

**EXPRESSÃO DE RKIP E CD147 COMO FACTORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DO LÁBIO**

Ana Catarina Barros Fonseca

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2011

Ana Catarina Barros Fonseca

Expressão de RKIP e CD147 como factores de prognóstico em carcinoma espinocelular do lábio

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

Orientador – Professor Doutor Lúcio José de Lara Santos

Categoria – Doutorado

Afiliação – Instituto Português de Oncologia do Porto; Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Co-orientadora – Maria do Céu Costa

Categoria – Mestra

Afiliação – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado que a tal se compromete.

Gostaria de agradecer:

Ao Professor Doutor Lúcio Lara Santos pela forma como me acolheu no seu laboratório, por toda a disponibilidade e ajuda prestada em todo o tempo que realizei a minha dissertação de mestrado.

À minha co-orientadora, mestre Céu Costa pela partilha de todo o seu “know-how”, bem como pela sua presença no laboratório em muitas das fases do meu estudo. Agradeço, não só, a cedência de grande parte dos protocolos otimizados, mas também, a paciência e todas as ideias práticas que me fizeram avançar no processo e solidificar a minha aprendizagem.

Ao Instituto Português de Oncologia do Porto – Francisco Gentil (IPOPFE-EPE) pela cedência das amostras e da base de dados referentes aos doentes em estudo.

À Universidade Fernando Pessoa pela cedência do espaço e parte do financiamento que levaram à realização desta tese.

Ao Ricardo Silva, técnico da Universidade Fernando Pessoa, por toda a disponibilidade e ajuda prática na preparação de soluções necessárias à realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Adhemar Longatto Filho pela sua disponibilidade, simpatia e ajuda que me deu na parte prática do trabalho.

Ao Dr. Manuel Jácome, pelo auxílio na consulta de processos e na revisão dos casos estudados.

Ao Prof. Rui Reis por todas as ideias teóricas e práticas que me fizeram avançar nesta investigação.

Às minhas tias Aurélia Fonseca e Ângela Fonseca por todo apoio e constante incentivo.

À Teresa, por toda a amizade, companheirismo, paciência e altruísmo. Agradeço a sua companhia nas horas de espera bem como toda a alegria durante as várias fases

do trabalho. Agradeço, também, todo o apoio nas alturas mais complicadas deste projecto e ainda, na pesquisa de artigos científicos, na realização de toda a parte prática bem como na preparação do relatório final. Gostaria também de afirmar que tudo o que escreva será pouco para demonstrar a minha gratidão.

Aos meus amigos, Rita, Raúl, Rosalina, Diana, Vitor e Mariana, pelo apoio nas alturas mais complicadas do projecto, enfim, pela amizade demonstrada a cada dia.

Agradeço também ao meu namorado, o Telmo, pelo incondicional apoio, incentivo, paciência e amizade. Agradeço toda a ajuda durante a escrita deste trabalho bem como as tentativas constantes de conciliar os seus horários com os meus de forma a podermos estar mais tempo juntos.

Por fim, queria agradecer aos meus pais por toda a ajuda, compreensão, amizade e carinho de todos os dias, mas em especial nesta fase ocupada da minha vida. A eles devo tudo e, tudo o que diga é pouco comparado com o amor e gratidão que tenho para com eles. O meu muito obrigada.

Os resultados deste trabalho foram publicados em algumas reuniões científicas:

A. Catarina B. Fonseca, T. Capela, C. Costa, S. Pereira, A. Longatto-Filho, R. Reis, L. Santos

RKIP expression as a prognostic factor in lip squamous cell carcinoma

XX Porto Cancer Meeting 2011, Porto, Portugal, Abril 2011, livro de resumos, página 45.

Trabalho apresentado sob a forma de comunicação em painel.

A. Catarina B. Fonseca, T. Capela, C. Costa, S. Pereira, A. Longatto-Filho, R. Reis, L. Santos

Expressão de RKIP em carcinomas espinocelulares do lábio

Jornadas de Oncologia 2011, Espinho, Portugal, Julho 2011, livro de resumos, página 55.

Trabalho apresentado sob a forma de comunicação em painel.

