sobreexpresso numa variedade de tumores humanos e que esta sobreexpressão está correlacionada com um comportamento clinicamente agressivo e com a sobrevivência dos doentes.

Neste sentido, pretendeu-se estudar a expressão destas duas proteínas em carcinoma da cavidade oral e correlaciona-las com as características clínico-patológicas do tumor, sobrevivência livre de doença e sobrevivência global.

Neste estudo, avaliamos a expressão do CD147 e RKIP em 49 cortes histológicos de fragmentos de carcinomas da cavidade oral. Recorrendo à técnica de imunohistoquímica os cortes histológicos foram marcados por anticorpos específicos, anti-RKIP e anti-CD147, e as suas expressões foram classificadas semi-quantitativamente através da visualização dos cortes histológicos por microscopia óptica.

O estágio III, a idade superior a 63 anos e a invasão vascular linfática são factores de prognóstico no carcinoma da cavidade oral. Neste tipo de tumores o RKIP apresenta maioritariamente expressão positiva e verificou-se ser um factor de prognóstico.

O CD147 encontra-se sobreexpresso em carcinoma da cavidade oral e a sua alta expressão correlaciona-se com a 1ª recorrência. No entanto não é factor de prognóstico neste tipo de tumor. Devido ao número limitado de amostras, futuros estudos em larga escala deverão ser realizados. Sendo também necessários mais estudos na determinação dos factores que regulam a sua expressão do RKIP para que este possa ser alvo terapêutico em carcinomas da cavidade oral.

Oral cavity carcinoma is the 15th type of cancer more frequent in the world. Smoking and drinking habits represent the most important etiologic factors. These types of tumors predominantly affect men above 45 years old, and in the previous years the overall survival has been at 56%. This relates to the late diagnosis of the disease.

The prognosis for these tumors seems to be related with the tumor stage and with regional lymphatic invasion. Emphasizing the importance of establishing an early diagnose in the first stages of the disease.

RKIP, responsible for inhibiting Raf kinase, acts as a modulator in different signaling pathways. This molecule is involved in different physiologic activities, including reproduction and neural activity, acting also as a modulator of apoptosis and metastization, by regulating MAPK, protein G receptors and NF- κ B pathways. Many of the signaling pathways in which RKIP is involved are usually deregulated in tumors; that's why is suggested that RKIP may have a role in tumor progression.

CD147, also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), is a transmembrane protein, as the name indicates it's responsible for inducing the production of several MMPs. Due to this capacity EMMPRIN is a candidate for upstream regulation of several diseases, including tumors and inflammatory diseases.

For several years it has been recognized that EMMPRIN is an important modulator of the information exchange in the tumor stroma, being responsible for promoting its formation. Several groups have alerted that CD147 is over expressed in a variety of tumors and that over expression is correlated with a clinical aggressive behavior and with patient survival. Given this, our purpose was to study the expression of these two proteins in oral cavity carcinomas and correlate them with the clinic-pathologic characteristics of the tumor, overall survival and disease free survival.

In this study, we evaluated the expression of CD147 and RKIP in 49 histological sections containing fragments of oral cavity carcinomas. Using Immunohistochemistry the histological sections were stained with specific antibodies, anti-RKIP e anti-CD147, and their expression pattern were classified semi-quantitatively by optical microscopy visualization.

Tumor stage III, age above 63 years old and vascular lymphatic invasion are prognostic factors for oral cavity carcinoma. In this type of tumors RKIP presents, in the majority of the sections, positive expression and can be used as a prognostic factor.

CD147 is overexpressed in oral cavity tumors, and is high expression correlates with the first recurrence. However it is not a prognostic factor in this type of tumors. Due to the limited number of samples, future studies in a larger scale are demanded. It is also

necessary more studies to determine the factors that regulate RKIP expression so that this protein can be used as a therapeutic target in oral cavity carcinomas.



Introdução

1.1. Cavidade oral:

A cavidade oral é limitada anteriormente pelo ponto de contacto entre a pele da face e o vermelhão dos lábios, estendendo-se posteriormente para a junção entre o palato duro e o palato mole, até a ligação dos pilares anteriores das amígdalas e das papilas línguais circunvaladas formando assim os limites posteriores [1]. Esta região é constituída pelos lábios, pavimento bucal, língua, mucosa oral, gengivas superiores e inferiores, palato duro e mole e o trigono retromolar (Fig.1) [2].

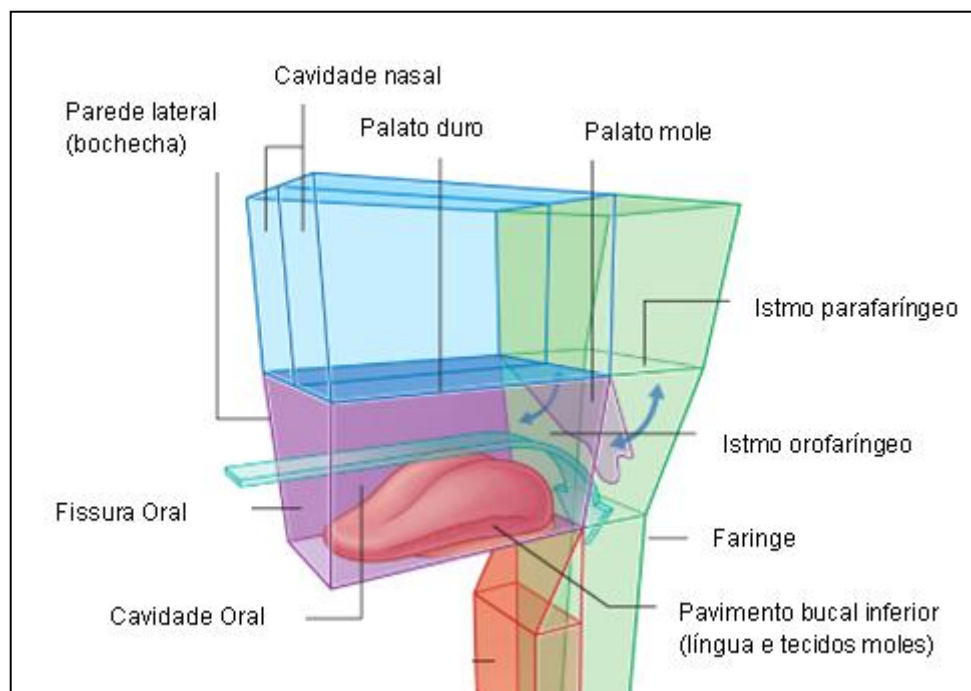


Fig.1 – Constituintes da cavidade oral (adaptado de De Vita V.,2008) [2].

O pavimento bucal inferior e superior e as paredes laterais têm abertura para a cara através da fissura oral tendo continuidade até à cavidade da faringe, orofaringe e istmus. O pavimento superior da cavidade oral é constituído pelo palato duro e palato mole. Já o pavimento inferior é formado essencialmente por tecidos moles, que incluem um diafragma muscular e a língua. As paredes laterais, ou bochechas, são musculares e ligam-se anteriormente aos lábios que delimitam a fissura bucal.

A cavidade oral é separada em duas regiões pelos arcos dentais superiores e inferiores, que consistem nos dentes e no osso alveolar que os suporta [3]

Os ossos que contribuem para a estrutura esquelética da cavidade oral incluem:

- Os maxilares emparelhados, e o osso palatino e temporal;
- A mandíbula, o esfenoide e o osso hióide.

O músculo bucinador é um dos músculos responsável pela expressão facial. Este músculo em conjunto com os músculos constritores superiores permite a continuidade entre as paredes da cavidade oral e da faringe. O músculo bucinador segura as bochechas contra os arcos alveolares e mantém os alimentos entre os dentes, aquando da mastigação [3].

A cavidade oral tem múltiplas funções: é o início do sistema digestivo e está envolvida no processamento inicial dos alimentos, com auxílio de secreções produzidas pelas glândulas salivares; manipula os sons produzidos pela laringe dando assim origem à voz; intervém nas trocas respiratórias, pois tem ligação com a faringe que é uma das vias comuns entre os alimentos e o ar.

1.2. Epidemiologia:

A nível mundial o carcinoma da cavidade oral é 15º mais frequente com uma incidência de 3.8 pessoas por 100.000 habitantes e destes cerca de 137.000 morrem anualmente [4].

Na região Norte de Portugal, quando agrupados por aparelhos, sistemas e órgãos, estes tumores são os 7ºs mais incidentes [5]. As taxas de incidência em 2006 eram de 20,8 para o sexo masculino e 7,2 no sexo feminino. Entre 2006 e 2009, foram diagnosticados anualmente cerca de 170 tumores com esta localização (tabela 1) [5].

Tabela 1- Taxas de incidência bruta e padronizada por 100.000 habitantes, de tumores malignos por localização e sexo, 2006 (adaptado de RORENO 2006) [5].

Topografia	Nº Tumores			Taxa Incidência			Taxa Incidência Padronizada (pop. Europeia)			Taxa Incidência Padronizada (pop. Mundial)		
	H	M	HM	H	M	HM	H	M	HM	H	M	HM
Lábio	41	20	61	2,6	1,2	1,9	2,3	0,7	1,4	1,5	0,4	0,9
Língua	75	21	96	4,7	1,2	2,9	4,6	0,9	2,7	3,5	0,6	2,0
Boca	59	39	98	3,7	2,3	3,0	3,6	1,9	3,2	2,6	1,4	2,4
Glândulas	15	18	33	0,9	1,1	1,0	0,9	1,0	0,9	0,7	0,7	0,7
Amígdala	36	5	41	2,3	0,3	1,2	2,2	0,2	1,2	1,7	0,2	0,9
Orofaringe-outros	30	2	32	1,9	0,1	1,0	1,9	0,1	1,0	1,4	0,1	0,7

1.3. Factores de risco:

Para o aparecimento de carcinomas da cavidade oral contribuem alguns dos seguintes factores (tabela 2) [6].

Tabela 2. Factores de risco para carcinoma da cavidade oral

Factores	Descrição
Leucoplaquia, eritroplaquia	Risco de transformação da leucoplaquia 3% a 25% Mais de 50% de risco para a eritroplaquia.
Hábitos tabágicos	Influência melhor estabelecida, particularmente fumar cachimbo e tabaco sem fumo
Papilloma vírus humano tipos 16 and 18	Identificado por sondas moleculares em 30% a 50% dos casos.
Consumo excessivo de álcool	Influencia menor que o tabaco, mas os dois hábitos interagem aumentando bastante o risco.
Irritação prolongada	Fracamente associada

A maioria destes tumores é encontrada em homens já com idades a partir dos 45 anos e os factores mutagénicos que mais contribuem para o seu aparecimento são o tabaco e o álcool, mas também a exposição a radiação, infecções ou imunoincompetência que são relevantes em alguns casos. Apesar dos hábitos etílicos e tabágicos serem factores independentes, eles tem um efeito sinérgico e aumentam bastante o risco quando consumidos em conjunto.

O carcinoma da cavidade oral é um problema particular em algumas populações minoritárias negras e étnicas [7]. Os efeitos do estilo de vida também têm um papel na sua formação, como o uso de tabaco mastigável e baixo consumo de fruta e vegetais. Existem ainda outros factores importantes descritos abaixo com mais pormenor.

1.3.1. *Factores genéticos:*

Alguns estudos têm descrito uma componente familiar significativa no desenvolvimento de carcinoma oral. Agregação familiar de carcinoma oral, possivelmente com um modo de hereditariedade autossomal dominante, é observada numa pequena percentagem de doentes [8,9]. Variações polimórficas de genes nas vias de metabolização de xenobióticos, como o *CYP1A1* ou os genes que codificam a M1-tranferase-S para a glutationa [10] e a 2-acetyltransferase-N [11], podem estar envolvidos. Indivíduos que são portadores do alelo tipo 3 da desidrogenase com rápida metabolização do álcool (*ADH3*) [12] podem estar particularmente vulneráveis ao efeito de consumo crónico de álcool e podem ter um risco aumentado de desenvolverem carcinoma da cavidade oral [13].

1.3.2. *Infecção:*

O vírus do papiloma humano (HPV), em particular o HPV tipo 16, pode ser um factor etiológico, especialmente entre indivíduos que não fumam nem bebem álcool [14]. Foi reportado que a presença de HPV em tumores é um factor de prognóstico forte e independente para a sobrevivência de doentes com carcinomas da orofaringe [15].

Outras infecções como a candidíase e sífilis também têm influência, e mais recentemente o papel da flora bacteriana oral tem sido considerado como potencial causador. Pensa-se que existem uma relação entre má higiene oral e o aparecimento de carcinoma da cavidade oral isto porque num estudo se verificou que indivíduos com má higiene oral apresentavam carcinomas ou displasia da cabeça e pescoço [16-17].

1.3.3. *Pré-neoplasia:*

Existem lesões orais pré-malignas que aparentam clinicamente a presença de carcinoma oral. Estas incluem a leucoplaquia, eritroplaquia, estomatites, fibrose submucosa, líquen do plano bucal e queratose associada ao tabaco [18].

1.3.4. *Tabaco:*

Estomatite nicotínica é caracterizada pelo engrossamento e por alterações hiperqueratóticas da mucosa palatina, e está normalmente associada a fumadores de cachimbo, mas também pode ocorrer em fumadores de charuto ou tabaco [19]. Existem ainda outras alterações da mucosa oral relacionadas com o uso de tabaco mastigável e inalável [20]. Tais lesões ocorrem tipicamente no vestíbulo labial ou bucal, mas também se podem estender até à mucosa das gengivas e mucosa bucal.

O grau das alterações clínicas depende do tipo e da qualidade do tabaco, da duração do consumo e da susceptibilidade do fumador.

1.3.5. *Mutações:*

As mutações genéticas produzem geralmente, num estágio inicial, mudanças fenotípicas que podem se podem manifestar como lesões clinicamente reconhecíveis. Um lesão oral pré-maligna é uma área em que o tecido foi alterado geneticamente ou morfológicamente e que é mais provável de vir a desenvolver cancro do que tecido normal.

1.4. Carcinoma da cavidade oral:

No tracto aerodigestivo superior a cavidade oral é um dos locais mais comum para o aparecimento de carcinomas espinocelulares. A maioria destes tumores é de fácil acesso para realização de biópsias e para uma identificação em fase inicial, mas pelo menos metade resultam em morte ao fim de 5 anos e podem até já ter metastizado aquando da descoberta da primeira lesão.

Como definido pela Organização Mundial de Saúde, a leucoplaquia é uma placa branca que não pode ser raspada e não pode ser caracterizada como outra patologia. A sua identificação é importante pois em 3% a 25% dos casos, dependendo da localização, ocorre transformação para carcinoma espinocelular. A taxa de transformação é maior em lesões do lábio e da língua e menor nas lesões do pavimento bucal. As lesões que apresentam displasia significativa através da visualização microscópica, têm maior probabilidade de se transformarem em carcinomas. Existem ainda mais duas lesões relacionadas com a anterior. A leucoplaquia verrugosa apresenta uma superfície enrugada causada por hiperqueratose excessiva. Esta forma de leucoplaquia recorre e ao longo do tempo e pode disseminar-se, resultando numa lesão oral do tipo verruga difusa que pode já conter um carcinoma espinocelular.

A eritroplaquia refere-se a áreas circunscritas geralmente granulares, vermelhas, aveludadas e com limites irregulares. Histologicamente, a eritroplaquia revela invariavelmente displasia epitelial marcada, a taxa de transformação maligna é maior que 50%, daí que a identificação desta lesão seja de enorme importância.