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina bovina sérica

BSG – Gene basigina

CD11c – “*Cluster of differentiation 11c*”

CD147 – “*Cluster of differentiation 147*”

CD36 – “*Cluster of differentiation 36*”

CN V₂ – Nervos cutâneos derivados do nervo maxilar

CN V₃ – Nervos cutâneos derivados do nervo mandibular

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECM – Matriz extracelular

EGF – Factor de crescimento epidérmico

ELK – Proteína C-est-1

EMMPRIN – Indutor extracelular de metaloproteínases da matriz

EMT – Transição de tecido epitelial para tecido mesenquimal

ERK – Cinase regulada por sinais extracelulares

ERK1 – Proteína cínase 1 activada por mitogénios

ERK2 – Proteína cínase 3 activada por mitogénios

ETS-1 – Proteína C-ets-1

FAK – Cinase de adesão focal

GTPase – Proteína de hidrólise da guanina trifosfato

GRK2 – Receptores de cinases acoplados a proteína G do tipo 2

HCNP – Péptidos neuroestimuladores colinérgicos do hipocampo

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

IgG – Imunoglobulina G

IKK α / β – Cinase inibidora do factor nuclear kappa B

kDa – Quilo-Dalton

MAP – Proteína activada por mitogénios

MAPK – Proteína cínase activada por mitogénios

MAPKK – Proteína cínase cínase activada por mitogénios

MAPKKK – Proteína cínase cínase cínase activada por mitogénios

MCT – Transportador de monocarboxilato

MCT1 – Transportador de monocarboxilato 1

MCT2 – Transportador de monocarboxilato 2

MCT4 – Transportador de monocarboxilato 4

MDR1 – Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas

MEK – Proteína cínase cínase activada por mitogénios

MEK1 – Proteína cínase 1 com especificidade dupla activada por mitogénios

MEK2 – Proteína cínase 2 com especificidade dupla activada por mitogénios

MMPs – Metaloproteinases da matriz

MMP1 – Metaloproteinases da matriz 1 ou colagenase intersticial

MMP2 – Metaloproteinases da matriz 2 ou gelatinase A

MMP3 – Metaloproteinases da matriz 3 ou eritromelina 1

MMP9 – Metaloproteinases da matriz 9 ou gelatinase B

MMP11 – Metaloproteinases da matriz 11

MMP14 – Metaloproteinases da matriz 14

MMP15 – Metaloproteinases da matriz 15

MT-MMPs – Metaloproteinases do tipo membranas

NF-κB – Factor nuclear kappa B

NIK – Proteína indutora do factor nuclear kappa B

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

PEBPs – Proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina

PEBP1 – Proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1

PEBP2 – Proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 2

PEBP3 – Proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 3

P-gp – Glicoproteína P

PI3K – Cinase 3-fosfatidilinositol

PKC – Proteína cínase C

p38- MAPK – Proteína p38 cinase activadas por mitogénios

p53 – Proteína 53 ou Proteína tumoral 53

Raf – “*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*”

Ras – Vírus do sarcoma de rato – “*RA_t Sarcoma vírus*”

RKIP – Proteína inibidora da cínase Raf

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

siRNA – small interference RNA

TAK1 – Cínase activada pelo TGFβ

TCSF – Factor estimulante da colagenase derivada de células tumorais

TGFβ – Factor de crescimento transformante β

TIMPs – Inibidores de metaloproteinases específicas do tecido

TNM – Classificação de tumores malignos (T- Tamanho do Tumor; N- Metastização Nodular; M – Metástases à distância)

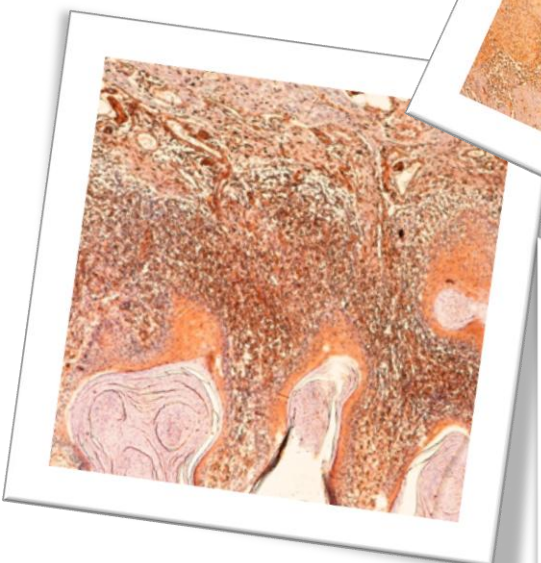
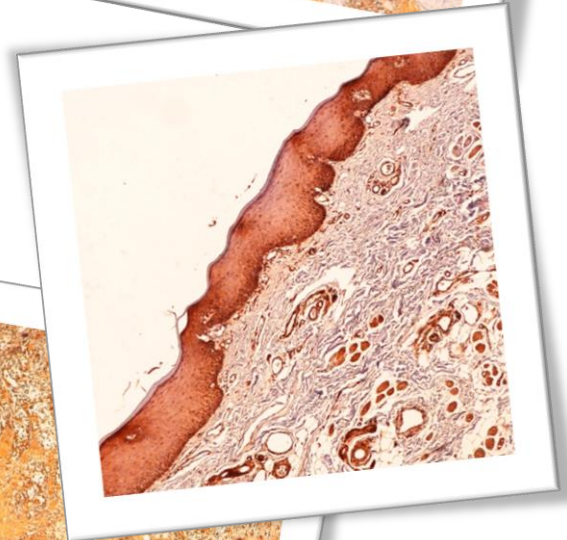
UV – Ultravioleta

VEGF – Factor de crescimento endotelial vascular

AGRADECIMENTOS	V
COMUNICAÇÕES	VII
ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE	XI
RESUMO	13
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	21
1. Cancro do Lábio	23
1.1. Anatomia do lábio	23
1.2. Epidemiologia	25
1.3. Factores de risco	26
1.4. Diagnóstico e Prognóstico	26
1.5. Tratamento	28
2. RKIP	29
2.1. Características gerais da proteína	29
2.2. RKIP como regulador de cascatas de sinalização	29
2.2.1. Cascata do ERK	30
2.2.2. Cascata dos GPCRs	32
2.2.3. Cascata do NF- κ B	32
2.3. RKIP e o ciclo e diferenciação celular	33
2.4. Expressão do RKIP em diferentes tecidos	34
2.5. RKIP e a resposta ao tratamento	35
2.6. RKIP e a doença de Alzheimer e a espermatogénese	35
2.7. Controvérsia e dúvidas a esclarecer	36
3. CD147	38
3.1. Características gerais da proteína	38
3.2. Funções gerais do CD147	39
3.2.1. CD147 como estimulador da produção de MMPs	40
3.2.1.1. Características gerais das MMPs	40
3.2.1.2. Funções gerais das MMPs	41
3.2.2. CD147 e a adesão celular	42
3.3. CD147 e o transporte de lactato	43
3.4. CD147 e a angiogénese	45
3.5. CD147 como estimulador da actividade do hialuronano e ciclofilina A	45
3.6. A caveolina-1 como inibidor da acção do CD147	46
3.7. Expressão do CD127 em diferentes tecidos	47
3.8. CD147 como factor de resistência a drogas	47
3.9. CD147 como factor de prognóstico em diferentes neoplasias	48
3.10. Conclusões obtidas por silenciamento do CD147 (técnica siRNA)	48