1.4.1. Patologia:

Para além dos carcinomas espinocelulares existem ainda outras formas menos comuns de carcinomas na cavidade oral como [19]:

- Tumores salivares (mucoepidermóides, adenocarcinomas);
- Melanomas;
- Plasmacitomas;
- Sarcomas.

Carcinomas espinocelulares na boca apresentam-se com irregularidades na mucosa que podem progredir para uma lesão destrutiva ulcerada ou para um crescimento mais exofítico. Estes podem

ser tumores altamente agressivos, invadindo e destruindo tecidos locais adjacentes incluindo o osso da mandíbula, e disseminando para nódulos linfáticos regionais no pescoço e na região submandibular. A região é dividida anatomicamente mas os tumores envolvem normalmente mais do que uma região [19]:

- Trigno retromolar (10%)
- Pavimento bucal (15%)
- Língua (60%)
- Palato duro (5%)
- Mucosa bucal (10%)

1.4.2. Sintomas:

Um dos sintomas mais comuns em doentes com cancro oral é a dor, representando 30-40% das principais queixas. Apesar de a dor ser o principal sintoma, esta apenas se manifesta quando a lesão já atingiu um tamanho considerável, é então nesta altura que o paciente procura ajuda médica. Daí que carcinomas num estágio inicial passem despercebidos por serem assintomáticos [20]. Em lesões maiores e mais avançadas os sintomas podem variar desde um desconforto moderado a uma dor severa, especialmente na língua. Outros sintomas podem incluir, dor no ouvido, sangramento, dentes soltos, problemas em respirar, dificuldade em falar e disfagia [21].

Em alguns doentes também podem apresentar apenas linfadenopatia cervical sem quaisquer outros sintomas. Em fases terminais, os doentes podem desenvolver fístulas na pele, sangramento, anemia e caquexia [22].

1.4.3. *Morfologia:*

O aparecimento das lesões iniciais verifica-se pela presença de uma coloração pérola ou cinzenta, e engrossamento circunscrito da mucosa que se assemelha a leucoplasias. Podem ainda crescer de forma exofítica produzindo lesões nodulares palpáveis ou então podem assumir uma forma endofítica com um padrão invasivo com necrose central criando uma úlcera cancerosa.

Os carcinomas espinocelulares são normalmente tumores queratinizantes bem a moderadamente diferenciados. Antes que a lesão se torne avançada pode ser possível identificar atípia epitelial, displasia, ou carcinoma *in situ* nas margens, sugerindo que estes podem ter-se originado de uma leucoplasia ou eritroplasia.

1.4.4. *Métodos de diagnóstico:*

O exame físico é o método mais utilizado, levando à detecção destes carcinomas através da visualização e palpação de estruturas como os lábios, mucosa jugal, língua, soalho da boca, palato e orofaringe, mas também pela palpação externa do pescoço na procura de nódulos linfáticos aumentados ou massas anormais.

São também utilizados outros métodos para uma visualização mais precisa, como tomografias axiais computadorizadas e ressonâncias magnéticas, as quais permitem detectar a presença de massas, mas sendo sempre necessária a realização de biópsia para confirmar o diagnóstico.

1.4.5. *Estadiamento:*

A avaliação do paciente requer exame sob anestesia para avaliar a extensão da doença e fazer uma biópsia da lesão. Os nódulos primários e regionais são também avaliados por ressonância magnética. A natureza maligna da linfadenopatia deve ser confirmada por citologia da aspiração com agulha fina [19].

1.4.6. Tratamento:

Uma acção multidisciplinar é essencial:

- Cirurgião plástico, dentista
- Oncologista de Radioterapia
- Dietista
- Terapeuta da fala
- Cirurgião para tumores num estado inicial
- radioterapia primária
- Dissecção dos nódulos positivos no pescoço
- Lesões maiores requerem reconstrução
- Se os tumores forem localmente avançados – combinação entre cirurgia e radioterapia.

A terapia por radiação é planeada tendo em conta, as evidências clínicas e radiológicas do tumor bem como os possíveis locais de doença oculta nos nódulos. Doses de 50-65 Gy são libertadas no volume tumoral, dependendo da extensão do tumor residual. Pelo menos parte desta dose pode ser libertada por terapia intersticial, geralmente usando um fio de iridium. Irradiação radical da cavidade oral causa mucosite e boca seca, que pode persistir dependendo da quantidade de tecido salivar que não foi irradiada. Ulceração crónica da mucosa e osteo-necrose são riscos, particularmente para tumores localmente avançados envolvendo a mandíbula. Tal como ocorre nos carcinomas espinocelulares de outros locais da cabeça e pescoço, a quimioterapia é utilizada na doença já avançada [19].

1.4.7. Características clínicas:

Estas lesões podem causar dor local ou dificuldade na mastigação, mas também existem lesões assintomáticas que por essa razão são ignoradas.

A taxa de sobrevivência global aos 5 anos após cirurgia, radioterapia e quimioterapia adjuvante, é de 40% para carcinoma

localizados na base da língua, faringe, e pavimento da boca sem metástases nos nódulos linfáticos. Comparando com uma taxa de menos de 20% para aqueles com metástases nos nódulos. Quando descobertos numa fase inicial a taxa de sobrevivência destes tumores pode exceder os 90% [6].

Os tumores da cavidade oral tendem a disseminar regionalmente para os nódulos linfáticos da região submandibular (Nível I), e para os nódulos linfáticos da cadeia jugular superior e intermédia (Nível II e III) [1].

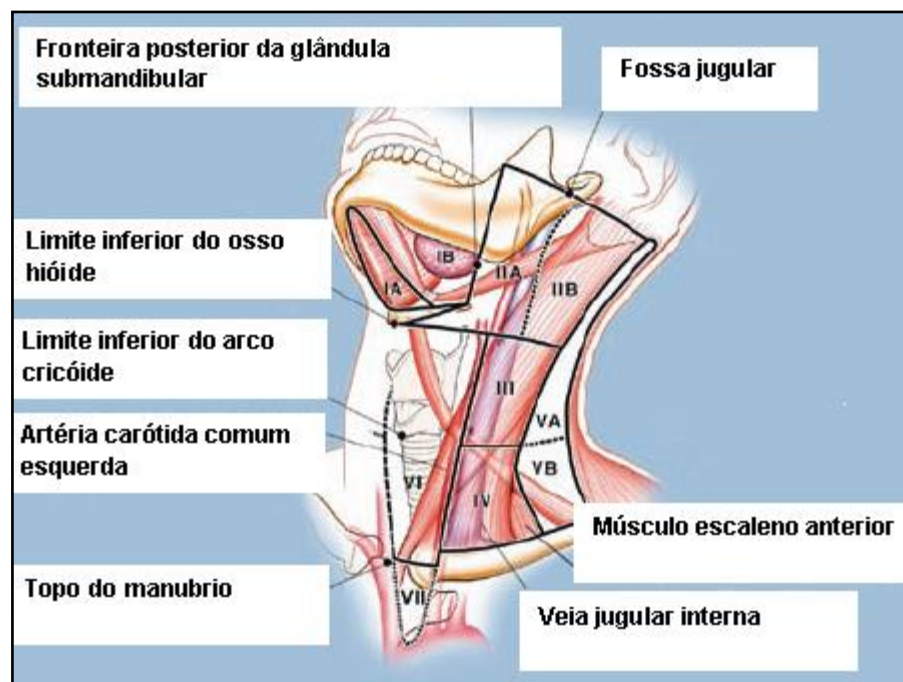


Fig.2- Classificação nodal (Adaptado de DeVita V. 2008) [2].

Devido à acessibilidade e ao risco de envolvimento de estruturas ósseas, o tratamento com radioterapia pode levar a uma rádio-necrose da mandíbula ou da maxila. Há ainda a dizer que este tipo de tumores pode ser menos sensível à quimioterapia e radiação, relativamente a carcinomas da orofaringe e laringe. Daí, que os tratamentos primários sejam normalmente a cirurgia. Margens cirúrgicas positivas, um envolvimento múltiplo dos nódulos linfáticos e/ou extensão extracapsular do tumor pedem que seja considerada quimio-radioterapia, para melhorar o controlo local da doença [1].

Disseminação para nódulos regionais está presente na altura do diagnóstico inicial, verificando-se em cerca de 50% dos casos dos

carcinomas da língua, em mais de 60% dos casos com carcinomas no pavimento da boca e sendo raro apenas em carcinoma do lábio. Disseminação mais remota para tecidos, ou órgãos no tórax ou abdómen é menos comum que disseminação regional extensa.

1.4.8. Importância do diagnóstico precoce:

O diagnóstico precoce é o factor mais importante para melhorar a taxas de sobrevivência dos doentes, podendo mesmo atingir-se taxas entre 80-90% quando encontrados estádios iniciais. O diagnóstico precoce também minimiza a extensão da cirurgia requerida.

1.5. Biomarcadores com potencial de diagnóstico:

Os biomarcadores ajudam na prevenção e detecção precoce das fases iniciais da transformação maligna da cavidade oral e podem melhorar o prognóstico, diagnóstico e tratamento de carcinomas orais [23]. Estes revelam as mudanças moleculares e genéticas relacionadas com os processos da carcinogénese oral e podem determinar a eficácia e segurança de agentes usados na quimioterapia.

Um dos marcadores usados para definir aberrações cromossómicas é a coloração de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal [24]. Os micronúcleos também têm sido usados para avaliar a reversão de leucoplaquias e a eficácia de retinóides, carotenos e vitamina E [25,26]. Outros métodos incluem a determinação de aneuploidias e a pesquisa de perdas ou ganhas de material genético.

Exemplos de marcadores biomoleculares com potencial de diagnóstico (tabela 2) relevante incluem, conteúdo de DNA e polissomias cromossómicas, perda de heterozigotia, regiões de organização nuclear, antigénios de grupos sanguíneos, marcadores de proliferação, aumento de receptores do factor de crescimento epidermal (EGFR), e diminuição da expressão de receptores β do ácido retinóico, *p16* e *p53* [27,28].

Apesar de ainda não ter sido estabelecido um painel de marcadores validados, para fornecer informação de prognóstico em lesões orais pré-malignas, a possibilidade da descoberta de técnicas de análise genómica e proteómica de alta sensibilidade pode contribuir para grandes avanços no lançamento de um sistema de classificação molecular para análise de prognóstico.

Tabela 2. Exemplos de biomarcadores com potencial de diagnóstico.

Categoria do biomarcador	Análises
Genómica	Micronúcleos, conteúdo de DNA, aberrações cromossómicas.
Oncogénica	Expressão oncogénica, genes supressores tumorais modificados.
Proliferação	Antigénios relacionados com ciclinas e núcleo, frequência mitótica, poliaminas
Diferenciação	Citoqueratinas, transglutaminase tipo I, factor de transcrição (AP)-1
Stress oxidativo	Glutathiona S-transferase, superóxido dismutase, proteínas do stress (HSPs)
Apoptose	Família Bcl-2, factores de condensação da cromatina, caspases, via de sinalização mitocondrial.
Imunológico	Várias citoquinas

1.6. Via de sinalização MAPKKK ou RAS-RAF-MEK-ERK:

A via de sinalização da proteína cinase activada mitogénicamente (MAPK) existe em todos os eucariotas, e controla processos celulares fundamentais como a proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose. Esta cascata inclui uma proteína G que funciona a montante de um módulo central composto por três cinases: a cinase cinase MAPK (MAPKKK) que fosforila e activa a cinase MAPK (MAPKK), que por sua vez activa a MAPK.

Este sistema de funcionamento permite, não só a amplificação do sinal mas também interfaces regulatórias adicionais que permitem que a cinética, duração e amplitude da actividade sejam ajustadas de uma forma mais precisa.

Existem diferentes módulos da via MAPK que partilham componentes estruturalmente relacionados, mas cada um é responsável por respostas biológicas específicas. Um desses módulos é a via do ERK (cinase regulada por sinal extracelular) (figura 3) da qual faz parte o RAS, que actua como uma proteína G, o Raf que actua como a MAPKKK, o MEK (cinase MAPK/ERK) como a MAPKK e o ERK como MAPK [29].

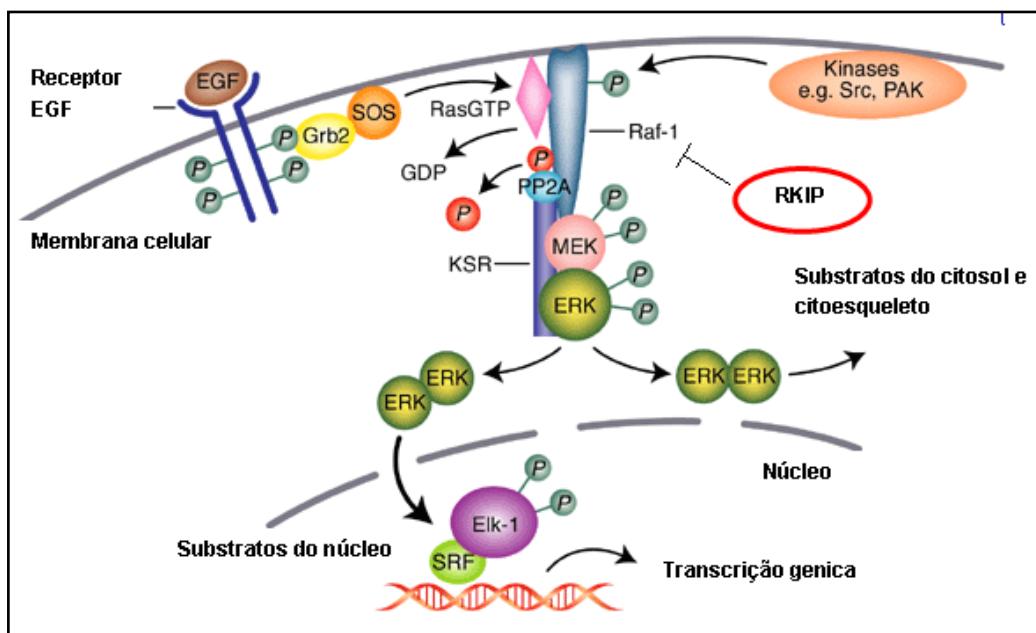


Fig.3 – Organização e funções da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK .

1.6.1. Modo de actuação:

A via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK é um modo de sinalização evolucionariamente conservado, que regula muitos processos celulares fundamentais como a diferenciação, proliferação, sobrevivência, motilidade, e transformação [30]. Dois componentes desta via de sinalização, o *Ras* e o *Raf*, são proto-oncogenes mas existe também uma variedade de hormonas, factores de crescimento, de diferenciação, e substâncias promotoras de tumores envolvidos nesta via. A maioria destas substâncias estimula activamente as proteínas *Ras* induzindo a troca de GDP com GTP, que converte o *Ras* na sua forma activa. Estando activado o *Ras* actua como um adaptador que se liga a cinases *Raf*, com alta afinidade, e provoca a sua translocação para a membrana da célula, onde a activação do *Raf* ocorre [31].

O *Raf* tem a capacidade de interagir com um grande número de proteínas, incluindo as fosfatases Hsp90, PP2A e Cdc25, Akt, PKCs, cinases Jac, MAPK ERK5, e RKIP-1 [32]. Esta capacidade de interagir com tantas proteínas constitui um elemento chave na regulação da cascata da cinase MAP [33].

1.6.2. Genes *Raf*:

Os genes *Raf* codificam cinases serina/treonina específicas, que integram a recepção de sinais a montante da via de sinalização, sendo responsáveis pela regulação da mesma.

Nos mamíferos existem três proteínas *Raf*: a *Raf-1*, *A-RAF* e *B-Raf*. Estas têm funções celulares semelhantes, mas não sobreponíveis [34]. Sendo cinases serina/treoninas, as proteínas *Raf* fosforilam resíduos serina e treonina em proteínas modulatórias essenciais a jusante da via *Ras*. Cada espécie *RAS* tem um perfil de expressão distinto na célula, o que sugere que estas isoformas individuais do *RAF* actuem em funções específicas [34]. Enquanto o *Raf-A* e *B* têm um padrão de expressão específico para os tecidos, o *Raf-1* tem uma expressão mais alargada. Este apresenta maiores níveis de expressão em músculo estriado, cerebelo e cérebro fetal [35], o *B-Raf* é encontrado predominantemente

em tecido neural [36], enquanto o A-Raf tem maior expressão nos epidídimos e ovários bem como na bexiga, rim, intestino, coração, baço, timo e cerebello [37].

O Raf pode activar tanto o MEK-1 como o MEK-2 com eficácia similar *in vitro*.

1.6.3. Gene MEK:

O MEK pertence ao grupo raro de cinases com especificidade dupla, ou seja fosforila quer resíduos treonina quer resíduos tirosina [38]. Esta cinase activa o ERK-1 e ERK-2 pela fosforilação do motivo –Thr-Glu-Tyr- no ciclo de activação.

1.6.4. Gene ERK:

O ERK é uma cinase treonina/serina que actua sobre mais de 50 substratos [39].

Uma vez activados, os ERKs vão para o núcleo onde fosforilam factores de transcrição, estimulando ainda a expressão genética de vários genes, como por exemplo a ciclina D1.

Activação inapropriada ou contínua desta via forma uma força pró-mitogénica potente que resulta numa proliferação e diferenciação anormal em vários tumores humanos [40].

1.7. RKIP, proteína inibitória da cinase Raf :

De todas as proteínas que se ligam ao Raf, o RKIP-1 é a única que inibe a via da cinase MAP [41]. A proteína inibidora da cinase Raf (RKIP), também denominada de proteína ligante 1 fosfatidiletanolamina (PEBP1), é um membro protótipo da família das PEBP que tem um domínio ligando conservado evolucionariamente [42].

Após uma caracterização funcional mais aprofundada desta proteína, a PEBP1 foi chamada de RKIP devido à sua capacidade de se ligar e inibir a cinase Raf [43]. Esta molécula encontra-se amplamente expressa na maioria dos tecidos em várias fases de desenvolvimento e é mais abundante no cérebro, testículos, epidídimos, fígado e rim [44,45].

O gene do RKIP está localizado no cromossoma 12q24.23 e codifica uma proteína com 187 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 23 kDa.

A maioria dos estudos à volta desta molécula indica que o RKIP actua como modulador de diferentes vias de sinalização por interacção directa e indirecta com outras proteínas. O RKIP tem a capacidade de se ligar a várias proteínas modulando as suas vias de sinalização incluindo o Raf-1, B-Raf, o MEK, o receptor da cinase 2 da proteína acoplada G (GRK2), e a cinase indutora do NF- κ B (NIK)/TGF- β [43,46] (Fig.4).

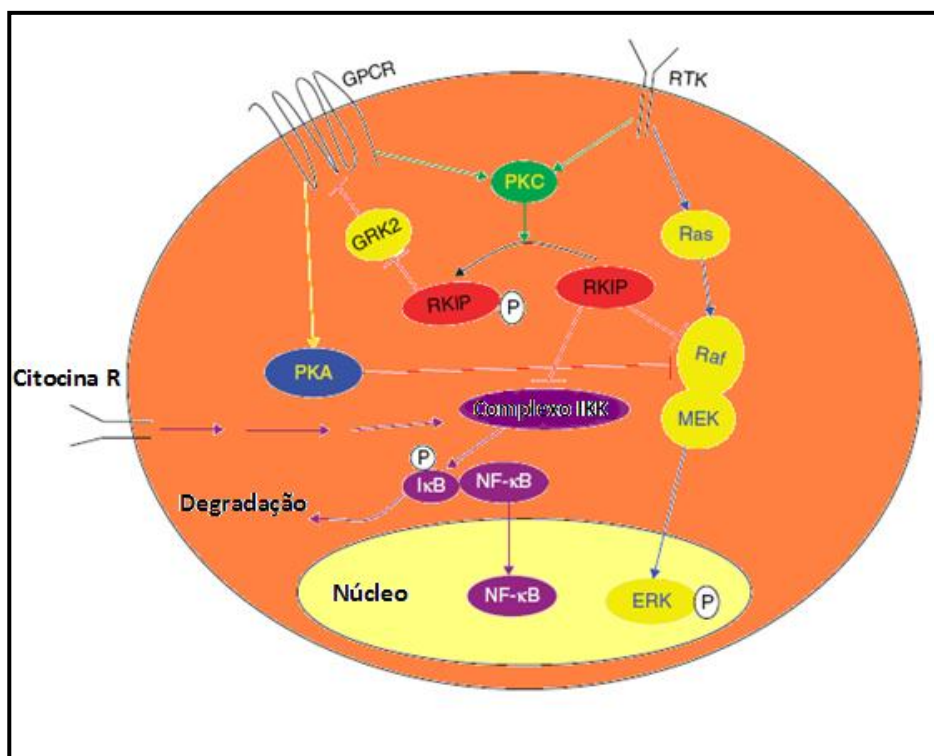


Fig.4- Papel do RKIP nas vias de sinalização Raf, receptor da proteína G (GPCR), e NF- κ B (adaptado de [62]).

1.7.1. Funções:

A função do RKIP foi reportada pela primeira vez, com base na sua habilidade para se ligar à fosfatidiletanolamina [47].

O RKIP tinha inicialmente sido caracterizado como estando envolvido em diferentes actividades fisiológicas, incluindo a reprodução e actividade neural [48]. Contudo, outros estudos revelaram que o RKIP funcionava como um modelador da apoptose e da metastização, através da regulação de vias de sinalização importantes com a cascata RAF-MEK-ERK, receptores acoplados da proteína G e a via do NF- κ B [49,50].

A proteína inibidora da cinase Raf (RKIP) pode presumivelmente interagir com a maior cinase Raf-1 em mais do que um local [51]. Foi verificado que o RKIP bloqueia a activação do Raf-1 nas células prevenindo o acesso de cinases activadoras, bem como a fosforilação nos locais S338 e Y341, eventos necessários à activação do Raf-1 [52].

Ao ligar-se ao Raf-1 o RKIP interrompe a activação, dependente do Raf-1, da cinase (MEK) e consequente activação da cinase extracelular reguladora de sinal (ERK), impedindo assim a progressão do sinal. Após ser fosforilado pela proteína cinase C o RKIP desliga-se do Raf-1 e liga-se ao GRK2, um inibidor por feedback negativo da GPCR [53], bloqueando a sua actividade e aumentando a sinalização da via GPCR.

Esta proteína é também responsável por actuar como um supressor da activação do factor de transcrição do factor nuclear κ B (NF- κ B), bloqueando a inactivação do seu inibidor e regulando os receptores acoplados da proteína G [54].

1.7.2. Papel no cancro:

No que respeita à patofisiologia o RKIP parece estar associado a doenças neurodegenerativas, nefropatia diabética e também doenças oncológicas.

Muitas das vias de sinalização em que o RKIP está envolvido estão habitualmente desreguladas em tumores; daí que tenha sido postulado que o RKIP tenha um papel na progressão tumoral. Estudos anteriores verificaram que a expressão de RKIP se encontrava reduzida em vários tumores, incluindo os da próstata [55], colorectal [56,57], gástrico [58], mama [59,60], e nasofaringe [61].

Num estudo envolvendo carcinomas espinocelulares cutâneos verificou-se que o RKIP exibia baixos níveis de expressão, comparando com o tecido normal adjacente. Os níveis de mRNA do RKIP também se encontravam reduzidos e completamente diminuídos em metástases. Daí que este gene possa ser usado como marcador de prognóstico e um potencial alvo de terapias para tratamento de doentes com este tipo de carcinomas [62].

Por outro lado num estudo envolvendo tecido normal da tiróide e carcinomas foliculares, papilares e da medula, verificou-se imunoreactividade citoplasmática forte e uniforme para o RKIP. Não tendo sido detectada nenhuma diferença na expressão de RKIP entre a área invasiva periféricas e a área central destes tumores [63].

1.7.3. Papel na metastização:

Já havia sido demonstrado que o RKIP apresentava níveis elevados de expressão em tecido não tumoral da próstata, baixos níveis em carcinomas primários da próstata, e fraca ou nenhuma expressão em metástases de carcinomas da próstata [64]. Se esses níveis forem aumentados a habilidade de metastização diminui [65].

Os mecanismos que contribuem para a formação de metástases nestes carcinomas são ainda desconhecidos. Algumas hipóteses têm sido avançadas: perda da RKIP pode ter efeitos no intravasamento, extravasamento ou no crescimento de metástases em locais distantes [66].

Alguns estudos indicam que sobexpressão de RKIP em tumores, confere protecção contra apoptose induzida por radiação. Concluindo que perda de RKIP confere vantagem no crescimento das células tumorais e que a sua sobreexpressão pode permitir a morte celular, paragem do ciclo celular, apoptose de células tumorais, após serem submetidas a radiação [67].

Foi também verificado que a RKIP pode funcionar como supressor de metástases. Este encontra-se com níveis de expressão baixos em células metastáticas de cancro da próstata em comparação com células não metastáticas [65,68]. A expressão da RKIP está também inversamente relacionada com o potencial metastático em melanoma humano [69], carcinoma de ovário [70] e carcinoma da nasofaringe [71].

Noutros processos que podem afectar a formação de metástases viáveis tem-se verificado que a RKIP é responsável pela regulação dos mesmos, incluindo a progressão do ciclo celular [70], apoptose [68] e angiogénese [67]. É então evidente que existe um grande nível de complexidade nas operações celulares da RKIP e que não estão ainda criadas as condições para perceber como é que a RKIP actua na supressão de metástases.

É sugerido noutro estudo que o RKIP funciona como um supressor de metástases, não por regulação negativa da migração celular mas sim por regulação negativa da produção e poder invasor das MMPs através das barreiras da matriz extracelular, provocado um feedback regulatório envolvendo o RKIP e factores pró-invasivos como o NF- κ B [72].

A base para a actividade supressora de metástases não é ainda clara. Pode eventualmente envolver um efeito directo no movimento celular, sendo assim seria de esperar que o RKIP regulasse negativamente a migração celular. Alternativamente, poderia perturbar a habilidade das células de degradarem barreiras da matriz extracelular, a aderência, ou outro processo relevante para que ocorra invasão e metastização.

1.8. CD147:

O CD147, também chamado de indutor da matriz extracelular de metaloproteínases (EMMPRIN), é uma proteína transmembranar altamente glicosada e que pertence à superfamília das imunoglobinas [73]. É composta por dois domínios Ig com forte analogia com domínios do complexo major de histocompatibilidade (MHC) [74-77].

Originalmente identificada em células de carcinoma do pulmão como um factor capaz de estimular a actividade da colagenase em fibroblastos humanos, a EMMPRIN tem sido identificada independentemente em diferentes sistemas modelo, resultando numa longa lista de acrónimos para esta molécula incluindo, factor estimulador da colagenase em tumores (TCSF) [78], M6 (em humanos) [75], neurotelina 5A11 e HT7 (em galinhas) [79], OX47 and CE9 (em ratinhos) [74,80], basigina e gp42 (em humanos e ratos) [75]. Foi demonstrado recentemente que a EMMPRIN seria responsável pela indução da produção de várias MMPs, resultando assim no nome inicial, indutor de metaloproteínases da matriz extracelular [77].

O comprimento total da EMMPRIN humana é de 269 resíduos de aminoácidos, entre a posição 25 e 200 temos a sequência proteica do domínio extracelular; 77 aminoácidos entre a posição 25 e 101 constituem o domínio Ig extracelular I (ECI); e 95 resíduos da posição 106 à 200 fazem o domínio Ig extracelular II (ECII) [75].

A EMMPRIN humana é expressa em duas isoformas diferentes sendo caracterizada pela presença de dois domínios Ig extracelulares, e um domínio transmembranar com um aminoácido carregado e uma pequena cauda citoplasmática [74].

O local de indução das MMPs foi identificado no domínio ECI da EMMPRIN, sendo considerado crucial para estimular a actividade das MMPs [77].

1.8.1. Funções:

A EMMPRIN foi inicialmente identificada num estudo que verificou que a produção de colagenase intersticial (MMP-1) foi induzida durante a co-cultura de células tumorais e fibroblastos.

Outros estudos revelaram que a EMMPRIN era capaz de induzir a expressão de várias outras MMPs, incluindo MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-11 [77]. A via de sinalização usada pela EMMPRIN para estimular as MMPs não está

ainda bem definida. Estudos anteriores reportaram que a EMMPRIN estimula a MMP-1/2 usando a via p38 da MAPK, mas estimula a produção de MMPs em células tumorais da mama usando as vias da fosfolipase A2 e lipoxigenase-5 [81].

Apesar do receptor específico da EMMPRIN não estar ainda identificado, estudos usando imunoprecipitação e imunofluorescência identificaram duas integrinas, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta$ que se associam com a EMMPRIN em pontos de contacto célula a célula. Estas integrinas que se ligam preferencialmente a lamininas e que servem como os maiores constituintes da membrana basal, têm sido implicadas na adesão, metastização e sinalização celular.

Através da associação da EMMPRIN com integrinas, é possível que esta proteína possa regular a associação laminina/integrina e ao fazê-lo, regular a formação da membrana basal, adesão celular, indução de MMPs, quimiotaxia e proliferação celular.

Quando a ligação EMMPPRIN-integrina é interrompida, ocorre uma distribuição anormal dos organelos, incluindo mitocôndrias, núcleo e reticulo endoplasmático [82].

A EMMPRIN demonstrou estar associada a várias proteínas, resultando assim nas suas variadas funções. Quer o domínio citoplasmático quer o transmembranar parecem estar envolvidos em interacções proteína-proteína dentro da membrana plasmática.

O papel que a EMMPRIN tem na diferenciação foi descrito baseado na sua localização na membrana basal do epitélio da derme [83] e da córnea e na sua habilidade para promover a diferenciação de miofibroblastos [84].

No músculo-esquelético, a EMMPRIN foi também descrita como sendo uma chaperona na translocação de transportadores de monocarboxilato (MCT) para a membrana plasmática [85].

Recentemente, a EMMPRIN foi identificada como sendo essencial na sinalização mediada por ciclofilinas [86], onde a ligação extracelular da ciclofilina a com a EMMPRIN resulta na activação da via ERK e na quimiotaxia das células.

Noutro estudo verificou-se que a EMMPRIN estimula a produção de hialurona em células tumorais da mama e do cólon [87] e que o efeito que a EMMPRIN tem no crescimento independente de ancoragem é dependente de

hialurona. Há ainda a acrescentar que a EMMPRIN estimula a via de sinalização da sobrevivência celular de um modo dependente de hialorona.

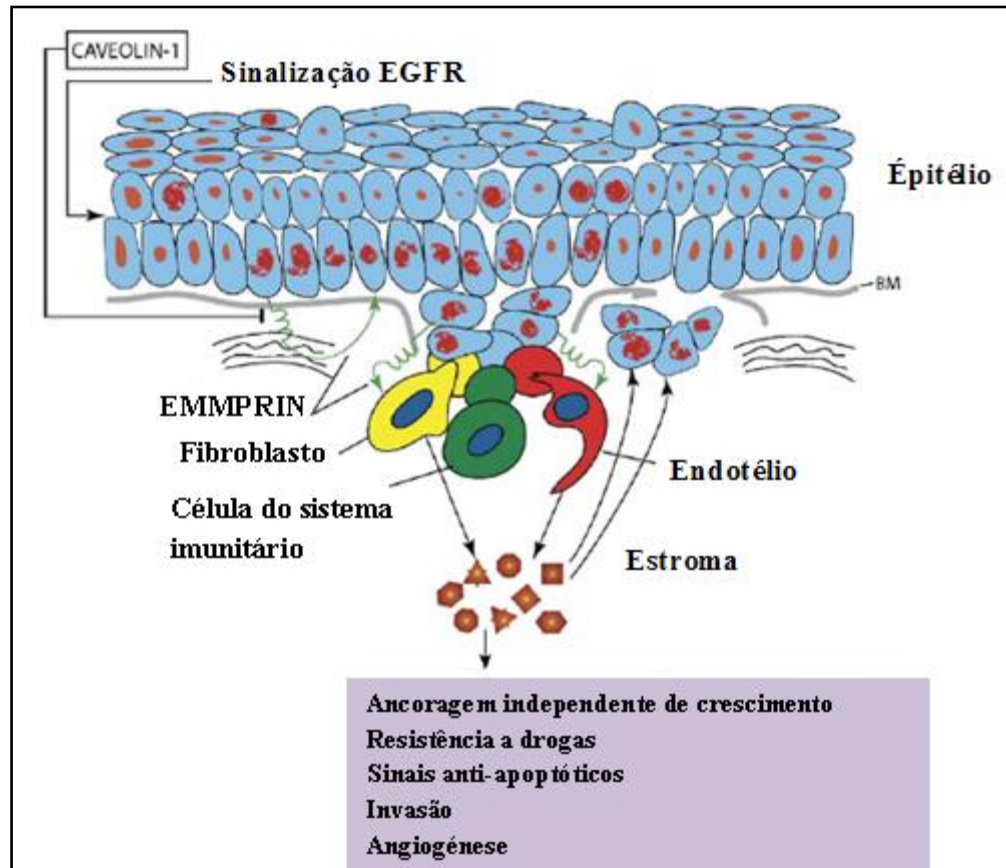


Fig.5 - Modelo hipotético do papel da EMMPRIN na mediação da interação entre o tumor e as células normais iniciais durante a transição entre lesão pré-maligna e carcinoma oral invasivo.

Diminuição na expressão constitutiva do CD147 existe na maioria dos tipos celulares, onde se encontra envolvido em muitos dos seus processos fisiológicos. Já a sua sobreexpressão ocorre durante processos de remodelação como a inflamação, desenvolvimento embrionário, cicatrização e progressão tumoral [88,89].

Devido à capacidade que a EMMPRIN em induzir as MMPs, esta proteína é uma candidata à regulação, a montante, de várias doenças incluindo tumores e doenças inflamatórias. A EMMPRIN tem demonstrado ter um papel importante na activação e migração de leucócitos, pois em populações de células imunitárias circulantes verifica-se uma alta expressão desta molécula. À parte da activação

dos leucócitos, a EMMPRIN melhora a reparação e remodelação dos tecidos sendo então um factor chave em várias doenças importantes [92].

A EMMPRIN também tem um papel na cicatrização de feridas, através da regulação das MMPs, sendo sugerido que possa ter um efeito regulatório na remodelação dos tecidos [84]

Péptidos tumorais específicos para a EMMPRIN foram sequenciados e identificados há já alguns anos. Alguns destes são utilizados como bloqueadores da actividade de péptidos (emp#2) *in vitro* [91];

1.8.2. Papel no cancro e na metastização:

Está descrito que esta glicoproteína se encontra sobreexpressa na superfície de células tumorais e está associada com a promoção da invasão e quimioresistência celular.

O CD147 pode modificar o microambiente tumoral através da activação de proteínases, induzindo factores angiogénicos e regulando o crescimento e sobrevivência de células tumorais independentes de ancoragem (micrometastases) [92].

Há já alguns anos foi reconhecido que a EMMPRIN é um importante modulador da troca de informação no estroma tumoral sendo responsável por promover a formação tumoral, através da aquisição de crescimento independente de ancoragem, pelo fenótipo invasivo das células tumorais, e também pela angiogénese induzida por células tumorais [93].

A EMMPRIN é uma proteína transmembranar multifuncional que intervém em eventos moleculares críticos que precedem a transição de lesões pré-malignas para carcinoma invasivo.

A remodelação da matriz extracelular (MEC) e da membrana celular está confinada ao ambiente pericelular das células pré-malignas e pode ser o primeiro passo necessário para invasão local. As enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e da membrana celular são as metaloproteínases, uma família de proteínases de ancoragem membranar (MTMMPs). Uma das funções mais conhecidas das EMMPRIN é a sua habilidade para estimular o estroma de

fibroblastos a produzir múltiplas metaloproteínases, e os seus activadores endógenos, em parte via cascata MAPK. A EMMPRIN é expressa primariamente em células tumorais, já a expressão das metaloproteínases encontra-se localizada em fibroblastos peritumorais [93].

A transição de lesão pré-maligna oral para um fenótipo invasivo também depende da capacidade que as células têm para induzir angiogénese tumoral. Estudos realizados *in vitro* e em modelos animais demonstraram que a EMMPRIN estimula a produção de VEGF em tumores e células do estroma, através de vias dependentes e independentes de MMPs [94].

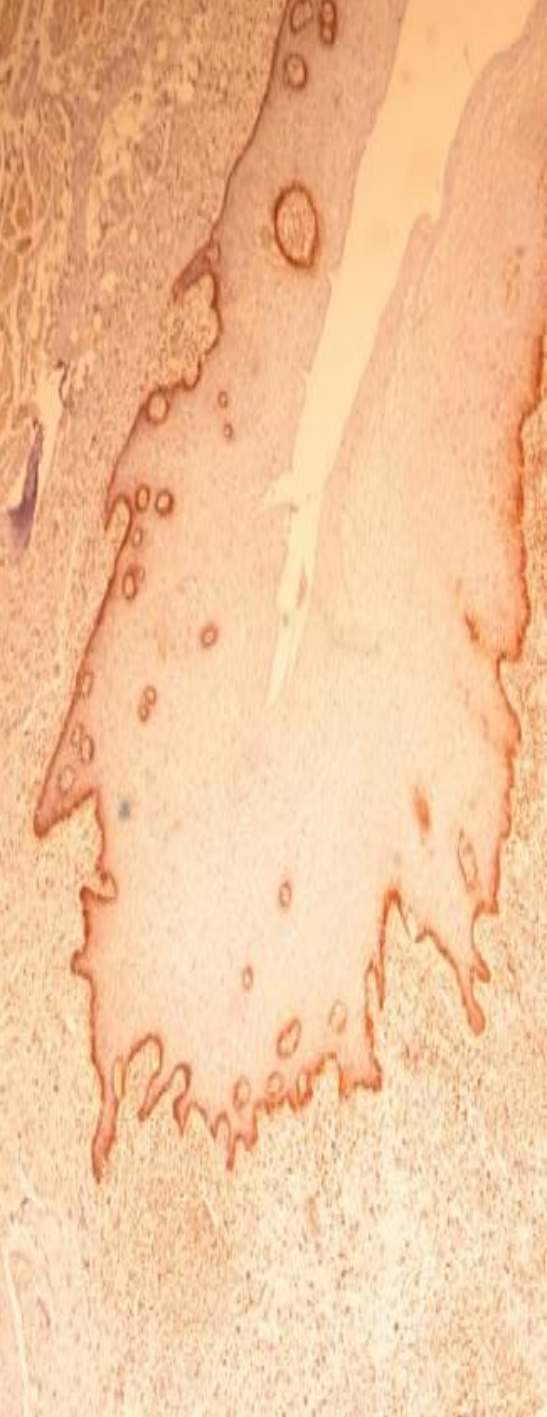
Esta proteína estimula as células tumorais a produzir hialurona que por sua vez promove a sobrevivência celular e crescimento independente de ancoragem através da activação do Akt, Erk e FAK [95]. A resistência a múltiplas drogas por parte das células tumorais está também ligada a sobreexpressão da EMMPRIN [95].

Vários grupos têm alertado que o CD147 se encontra sobreexpresso numa variedade de tumores humanos, e que esta sobreexpressão está correlacionada com um comportamento clinicamente agressivo e com a sobrevivência dos doentes [97-98]. Tem se verificado que o CD147 é das proteínas que frequentemente se encontra expressa em tumores primários e em células de micrometastases, sugerindo assim um papel central na progressão tumoral e na formação de metástases iniciais [99].

Num estudo realizado em carcinoma da bexiga verificou-se que a sobreexpressão do CD147 estava associada com baixa sobrevivência, com o grau dos nódulos linfáticos, grau tumoral e estágio do tumor. Regulação negativa do CD147 em linhas celulares T24 de carcinoma da bexiga levou a uma diminuição da proliferação celular, a migração e invasão *in vitro*. Foi também demonstrado que invasão e metastização dependentes do CD147 eram mediadas em parte por MMPs e VEGF, a expressão de ambos é regulada positivamente em carcinomas de bexiga [100].

Em carcinomas das células escamosas do colo uterino o CD147 encontra-se sobreexpresso, e está correlacionado com invasão e metastização dos nódulos linfáticos. Daí que possa eventualmente ser usado como marcador molecular para prever metástases, destes tumores, em nódulos linfáticos [101].

Tendo em vista estes dados, a EMMPRIN parece ter um papel crucial na mediação do crescimento independente de ancoragem, na angiogénese e invasão, eventos moleculares essenciais na carcinogénese.



Objetivos

2.1. Objectivo gerais:

Avaliar a expressão do RKIP e CD147 em carcinomas da cavidade oral.

2.2. Objectivos específicos:

- Avaliar as variáveis clínico-patológicas (idade, sexo, estágio, localização da lesão, permeação perineural), como factores de prognóstico.
- Estudar o significado da expressão do RKIP e CD147 em termos de prognóstico, dos doentes com carcinoma da cavidade oral.
- Determinar relação entre a imunexpressão do RKIP e do CD147 em doentes com carcinoma da cavidade oral.



Material e Métodos

3.1. Variáveis de estudo:

Avaliamos 49 doentes com carcinoma da cavidade oral, admitidos e tratados com intenção curativa consecutivamente no Instituto Português de Oncologia do Porto, de 1994 a 2004. Destes, 29 eram do sexo masculino e 20 eram do sexo feminino.

Com recurso a amostras dos tumores, dos doentes referidos, obtidas no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do IPO-Porto, e com base na disponibilidade de blocos de tecidos incluídos em parafina e na existência de dados de *follow-up*, estudou-se a expressão de RKIP e de CD147.

3.2. Definição das variáveis de estudo:

Permeação Perineural: Envolvimento por células neoplásicas dos nervos adjacentes ao tumor.

Invasão vascular linfática: Presença de células malignas nos vasos linfáticos.

Sobrevivência livre de doença: Período que compreende a data do primeiro tratamento e a primeira recidiva ou a última consulta de seguimento sem ocorrência de recidiva.

Sobrevivência global: Período que compreende a data do primeiro tratamento e a morte por cancro ou a última consulta de seguimento.

3.3. Material e Métodos:

O estudo imunohistoquímico foi realizado segundo o método da streptavidina-biotina peroxidase, em cortes histológicos de fragmentos de carcinomas da cavidade oral (fixados em formol e incluídos em parafina) com 4 µm de espessura, avaliando-se a imunoexpressão de RKIP e CD147, utilizando anticorpos monoclonais. Controlos positivos (epitélio normal encontrado em cada amostra de carcinoma da cavidade oral) e negativos (substituindo o anticorpo primário por solução tampão salina) foram incluídos em cada ensaio.

3.3.1. Anticorpos:

- Anti-RKIP 0,5mg/ml (*Upstate*);
- Anti-CD147 0,5mg/ml (*Acris*).

3.3.2. Metodologia:

Os testes foram realizados em secções embebidas em parafina e fixadas em formalina de carcinomas da cavidade oral.

As secções foram sequencialmente desparafinadas através de imersões sucessivas em séries de xileno (*Panreac*), e re-hidratadas numa série de concentrações decrescentes de álcool (100%,96%,70%) (*AGA*), e água desionizada.

A recuperação antigénica foi feita aquecendo as lâminas em banho, a 98°C, durante 20 minutos em tampão citrato 2,94g/L (pH 6,0). Seguido de um arrefecimento à temperatura ambiente durante 20 minutos e posterior lavagem com PBS 1x.

Após o procedimento anterior os cortes foram delineados com caneta hidrofóbica (*Thermo Scientific*), seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena, onde se incubaram as secções com peróxido de hidrogénio 30% (*Fluka*) durante 10 minutos. Após os 10 minutos, foi efectuada nova lavagem com PBS 1x durante 5 minutos.

Posteriormente foi feito o bloqueio da marcação não específica através da incubação com U.V Block (*Thermo Scientific*) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação as lâminas foram escorridas e procedeu-se à incubação do anticorpo primário.

O anticorpo primário, RKIP (*Upstate*), foi aplicado a cada secção numa diluição de 1:400. Sendo posteriormente incubado durante 2 horas à temperatura ambiente em câmara húmida.

Após duas lavagens com PBS1x, o anticorpo secundário (*Thermo Scientific*) foi aplicado e ficou a incubar durante 10 minutos, seguido de nova lavagem com PBS (1x) e nova incubação de 10 minutos com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*Thermo Scientific*).

Por fim a reacção imunohistoquímica foi feita incubando as secções em 3,3-diaminobenzidina (*Dako*) durante 2 minutos, seguida de uma lavagem em água corrente.

Para terminar as lâminas foram contrastadas usando Hematoxilina (*Merck*), seguidas de uma lavagem em água corrente, desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%,100%) (*AGA*), fixação em xileno (*Panreac*), e por fim montadas com Entellan (*Merck*).

Para cada caso, foram efectuados um controlo negativo (substituindo o anticorpo primário por solução tampão salina) e um controlo positivo.

Em relação ao CD147, foi utilizado o procedimento descrito anteriormente, apenas com uma pequena alteração no tempo de incubação e na diluição. Para este anticorpo a diluição foi de 1:70 e a incubação foi feita *overnight* no frigorífico.

3.3.3. Avaliação e quantificação da imunoreactividade:

A imunoreactividade dos anticorpos monoclonais foi avaliada através da visualização dos cortes histológicos por microscopia óptica.

A expressão do RKIP foi classificada semi-quantitativamente, considerando a marcação citoplasmática de células neoplásicas. Sendo posteriormente comparada a expressão do RKIP no tumor e na frente de invasão com a expressão do mesmo na mucosa normal presente nas mesmas amostras, que

não se encontrava em continuidade com o tumor e que não tinha qualquer evidência de transformação maligna.

Foram estabelecidos 3 padrões de classificação da expressão, segundo a intensidade imunoreactividade do tecido tumoral: negativo, para amostras com mais de 90% das células negativas; positivo para amostras com mais de 90% de células positiva; heterogéneo para amostras com percentagem equivalente de células positivas e negativas.

A avaliação da imunoreactividade para o CD147 foi realizada multiplicando a intensidade de marcação das células (0-negativo, 1- fracamente positivo, 2- moderadamente positivo e 3- fortemente positivo) pela abundância de células positivas (0- menos de 5% de células, 1- número de células entre 5-25%, 2- número de células entre 26-50% e 3 número de células entre 51-75% e 4- número de células maior que 76%), sendo que resultados abaixo de 6 eram considerados como baixa expressão de CD147 e resultados iguais ou acima de 6 considerados alta expressão de CD147. Posteriormente também foi feita a comparação com a mucosa normal presente nas mesmas amostras.

3.3.4. *Análise estatística:*

A apresentação dos resultados foi feita em tabelas de frequência. A análise univariada foi efectuada pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2). A sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças das curvas encontradas foram estudadas pelo teste de Long-Rank ou Breslow.

Para avaliar a correlação entre a expressão do RKIP e CD147, foi realizada uma análise de correlação usando o teste de Pearson Qui-Quadrado.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$. Esta análise estatística foi realizada utilizando o programa *PASW Statistics 17.0* (Predictive Analytics SoftWare) para Windows.



Resultados

4.1. Significado de prognóstico das variáveis clínico-patológicas:

A análise da Sobrevivência Global em função das características clínico-patológicas da amostra revelou que a idade ($p=0,04$) e o estágio ($p=0,002$) são variáveis associadas ao prognóstico. Os doentes com neoplasias em estágio III (11,1%) e com idade igual ou superior a 63 anos (26,0%), têm uma Sobrevivência Global significativamente menor.

A Sobrevivência Livre de Doença foi significativamente menor nos tumores com invasão vascular linfática ($p=0,03$).

Tabela 3. Sobrevivência Global e Sobrevivência Livre de Doença, aos 5 anos, de 49 doentes com carcinoma da cavidade oral, em função das características clínico-patológicas.

	n	Sobrevivência Global aos 5 anos	p^*	Sobrevivência Livre de Doença aos 5 anos	p^*
Género					
Masculino	29	37,9%	0,86	44,5%	0,45
Feminino	20	26,3%		41,3%	
Idade					
<63 anos	34	47,6%	<u>0,04</u>	50,4%	0,559
≥63 anos	15	26,0%		36,3%	
Estádio					
II	40	41,1%	<u>0,002</u>	47,8%	0,052
III	9	11,1%		17,5%	
Local					
Língua	32	38,7%	0,8	48,0%	0,532
Pavimento da boca	5	40%		50,0%	
Gengiva inf.	2	0%		0%	
Trigono	3	33,3%		33,3%	
Mucosa jugal	7	28,6%		38,1%	
Invasão vascular linfática, n(%)					
Não obs	42	36,6%	0,1	46,9%	0,032
Sim	3	0%		0%	

*Teste Log Rank ou Breslow

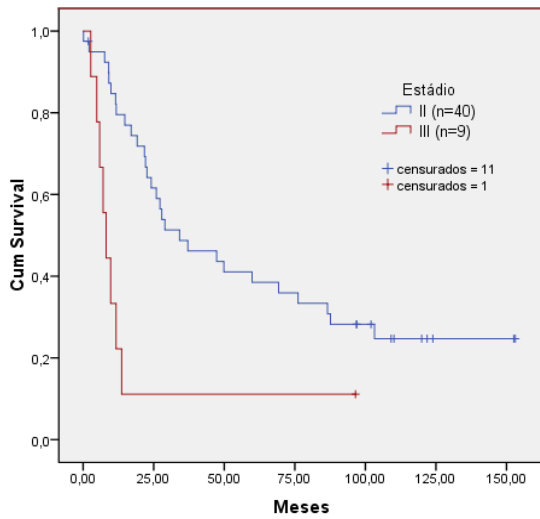


Figura 6. Sobrevivência Global em função do estágio (Log-Rank/ Breslow: $p= 0.002$)

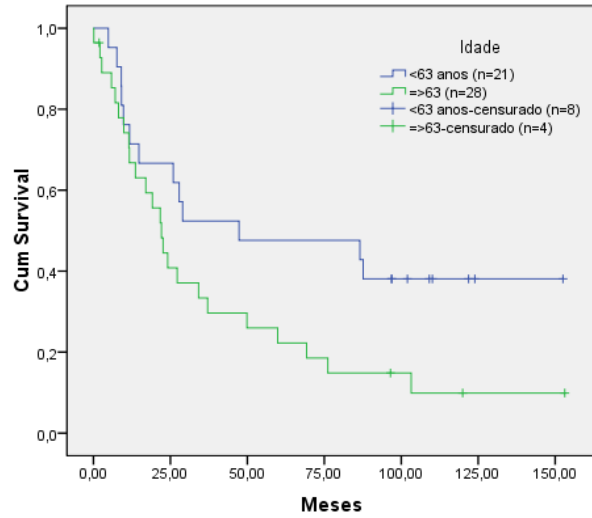


Figura 7. Sobrevivência Global em função da idade (Log-Rank/ Breslow: $p=0.04$)

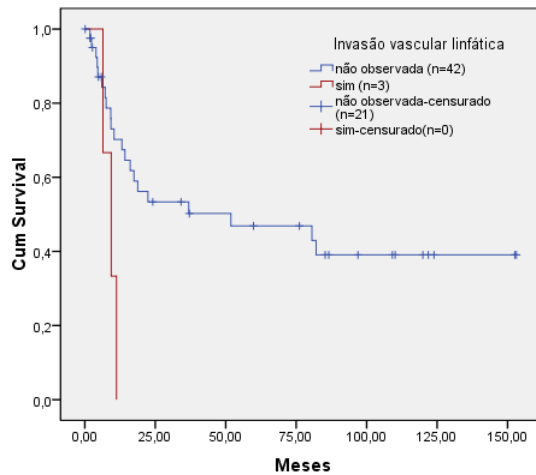


Figura 8. Sobrevivência Livre de Doença em função da invasão vascular linfática (Log-Rank/ Breslow: $p=0,03$)

4.2. Expressão do RKIP no tumor e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:

Verificamos que na mucosa normal o RKIP apresentava uma marcação citoplasmática e tinha um padrão de expressão heterogêneo em todas as amostras, havendo aumento de expressão na camada basal. No estroma evidenciamos menor expressão ou ausência da mesma, contrastando com uma expressão positiva em tecido muscular e nos nervos. Sendo que este padrão de expressão tenha sido considerado como o normal. No que respeita à expressão de RKIP no tumor, 78% (n=38) das amostras apresentaram expressão positiva, 18% (n=9) expressão heterogênea e 4% (n=2) expressão negativa.

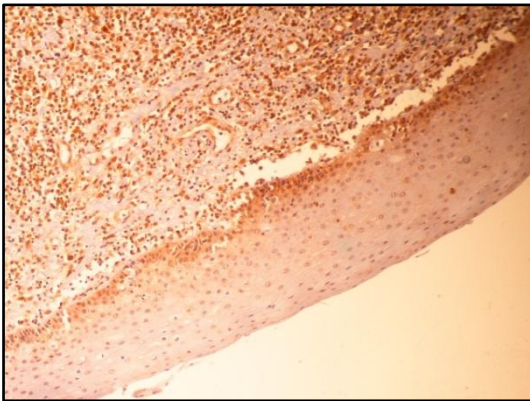


Figura 9. Expressão de RKIP na mucosa normal. (10x)

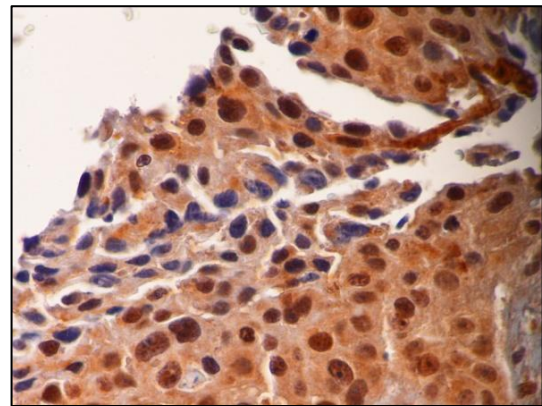


Figura 10. Expressão heterogênea de RKIP no tumor. (carcinoma da cavidade oral) (40x)

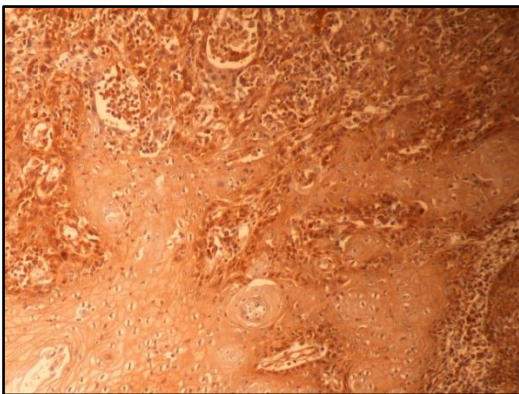


Figura 11. Expressão positiva de RKIP no tumor. (carcinoma da cavidade oral) (10x)



Figura 12. Expressão negativa de RKIP no tumor. (carcinoma da cavidade oral) (40x)

A análise dos diferentes padrões de expressão de RKIP no tumor em relação às características clínico-patológicas não revelou qualquer relação entre as variáveis (tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a expressão de RKIP no tumor e as características clínico-patológicas

	Expressão RKIP no tumor			
	Negativa	Heterogénea	Positiva	p*
Gênero, n(%)				
Feminino	1 (50%)	4 (44%)	15 (54%)	0,9
Masculino	1 (50%)	5 (56%)	23 (46%)	
Idade, n(%)				
<63	1 (50%)	4 (44%)	16 (42%)	0,9
≥63	1 (50%)	5 (56%)	22 (58%)	
Estádio, n(%)				
II	1 (50%)	8 (89%)	31 (82%)	0,4
III	1 (50%)	1 (11%)	7 (18%)	
Local, n(%)				
Língua	2 (100%)	7 (78%)	23 (60%)	0,9
Pavimento da boca	0 (0%)	1 (11%)	4 (11%)	
Gengiva inf.	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	
Trigono	0 (0%)	0 (0%)	3 (8%)	
Mucosa jugal	0 (0%)	1 (11%)	6 (16%)	
Invasão perineural, n(%)				
Sim	2 (100%)	0 (0%)	6 (85%)	0,57
Não	0 (0%)	0 (0%)	1 (15%)	
1ª Recorrência, n(%)				
Local	-	4 (67%)	10 (48%)	0,3
Regional	-	2 (33%)	11 (52%)	

*Teste de Qui-Quadrado (X^2)

4.3. Significado de prognóstico da expressão de RKIP no tumor:

A expressão do RKIP no tumor apresentou uma associação estatisticamente significativa com a Sobrevivência Global ($p=0,001$). Sendo que ausência de expressão de RKIP leva a uma pior Sobrevivência Global.

Não foi verificada qualquer associação entre a variável em estudo e a Sobrevivência Livre de Doença.

Tabela 5. Sobrevivência Global e Sobrevivência Livre de doença, aos 5 anos, em função da expressão de RKIP no tumor em 49 casos de carcinoma da cavidade oral.

		n	Sobrevivência Global aos 5 anos	p^*	Sobrevivência Livre de Doença aos 5 anos	p^*
Expressão do RKIP	Sem expressão	2	0%	0,001	-	0,7
	Heterogénea	9	22,2%		38,9	
	Positiva	38	40,6%		44,9	

*Teste de Log-Rank ou Breslow

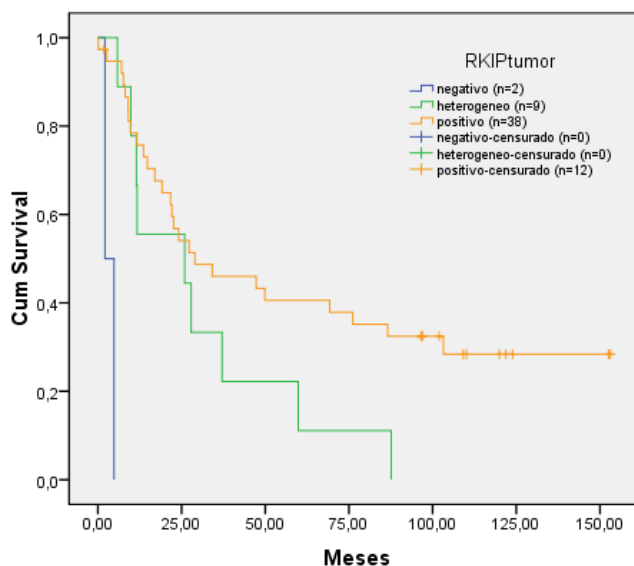


Fig 13. Sobrevivência Global em relação à expressão do RKIP no tumor (Log-Rank/Breslow: $p=0,001$).

4.4. Expressão do RKIP na frente de invasão e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:

Pela análise da expressão de RKIP na frente de invasão, três formas diferentes de expressão. Em 4% (n=2) das amostras não se verificou expressão de RKIP, 51% (n=25) dos casos apresentaram expressão positiva e 45% (n=22) dos casos apresentaram expressão heterogênea.

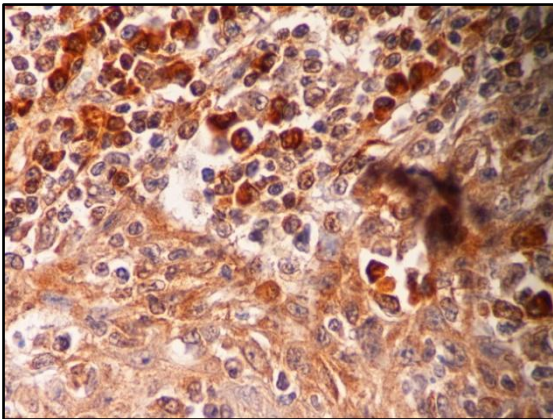


Figura 14. Expressão de RKIP heterogênea na frente de invasão de carcinoma da cavidade oral. (40x)

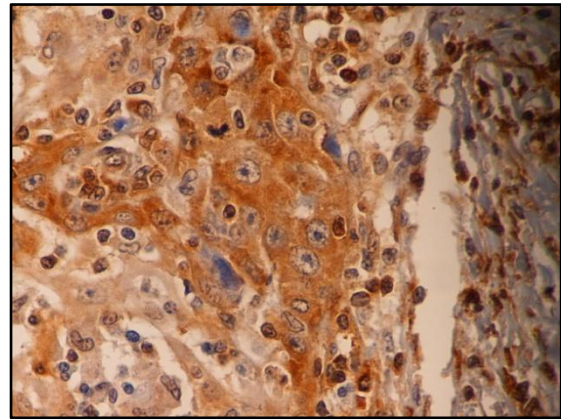


Figura 15. Expressão de RKIP positiva, na frente de invasão de carcinoma da cavidade oral. (40x)

Apenas verificamos associação entre os níveis de expressão de RKIP na frente de invasão e a localização do tumor ($p=0,047$). Para todas as outras características clínico-patológicas não se verificou qualquer associação (tabela 6).

Tabela 6. Relação entre a expressão de RKIP na frente de invasão e as características clínico-patológicas.

	Expressão RKIP Frente invasão			
	Negativa	Heterogénea	Positiva	p^*
Género, n(%)				
Feminino	0 (0%)	10 (45%)	10 (40%)	0,45
Masculino	2 (100%)	12 (55%)	15 (60%)	
Idade, n(%)				
<63	0 (0%)	8 (36%)	13 (52%)	0,25
≥63	2 (100%)	14 (64%)	12 (48%)	
Estádio, n(%)				
II	1 (50%)	17 (77%)	22 (88%)	0,31
III	1 (50%)	5 (23%)	3 (12%)	
Local, n(%)				
Língua	1 (50%)	14 (63%)	17 (68%)	<u>0,047</u>
Pavimento da boca	0 (0%)	2 (9%)	3 (12%)	
Gengiva inf.	1 (50%)	0 (0%)	1 (4%)	
Trigono	0 (0%)	3 (14%)	0 (0%)	
Mucosa jugal	0 (0%)	3 (14%)	4 (16%)	
Invasão perineural, n(%)				
Sim	1 (100%)	1 (50%)	6 (100%)	0,14
Não	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	
1ª Recorrência, n(%)				
Local	0 (0%)	7 (54%)	7 (54%)	0,57
Regional	1 (100%)	6 (46%)	6 (46%)	

*Teste de Qui-Quadrado (X^2)

4.5. Significado de prognóstico para a expressão de RKIP na frente de invasão:

Quando analisada a Sobrevivência Global em função da expressão de RKIP na frente de invasão verificamos uma relação estatisticamente significativa ($p=0,012$). Os casos que não apresentaram expressão de RKIP tinham pior sobrevivência global.

Pela análise da Sobrevivência Livre de Doença em função da expressão de RKIP, não se verificou qualquer associação entre as duas variáveis.

Tabela 7. Sobrevivência Global e Sobrevivência Livre de doença, aos 5anos, em função da Expressão de RKIP na frente de invasão em 49 casos de carcinoma da cavidade oral.

		n	Sobrevivência Global aos 5 anos	p^*	Sobrevivência Livre de Doença aos 5 anos	p^*
Expressão do RKIP na frente de invasão	Sem expressão	2	0%	<u>0,012</u>	0%	0,4
	Heterogénea	22	22,7%		39,2%	
	Positiva	25	50,1%		50,2%	

*Teste de Log-Rank ou Breslow

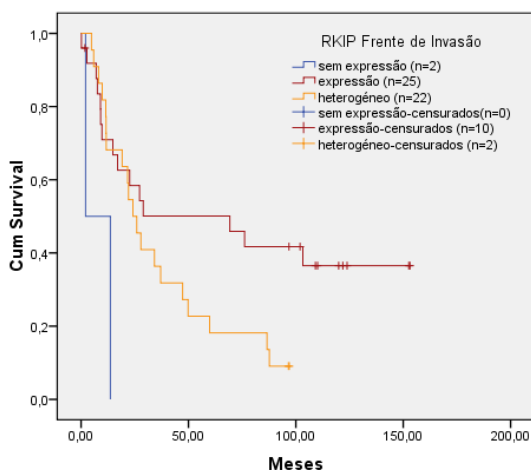


Fig 16. Sobrevivência Global em relação à expressão do RKIP na frente invasão (Log-Rank/ Breslow: $p=0,012$)

Quando analisada a Sobrevivência Global em função da expressão do RKIP associado à permeação perineural, verificou-se que nos casos que apresentavam permeação perineural e expressão positiva de RKIP tinham maior Sobrevivência Global ($p=0,006$) (Fig.17).

O mesmo aconteceu quando estudamos a Sobrevivência Global em relação à expressão de RKIP associado às margens. Nas amostras que expressavam RKIP e tinham margens livres havia maior sobrevivência ($p= 0,049$) bem como nas amostras que expressavam RKIP e tinham margens positivas ($p=0,018$).

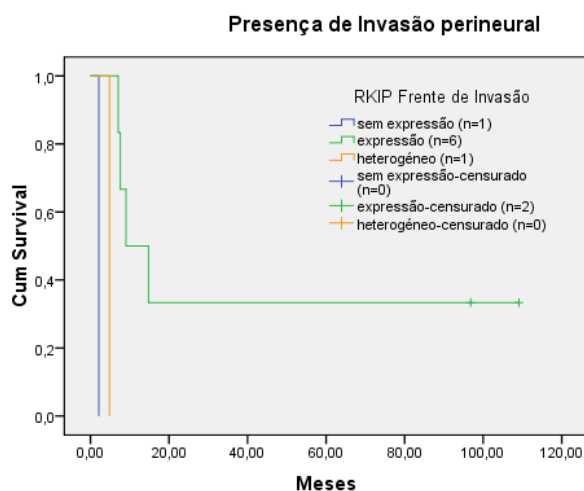


Fig 17. Sobrevivência Global em função da expressão do RKIP na frente de invasão com a respectiva associação à invasão perineural (Log-Rank: $p=0,006$)

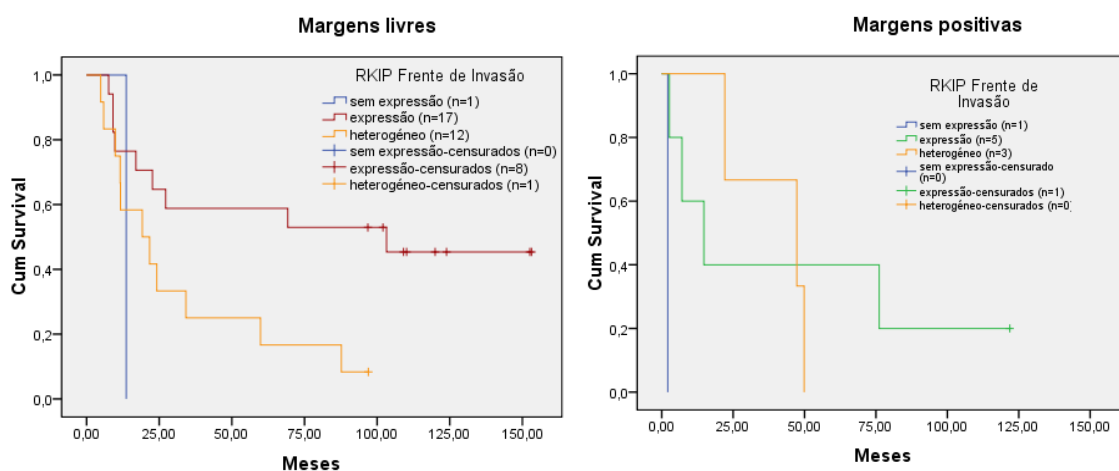


Fig 18 e 19. Sobrevivência global em relação à expressão do RKIP na frente de invasão com a respectiva associação às margens livres ou positivas (Log-Rank/Breslow: $p=0,049$ e $p= 0,018$ respectivamente).

4.6. Correlação entre expressão do RKIP na frente de invasão e no tumor

Quando estudamos a relação entre a expressão do RKIP no tumor e a expressão na frente de invasão verificamos uma associação entre as duas variáveis ($p=0,001$). Verificamos que os casos que apresentavam expressão positiva de RKIP no tumor apresentam uma tendência para perder expressão na frente de invasão. Dos 38 casos com expressão positiva de RKIP no tumor, 12 casos passam a heterogêneos na frente de invasão e 1 caso perde expressão de RKIP.

Tabela 8. Expressão do RKIP no tumor em função da expressão de RKIP na frente de invasão.

		RKIPfritnv			p^*
		sem expressão	heterogêneo	positivo	
RKIPtumor	negativo	1	1	0	0,001
	heterogeneo	0	9	0	
	positivo	1	12	25	
Total		2	22	25	

*Teste de Pearson's Qui-Quadrado (X^2)

4.7. Expressão do CD147 e a sua relação com os parâmetros clínico-patológicos:

Verificamos marcação positiva de CD147 em todos os 49 casos de carcinoma da cavidade oral. Apresentando o CD147 uma marcação membranar e por vezes citoplasmática no tumor (Fig.21). Na mucosa normal encontrada nas mesmas amostras verificou-se expressão da proteína apenas na camada basal (fig.20).

Em 73,4% (n=36) dos casos encontraram-se os maiores níveis de expressão da proteína, 14,2% (n=7) dos casos apresentam níveis de expressão intermédios e 12,2% (n=6) dos casos estudados apresentam níveis mais baixos.

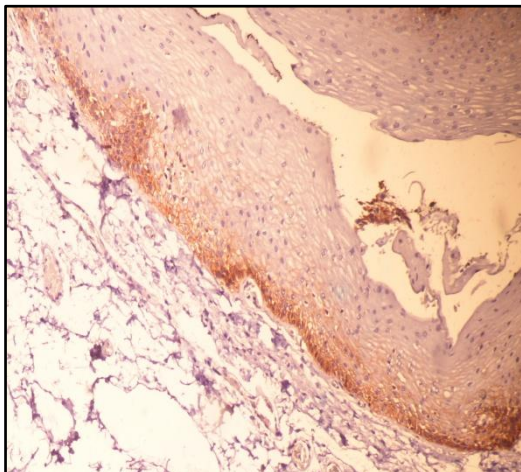


Figura 20. Expressão de CD147 na mucosa normal. (10x)

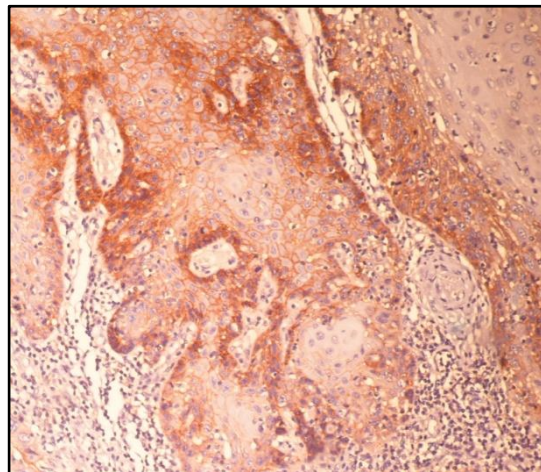


Figura 21. Expressão de CD147 no tumor. (carcinoma da cavidade oral) (10x).

Em relação às características clínico-histopatológicas apenas se verificou correlação estatisticamente significativa entre alta expressão do CD147 e a 1ª recorrência ($p=0,03$). Em todos os outros parâmetros não se verificou qualquer associação (tabela 9).

Tabela 9. Relação entre a expressão de CD147 e as características clínico-patológicas

	Expressão RKIP no tumor			
	Negativa	Heterogénea	Positiva	p^*
Género, n(%)				
Feminino	1 (50%)	4 (44%)	15 (54%)	0,9
Masculino	1 (50%)	5 (56%)	23 (46%)	
Idade, n(%)				
<63	1 (50%)	4 (44%)	16 (42%)	0,9
≥63	1 (50%)	5 (56%)	22 (58%)	
Estádio, n(%)				
II	1 (50%)	8 (89%)	31 (82%)	0,4
III	1 (50%)	1 (11%)	7 (18%)	
Local, n(%)				
Língua	2 (100%)	7 (78%)	23 (60%)	0,9
Pavimento da boca	0 (0%)	1 (11%)	4 (11%)	
Gengiva inf.	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	
Trigono	0 (0%)	0 (0%)	3 (8%)	
Mucosa jugal	0 (0%)	1 (11%)	6 (16%)	
Invasão perineural, n(%)				
Sim	2 (100%)	0 (0%)	6 (85%)	0,57
Não	0 (0%)	0 (0%)	1 (15%)	
1ª Recorrência, n(%)				
Local	-	4 (67%)	10 (48%)	0,3
Regional	-	2 (33%)	11 (52%)	

*Teste de Qui-Quadrado (X^2)

4.8. Significado de prognóstico da expressão de CD147:

Na análise da Sobrevivência Global em função da expressão da expressão do CD147 também não foi verificada qualquer associação ($p=0,24$) e o mesmo ocorreu para a Sobrevivência Livre de Doença ($p=0,48$).

		n	Sobrevivência Global aos 5 anos	p^*	Sobrevivência Livre de Doença aos 5 anos	p^*
Score CD147	6,00	6	16,7%	0,24	25,0%	0,4
	9,00	7	14,3%		50%	
	12,00	36	42,9%		45,4%	

*Teste de Log-Rank ou teste de Breslow

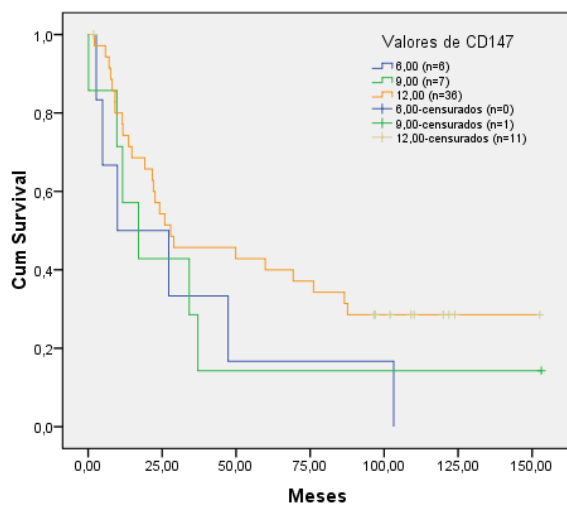


Fig 22. Sobrevivência Global em função da expressão do CD147 (Log-Rank/ Breslow: $p=0.24$)

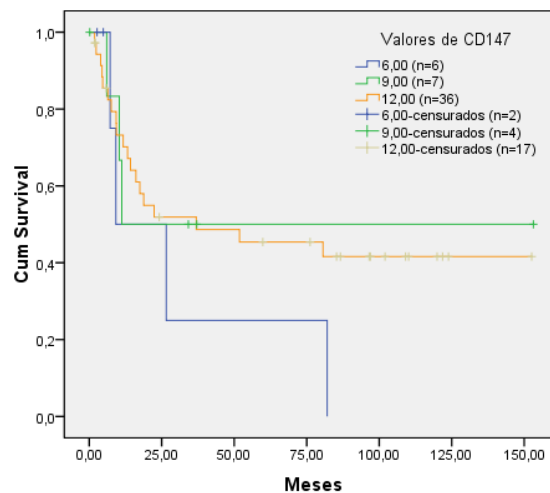


Fig 23. Sobrevivência Livre de Doença em função da expressão do CD147 (Log-Rank/ Breslow: $p=0,4$)

4.9. Correlação entre expressão do CD147 e a expressão do RKIP na frente de invasão e no tumor:

Para avaliar a correlação entre a expressão do RKIP e CD147, foi realizada uma análise de correlação de Pearson's Qui-Quadrado. Os resultados não verificaram correlação estatisticamente significativa entre as variáveis. Entre o CD147 e RKIP na frente de invasão o $p=0,660$ e entre CD147 e RKIP no tumor o $p=0,44$.



Discussão

Neste trabalho procurou-se investigar o significado de prognóstico das variáveis clínico-patológicas numa amostra de 49 doentes com carcinoma da cavidade oral e avaliar o perfil de expressão do CD147 e do RKIP na mucosa normal, no tumor e na frente de invasão tumoral. A Sobrevida Livre de Doença e a Sobrevida Global em função da expressão de CD147 e RKIP no tumor e na frente de invasão tumoral também foram objecto de estudo.

Como o carcinoma da cavidade oral tem tendência a invadir localmente e como nestes casos havia ausência de metastases, levou a que nos concentrássemos no estudo do processo que antecede a metastização, a invasão.

Este é o primeiro estudo que analisa expressão da proteína RKIP em carcinomas da cavidade oral. O RKIP é uma proteína de ligação da fosfatidiletanolamina com capacidade de se ligar e inibir a cinase Raf. Esta proteína está associada a algumas doenças como a diabetes, doenças neurodegenerativas e também neoplasias [102,103]. A proteína RKIP encontra-se envolvida no controlo de vias de transdução de sinal após estímulo externo à célula. Quando presente inibe a transdução do sinal, sendo responsável por menor taxa de proliferação, diferenciação celular e instabilidade genómica, contribuindo para a homeostase celular [46,51,49].

No nosso estudo verificamos expressão positiva da proteína RKIP na mucosa normal, e aumento de intensidade de expressão nas células basais. O estroma é na sua maioria negativo, realçando uma expressão intensamente positiva no tecido muscular e nos nervos.

Este perfil de expressão na mucosa normal é semelhante ao encontrado noutros estudos [63].

Na maioria das amostras a expressão de RKIP no tumor apresentava expressão positiva 78% (n=38), seguida de uma expressão heterogénea em 18% (n=9) e apenas 4% (n=2) dos casos com expressão negativa. Mantendo-se o perfil de expressão encontrado na mucosa normal. Estes resultados contrastam com os descritos em vários outros estudos envolvendo tumores da próstata [55], colórectal [56,57], gástrico [57], mama [59,60] e nasofaringe [61] onde se verificou que a expressão de RKIP se encontrava diminuída ou ausente na maioria das amostras. O que levanta a possibilidade de existir uma via alternativa para a activação do ERK, sem ser pela activação do Raf-1 e também o facto de poderem ocorrer mutações no B-Raf que levem a activação do ERK independente de RKIP [104,105,106].

Quando analisamos a expressão de RKIP na frente de invasão, verificamos que a maioria dos casos apresentava expressão positiva, 51,02% (n=25), ou expressão

heterogénea 44,89% (n=22). Havendo algumas diferenças em relação à expressão do RKIP no tumor.

Pela análise da expressão do RKIP no tumor em função da expressão de RKIP na frente de invasão verificamos uma associação entre as duas variáveis. Tendo-se observado que expressão positiva no tumor tem tendência para negativar na frente de invasão. Esta perda de expressão pode ser explicada por metilação do gene promotor, mutação ou mutação pós-transcrição [107,108]. Num estudo envolvendo carcinomas gástricos verificou-se que 21% destes tumores apresentam perda do alelo que contém o gene RKIP [108].

Por outro lado esta perda de expressão pode ser explicada pela presença de dois tipos de células na frente de invasão que sofreram transição epitelial para mesenquimal (EMT), podendo estas ser células do tumor ou células recrutadas para o local [109].

Das variáveis clínico-patológicas, revelaram-se variáveis associadas a uma menor Sobrevivência Global a idade ≥ 63 e o estágio III. Estes resultados também foram verificados por outros autores [110,111,112].

No que respeita ao estágio estes resultados vão em acordo com outros estudos onde se verificou que em estádios iniciais as taxas de sobrevivência são melhores [113]. Já para a idade ainda existe muita discordância em relação ao assunto. Apenas foi encontrada associação significativa em estudos de grande dimensão realizados pelo SEER (Surveillance Epidemiology and End Result) sugerem que doentes com idade mais avançada têm pior sobrevivência [114].

A sobrevivência livre de doença foi significativamente menor nos casos com invasão vascular linfática sendo estes resultados sobreponíveis em vários trabalhos Autores [110,111,112]. Para as outras variáveis clínico-patológicas não verificámos qualquer associação.

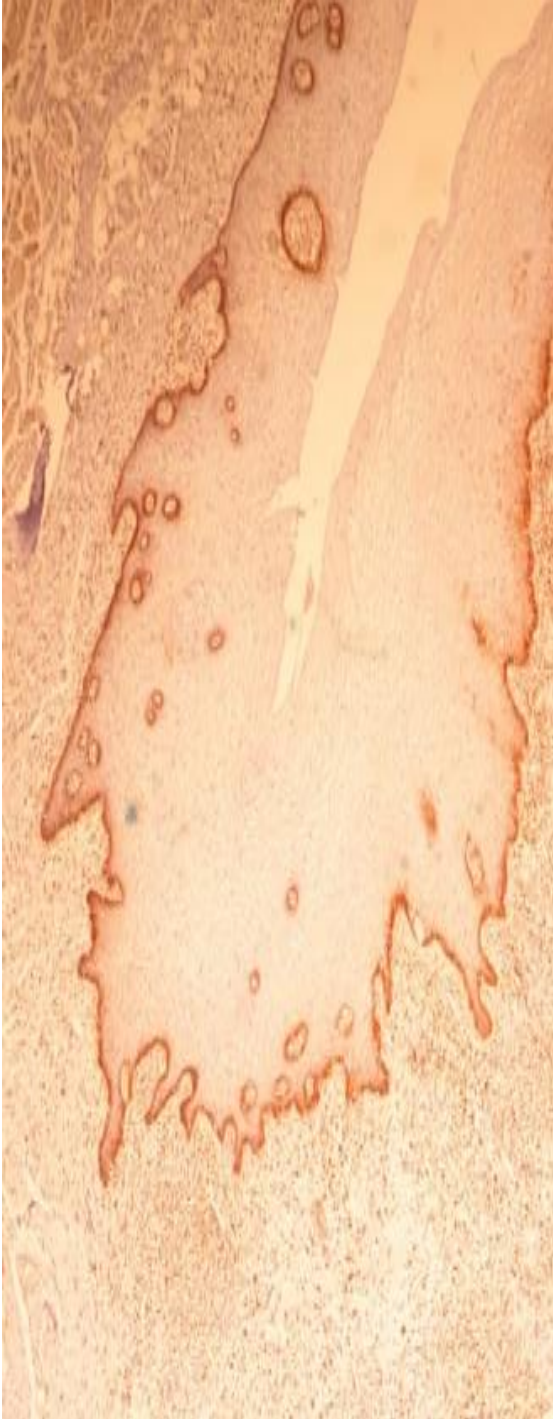
Pela análise da expressão de RKIP no tumor em função das características clínico-patológicas não foi identificada qualquer relação. Mas pela análise da Sobrevivência Global em função da expressão de RKIP no tumor, verificamos uma associação estatisticamente significativa. Sendo que a ausência de expressão de RKIP leva a uma pior Sobrevivência Global. Estes resultados vão de acordo com outros estudos realizados em doentes com cancro da próstata, colorectal ou gástrico em que se verifica o mesmo resultado [55,56,57,115]. Pondo-se a hipótese de que o RKIP tem um papel na progressão da doença.

Também verificamos uma relação estatisticamente significativa entre a Sobrevivência Global e a expressão de RKIP na frente de invasão, sendo que os casos que não apresentaram expressão de RKIP também tinham pior sobrevivência, tal como foi verificado noutros estudos [55,56,57,115]. Já a expressão positiva de RKIP na frente de invasão em casos com invasão perineural positiva, margens livre, e margens positivas correlacionou-se com uma melhor sobrevivência global.

No que respeita ao CD147 verificamos expressão positiva nas células basais da mucosa normal, em hiperplasia de carcinomas da cavidade oral e expressão positiva de CD147 em todos os casos de carcinoma da cavidade oral. Em estudos anteriores o mesmo se tinha verificado, nomeadamente num estudo em que se analisa o papel do aumento da expressão de CD147 durante a carcinogénese oral [116], onde a expressão nos três tecidos descritos anteriormente foi semelhante. Em carcinoma da bexiga e carcinoma das células escamosas do colo uterino também se havia verificado sobreexpressão de CD147 [100,101]. Pelo que o CD147 terá um papel na progressão tumoral.

Em relação aos parâmetros clinicopatológicos apenas se verificou correlação entre alta expressão de CD147 e a 1ª recorrência. Podendo ser explicado, pelo facto de a sobreexpressão do CD147 estar associada a altos níveis de secreção de MMPs que permitem, através da degradação da membrana basal, que as células tumorais se libertem do local do tumor primário, levando assim à invasão e mestastização [101].

Não verificamos qualquer relação entre a sobrevivência e a expressão de CD147. Contrariamente ao que se verificou em tumores da bexiga e da nasofaringe onde foi apresentada uma relação estatisticamente significativa entre alta expressão de CD147 e menor sobrevivência global bem como com maior número de metastizações [100,117]. Nestes estudos o número de casos estudados é maior comparando com o nosso estudo de apenas 49 amostras, podendo ter alguma influência nos resultados.



Conclusão

O estágio III, a idade superior a 63 anos e a invasão vascular linfática são factores de prognóstico no carcinoma da cavidade oral.

O RKIP apresenta maioritariamente expressão positiva no tumor e na frente de invasão, sendo a sua expressão um factor de prognóstico independente e possivelmente um alvo terapêutico. Mas são ainda necessários mais estudos na determinação dos factores que regulam a sua expressão.

O CD147 encontra-se sobreexpresso em carcinoma da cavidade oral e a sua alta expressão correlaciona-se com a 1ª recorrência. No entanto não é factor de prognóstico neste tipo de tumor. Devido ao número limitado de amostras, futuros estudos em larga escala deverão ser realizados.



Referências

- [1] Day T., Deschler D., Kies M. TNM Staging of the Head and Neck Cancer and Neck Dissection Classification. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc. 9.2008.
- [2] DeVita V., Lawrence T., Rosenberg S. Cancer Principles & Practice of Oncology, 8^o Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2008. 802-820.
- [3] Drake R., Vogl W. A., Mitchell A. Gray's Anatomy for Students. Churchill Livingstone. 2004. 932-1012.
- [4] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. 2008 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>
- [5] RORENO - Registo Oncológico da Região Norte. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro do Porto, 2006.
- [6] Kuma V., Abbas A., Fausto N., Mitchell R. Robbins Basic Pathology. Saunders/Elsevier, 2007.
- [7] Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Onco*;1(1), 2000, 37–42.
- [8] A. M. Goldstein, W. J. Blot, R. S. Greenberg et al., “Familial risk in oral and pharyngeal cancer,” *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, vol. 30, no. 5, 1994, pp. 319–322.
- [9] R. Ankathil, A. Mathew, F. Joseph, and M. K. Nair, “Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families,” *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, vol. 32, no. 1, 1996, pp. 63–67.
- [10] M. Sato, T. Sato, T. Izumo, and T. Amagasa, “Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer,” *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 10, 1999, pp. 1927–1931.

- [11] T. T. Sreelekha, K. Ramadas, M. Pandey, G. Thomas, K. R. Nalinakumari, and M. R. Pillai, "Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer," *Oral Oncology*, vol. 37, no. 7, 2001, pp. 593–598.
- [12] L. C. Harty, N. E. Caporaso, R. B. Hayes et al., "Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 22, 1997, pp. 1698–1705.
- [13] P. Brennan, S. Lewis, M. Hashibe et al., "Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review," *American Journal of Epidemiology*, vol. 159, no. 1, 2004, pp. 1–16.
- [14] L. Mao and W. K. Hong, "How does human papillomavirus contribute to head and neck cancer development?" *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, no. 13, 2004, pp. 978–979.
- [15] K. K. Ang, J. Harris, R. Wheeler et al., "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 1, 2010, pp. 24–35.
- [16] Dye BA, Wang R, Lashley R, Wei W, Abnet CC, Wang G, et al. Using NHANES oral health examination protocols as part of an esophageal cancer screening study conducted in a high-risk region of China. *BMC Oral Health*, 17, 2007, 7–10.
- [17] Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*, 166(10), 2007, 1159–73.
- [18] S. Warnakulasuriya, N. W. Johnson, and I. van der Waal, "Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa," *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 36, no. 10, 2007, pp. 575–580.
- [19] Cassidy J., Bissett D., Obe R. Oxford handbook of oncology. Oxford University Press, 2002. 448-449.

- [20] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 45 (4 5), 2009, 301–8.
- [21] Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 10(6), 2004, 346–8.
- [22] Milian A, Bagan JV, Vera F. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a follow up study of 85 cases and analysis of prognostic variables. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*, 36(1–2), 1993, 29–35.
- [23] G. L. Day, W. J. Blot, D. F. Austin et al., “Racial differences in risk of oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco, and other determinants,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no. 6, 1993, pp. 465–473.
- [24] H. F. Stich, A. P. Hornby, and B. P. Dunn, “A pilot betacarotene intervention trial with inuits using smokeless tobacco,” *International Journal of Cancer*, vol. 36, no. 3, 1985, pp. 321–327.
- [25] H. F. Stich, M. P. Rosin, A. P. Hornby, B.Mathew, R. Sankaranarayanan, and M. K. Nair, “Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A,” *International Journal of Cancer*, vol. 42, no. 2, 1988, pp. 195–199.
- [26] S. E. Benner, M. J. Wargovich, S. M. Lippman et al., “Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alphotocopherol treatment of oral leukoplakia,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 3, no. 1, 1994, pp. 73–76.
- [27] C. Scully, J. Sudbo, and P.M. Speight, “Progress in determining the malignant potential of oral lesions,” *Journal of Oral Pathology and Medicine*, vol. 32, no. 5, 2003, pp. 251–256.
- [28] J. J. Lee, W. K. Hong, W. N. Hittelman et al., “Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research,” *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no.5, 2000, pp. 1702–1710.

- [29] Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351 Pt 2, 2000, 289-305.
- [30] O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer*, 90, 2004, 283–288
- [31] Moodie, S. A. and Wolfman, A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10, 1994, 44-48.
- [32]. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351, 2000, 289-305.
- [33]. Hagan S, Garcia R, Dhillon A, Kolch W. Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymol* 407, 2006, 248-59.
- [34]. Kolch W *et al.* Meaningful relationships: the regulation of the Ras/ Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351(Pt 2), 2000, 289–305.
- [35]. Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*, 5, 1990, 345–351
- [36]. Barnier JV, Papin C, Eychène A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissuespecific expression. *J Biol Chem*, 270, 1995, 23381–23389.
- [37]. Lockett JC, Hüser MB, Giagtzoglou N, Brown JE, Pritchard CA. Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ*, 11, 2000,163–171.
- [38] Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1998, 1447-1455.
- [39] Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 1998, 49-139.

- [40]. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56, 2001,127–155.
- [41] Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, Moffit JS, Boekelheide K. Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal* 20(1), 2008, 1-9.
- [42] Serre L, Pereira de Jesus K, Zelwer C, Bureau N, Schoentgen F, Bénédicti H. Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J Mol Biol* 310(3), 2001, 617-34.
- [43] Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401(6749), 1999, 173-7.
- [44] Frayne J, McMillen A, Love S, Hall L. Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides. *Mol Reprod Dev* 49(4), 1998, 454-60.
- [45] Frayne J, Ingram C, Love S, Hall L. Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat. *Cell Tissue Res* 298(3), 1999, 415-23.
- [46] Zeng L, Imamoto A, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 12(10), 2008, 1275-87.
- [47] Beshir AB, Ren G, Magpusao AN, Barone LM, Yeung KC, Fenteany G. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- κ B-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett* 28;299(2), 2010, 137-49.
- [48]. Simister PC, Banfield MJ, Brady RL. The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 2002, 1077-80.
- [49]. Odabaei G, Chatterjee D, Jazirehi AR, Goodglick L, Yeung K, Bonavida B. Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. *Adv Cancer Res* 91, 2004, 169-200.
- [50]. Park S, Yeung ML, Beach S, Shields JM, Yeung KC. RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 24, 2005, 3535-40.

- [51] Granovsky AE, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Res* 8(4), 2008, 452-7.
- [52] Trakul N, Menard RE, Schade GR, Qian Z, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation. *J Biol Chem* 2005; **280**:24931-24940.
- [53] . Krosiak T, Koch T, Ka h l E, Ho l l t V. Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 276, 2001, 39772– 39778.
- [54]. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 21, 2001, 7207–7217.
- [55]. Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66, 2006, 248–256.
- [56]. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, et al. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 24, 2006, 5672–5679.
- [57]. Minoo P, Zlobec I, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Loss of Raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 127, 2007, 820–827.
- [58]. Wang J, Yang YH, Wang AQ, et al. Immunohistochemical detection of the Raf kinase inhibitor protein in nonneoplastic gastric tissue and gastric cancer tissue. *Med Oncol* 27, 2010, 219–223.
- [59]. Li HZ, Gao Y, Zhao XL, Liu YX, Sun BC, Yang J, Yao Z. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human breast cancer. *Mol Cancer Res* 7, 2009, 832–840.
- [60]. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11,2005, 7392–7397.

- [61]. Chen Y, Ouyang GL, Yi H, et al. Identification of RKIP as an invasion suppressor protein in nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis. *J Proteome Res* 7, 2008, 5254–5262.
- [62] Zaravinos A, Kanellou P, Baritaki S, Bonavida B, Spandidos DA. BRAF and RKIP are significantly decreased in cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Cycle* 8(9), 2009, 1402-8.
- [63] Kim HS, Kim GY, Lim SJ, Kim YW. Raf-1 kinase inhibitory protein expression in thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 21(4), 2010, 253-7.
- [64]. Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66, 2006, 248–56.
- [65] Fu Z, Smith P, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 95, 2003, 878–89.
- [66] Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, et al. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 2004, 17515–23.
- [67] Ruan L, Wang GL, Yi H, Chen Y, Tang CE, Zhang PF, Li MY, Li C, Peng F, Li JL, Chen ZC, Xiao ZQ. Raf kinase inhibitor protein correlates with sensitivity of nasopharyngeal carcinoma to radiotherapy. *J Cell Biochem* 110(4), 2010, 975-81.
- [68] D. Chatterjee, Y. Bai, Z. Wang, S. Beach, S. Mott, R. Roy, C. Braastad, Y. Sun, A. Mukhopadhyay, B.B. Aggarwal, J. Darnowski, P. Pantazis, J. Wyche, Z. Fu, Y. Kitagawa, E.T. Keller, J.M. Sedivy, K.C. Yeung, RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279, 2004, 17515–17523.
- [69] M.M. Schuierer, F. Bataille, S. Hagan, W. Kolch, A.K. Bosserhoff, Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines, *Cancer Res.* 64, 2004, 5186–5192.
- [70] Li HZ, Wang Y, Gao Y et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 6, 2008, 917–928.

- [71] Y. Chen, G.L. Ouyang, H. Yi, M.Y. Li, P.F. Zhang, C. Li, J.L. Li, Y.F. Liu, Z.C. Chen, Z.Q. Xiao, Identification of RKIP as an invasion suppressor protein in nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis, *J. Proteome Res.* 7, 2008, 5254–5262.
- [72] Beshir AB, Ren G, Magpusao AN, Barone LM, Yeung KC, Fenteany G. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- κ B-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett.* 28;299(2), 2010,137-49.
- [73] Biswas C, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55, 1995, 434–9.
- [74] S. Fossum, S. Mallett, A.N. Barclay, The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence, *Eur. J. Immunol.* 21, 1991, 671–679.
- [75] T. Miyauchi, Y. Masuzawa, T. Muramatsu, The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen, *J. Biochem.* 110, 1991, 770–774.
- [76] W. Kasinrerker, E. Fiebiger, I. Stefanova, T. Baumruker, W. Knapp, H. Stockinger, Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule, *J. Immunol.* 149, 1992, 847–854.
- [77] C. Biswas, Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, K. Nabeshima, The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily, *Cancer Res.* 55, 1995, 434–439.
- [78] C. Biswas, M.A. Nugent, Membrane association of collagenase stimulatory factor(s) from B-16 melanoma cells, *J. Cell. Biochem.* 35, 1987, 247–258.

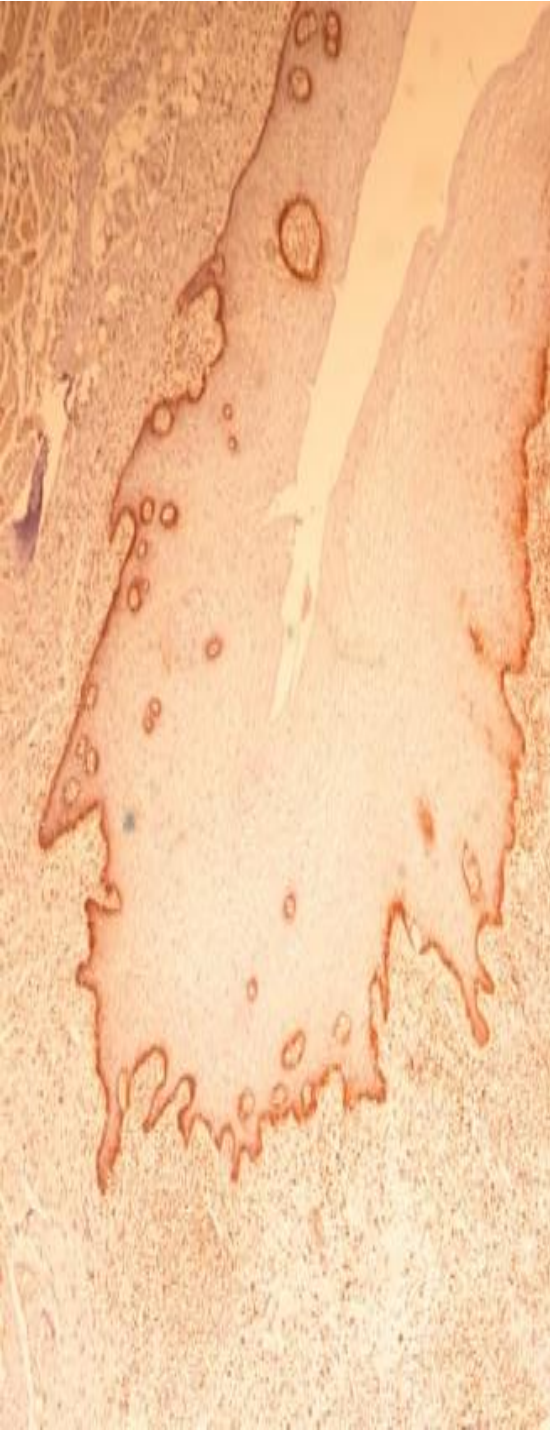
- [79] H. Seulberger, C.M. Unger, W. Risau, HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47—many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood–brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons, *Neurosci. Lett.* 140, 1992, 93–97.
- [80] C.L. Nehme, B.E. Fayos, J.R. Bartles, Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation, *Biochem. J.* 310 (Pt 2), 1995, 693–698.
- [81] H. Guo, S. Zucker, M.K. Gordon, B.P. Toole, C. Biswas, Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 272, 1997, 24–27.
- [82] P. Kirk, M.C. Wilson, C. Heddle, M.H. Brown, A.N. Barclay, A.P. Halestrap, CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression, *EMBO J.* 19, 2000, 3896–3904.
- [83] DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B, Biswas G. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol* 106, 1996, 1260–1265.
- [84] Huet E, Gabison EE, Mourah S, Menashi S. Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. *Connect Tissue Res* 49, 2008, 175–179.
- [85] Nakai M, Chen L, Nowak RA. Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: A study using the wild-type and basigin gene knockout mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288, 2006, 527–535.
- [86] K. Arora, W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant, Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses, *J. Immunol.* 175, 2005, 517–522.
- [87] E.A. Marieb, A. Zoltan-Jones, R. Li, S. Misra, S. Ghatak, J. Cao, S. Zucker, B.P. Toole, Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production, *Cancer Res.* 64, 2004, 1229–1232.

- [88]. Zhu P, Ding J, Zhou J, Dong WJ, Fan CM. Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential in monocyte accumulation and metalloproteinase production. *Arthritis Res Ther* 7, 2005, 1023–33.
- [89]. Nabeshima K, et al. EMMPRIN (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int.* 56, 2006, 359–67.
- [90] E. Huet, B. Vallee, D. Szul, F. Verrecchia, S. Mourah, J.V. Jester, T. Hoang-Xuan, S.Menashi, E.E. Gabison, Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling, *FASEB J.* 22 , 2008, 1144–1154.
- [91] K. Nabeshima, J. Suzumiya, M. Nagano, K. Ohshima, B.P. Toole, K. Tamura, H. Iwasaki, M. Kikuchi, Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas, *J. Pathol.* 202, 2004, 341–351.
- [92] Yan L, Zucker S, Toole BP. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 93, 2005,199–204
- [93] Yan, L., Zucker, S., Toole, B.P. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb. Haemost.* 93, 2005, 199–204.
- [94] Tang, Y., Nakada, M.T., Kesavan, P., et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases.*Cancer Res.* 65, 2005, 3193–3199.
- [95] Marieb, E.A., Zoltan-Jones, A., Li, R., et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res.* 64, 2004, 1229–1232.
- [96] Yang, J.M., Xu, Z., Wu, H., et al.. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 1, 2003, 420–427.

- [97]. Li Y, et al. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. *Histopathology* 54, 2009, 677–87.
- [98]. Tan H, Ye K, Wang Z, Tang H. CD147 expression as a significant prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma. *Transl Res.* 152, 2008, 143–9.
- [99]. Klein CA, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol.* 20, 2002, 387–92.
- [100] Xue YJ, Lu Q, Sun ZX. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med Oncol.* 2010.
- [101] Yu W, Liu J, Xiong X, Ai Y, Wang H. Expression of MMP9 and CD147 in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix and their implication. *Pathol Res Pract.* 20(10), 2009, 709-15.
- [102] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000), 2004, 631-9
- [103] Thongboonkerd V, Klein JB. Practical bioinformatics for proteomics. *Contrib Nephrol* 141, 2004, 79–92.
- [104]. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, et al. The RET/PTCRAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 115, 2005, 1068–1081.
- [105]. Cerrato A, De Falco V, Santoro M. Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 43, 2009, 143–155.
- [106]. Peraldi P, Frodin M, Barnier JV, et al. Regulation of the MAP kinase cascade in PC12 cells: B-Raf activates MEK-1 (MAP kinase or ERK kinase) and is inhibited by cAMP. *FEBS Lett* 357, 1995, 290–296.
- [107] Al-Mulla F, Hagan S, Al-Ali W, Jacob SP, Behbehani AI, Bitar MS, Dallol A, Kolch W. Raf kinase inhibitor protein: mechanism of loss of expression and association with genomic instability. *J Clin Pathol* 61, 2008, 524-529.

- [108] Chang YS, Lee KY, Lee SH, Koh SH, Hong SW, Chi SG. Expression and Mutation Analysis of RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) in Human Gastric Cancer. *J Korean Surg Soc.* 73(2), 2007, 121-129.
- [109] Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes & Cancer* 1(5), 2010, 409-420.
- [110]. Chen YW, Yu EH, Wu TH, Lo WL, Li WY, Kao SY. Histopathological factors affecting nodal metastasis in tongue cancer: analysis of 94 patients in Taiwan. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37(10), 2008, 912–6.
- [111] Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg*,122(1), 2000, 44–51.
- [112] Bello O.I, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives (I,II). *Oral Oncology* 46, 2010, 630-643.
- [113] Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer:Clinical features. *Oral Oncology* 46: 414-417, 2010.
- [114] Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 23(4), 2001, 273–9.
- [115] Chatterjee D, Sabo E, Tavares R, Resnick MB. Inverse association between Raf kinase inhibitory protein and signal transducers and activators of transcription 3 expression in gastric adenocarcinoma patients: implications for clinical outcome. *Clin Cancer Res*14, 2008, 2994–3001.
- [116] Vigneswaran N, Beckers S, Waigel S, Mensah J, Wu J, Mo J, Fleisher E. K, Bouquot J, Sacks G. P., Zacharias W. Increased EMMPRIN (CD147) expression during oral carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology* 80, 2006, 147-159.
- [117] Du Z-M, Hu C-F, Shao Q, Huang M-Y, Kou C-W, Zhu X-F, Zeng Y.X, Shao J.Y. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma

enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *Int. J. Cancer* 125, 2009,1832-1841.



Anexos

Anexo I

Sistema de estadiamento TNM para carcinomas do lábio e cavidade oral:

Tumor primário (T)

- Tx Tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Sem evidência de tumor primário
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor com 2 cm ou menos de dimensão
- T2 Tumor maior que 2 cm e até 4 cm de dimensão
- T3 Tumor maior que 4 cm de dimensão
- T4 (lábio) Tumor invade através do osso cortical, nervo alveolar inferior, pavimento bucal.
- T4a (cavidade oral) Tumor invade estruturas adjacentes através do osso cortical e pelo musculo da língua; lesões ressecáveis.
- T4b Tumor envolve o espaço mastigador, a base do crânio; lesões não ressecáveis.

Nódulos linfáticos regionais

- Nx Os nódulos regionais linfáticos não podem ser avaliados.
- N0 Sem metástases nos nódulos regionais linfáticos.
- N1 Metástase num único nódulo linfático ipsilateral com 3cm ou menos de dimensão.
- N2 Metástase num único nódulo linfático ipsilateral com mais de 3cm e até 6cm de dimensão; ou múltiplos nódulos linfáticos ipsilaterais, nenhum com mais de 6cm de dimensão; ou em nódulos linfáticos bilaterais ou contralaterais, nenhum com mais de 6cm de dimensão.
- N2a Metástases num único nódulo linfático ipsilaterais, com mais de 3cm e até 6cm de dimensão.
- N2b Metástases em múltiplos nódulos linfáticos ipsilaterais, nenhum com mais de 6cm de dimensão.
- N2c Metástases em nódulos linfáticos bilaterais ou contra-laterais, nenhum com mais de 6cm de dimensão.
- N3 Metástases em nódulos linfáticos, maiores que 6cm de dimensão.

Metástases distantes

Mx Metástases distantes não podem ser avaliadas

M0 Sem metástases distantes

MI Metástases distantes

Agrupamento de estádios

Estadio 0 Tis N0 M0

Estadio I T1 N0 M0

Estadio II T2 N0 M0

Estadio III T3 N0 M0

T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

Estadio IVA T4a N0 M0

T4a N1 M0

T1 N2 M0

T2 N2 M0

T3 N2 M0

T4a N2 M0

Estadio IVB qualquer T N3 M0

T4b qualquer N M0

Estadio IVC qualquer T qualquer N MI

Anexo II**Soluções – Técnica imuno-histoquímica****Tampão Citrato**

$C_6H_5N_3O_7 \cdot 2H_2O$2,94g/l
 Adicionar água até 800ml. Ajustar pH até 6.0 com HCL. Perfazer com água destilada até 1l.

Solução Tampão Salina (PBS)**PBS 10x (solução stock)**

NaCl80,00g/l
 KCL2,00g/l
 Na_2HPO_414,40g/l
 KH_2PO_42,40g/l
 Adicionar água destilada até 800ml. Ajustar pH até 7,4 com NaOH. Perfazer com água destilada até 1l.

PBS 1x

PBS 10x.....100ml
 Água destilada..... 900ml

Peróxido de Hidrogénio 0,3% em Metanol

H_2O_2 30%.....1ml
 CH_3OH99ml