3.11. CD147 e a doença de Alzheimer e aterosclerose	49
OBJECTIVOS	51
1.1. Objectivo principal.....	53
1.2. Objectivos secundários.....	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
1. População e variáveis de estudo.....	57
1.1. RKIP.....	58
1.2. CD147	59
2. Análise da expressão de RKIP e CD147	60
2.1. Protocolo de imunohistoquímica.....	60
2.1.1. RKIP	60
2.1.2. CD147	61
2.2. Quantificação e avaliação da imunoreactividade das proteínas	62
2.2.1. RKIP	62
2.2.2. CD147	62
2.3. Análise estatística	62
3. Definições	63
RESULTADOS.....	65
1. RKIP	67
1.1. Significado prognóstico das variáveis clínico-patológicas.....	67
1.2. Expressão da proteína RKIP	68
1.2.1. Correlação da expressão da proteína com os parâmetros clínico-patológicos.....	72
1.2.2. Significado prognóstico dos resultados obtidos.....	77
2. CD147	78
2.1. Significado prognóstico das variáveis clínico-patológicas.....	78
2.2. Expressão da proteína CD147	79
2.2.1. Correlação da expressão da proteína com os parâmetros clínico-patológicos.....	82
2.2.2. Significado prognóstico dos resultados obtidos.....	83
3. Relação entre as expressões de RKIP e CD147.....	84
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO/ PERSPECTIVAS FUTURAS	95
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	129

RESUMO



O cancro do lábio é o segundo cancro mais frequente entre as neoplasias da cabeça e pescoço ⁽¹⁾. Em Portugal foram verificados, em 2005, 78 novos casos desta neoplasia, sendo os indivíduos do sexo masculino com idades a partir dos 50 anos o extracto social mais afectado ^(1,2). A exposição solar e os hábitos tabágicos abusivos são os principais factores etiológicos para o desenvolvimento desta patologia e o lábio inferior é o local mais comum para o seu aparecimento ^(1,3,4,5,6). Visto serem lesões visíveis, o seu diagnóstico é geralmente feito numa fase inicial ⁽¹⁾ e, portanto, o prognóstico dos doentes é geralmente bom ^(1,7,8,9). No entanto, a presença de invasão vascular e linfática, bem como a invasão perineural, diminuem consideravelmente a sobrevivência destes doentes ⁽¹⁰⁾. A cirurgia, a braquiterapia e a radioterapia, por vezes combinada com a quimioterapia, bem como o recurso à linfadnectomia, são as técnicas usualmente aplicadas no tratamento dos doentes com carcinoma do lábio ^(1,10,11,12).

O RKIP, proteína inibidora da cínase Raf ⁽¹³⁾, é uma proteína citosólica, membro da família de proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina ^(14,15), e que está envolvida na regulação de diversas cascatas de sinalização celular, sendo as mais importantes a cascata do ERK, do GPCR e do NF-κB. Devido à sua acção sobre estas vias, o RKIP influencia processos celulares tais como o crescimento, proliferação, diferenciação, transformação, sobrevivência celular, neurotransmissão, libertação de enzimas e hormonas, produção de citocinas e inflamação. Esta proteína influencia ainda a resposta dos doentes oncológicos ao tratamento. ^(14,16,17,1,19). Na grande maioria dos estudos até hoje realizados, a expressão do RKIP é alta ou moderada em tecidos normais, diminuindo em tumores primários e sendo baixa ou indetectável em metástases desses mesmos tumores ^(17,20,21,22). Por tudo o que foi anteriormente dito, o RKIP tem sido considerada uma molécula promissora como alvo de terapia dirigida e pode ser útil como marcador de prognóstico em diversos tipos de cancro ^(23,24).

O CD147 é uma proteína transmembranar ⁽²⁵⁾, membro da superfamília das imunoglobulinas ⁽²⁶⁾ e que desempenha funções importantes quer em condições normais quer patológicas. Tem a capacidade de regular o desenvolvimento tumoral, estando associado com o crescimento do tumor, metastização, invasividade e angiogénese tumoral. Para que tal aconteça, o CD147 estimula a produção de MMPs pelos fibroblastos peritumorais e células tumorais ^(25,27,28). As MMPs têm uma acção proteolítica capaz de degradar o colagénio e assim degradar os ECM e as membranas basais, permitindo a metastização tumoral ^(25,29,30,31,32,33). O CD147 tem também a capacidade de regular a adesão intracelular ^(26,28) e o mecanismo de resistência a certas drogas ^(34,35,36,37). Diversos estudos verificaram uma associação positiva entre a agressividade do tumor e a expressão aumentada desta proteína ^(29,38,39,40). Pelo que foi dito anteriormente, podemos considerar o CD147 como um factor de mau prognóstico ^(32,39,41,42,43,44,45) e, assim sen-

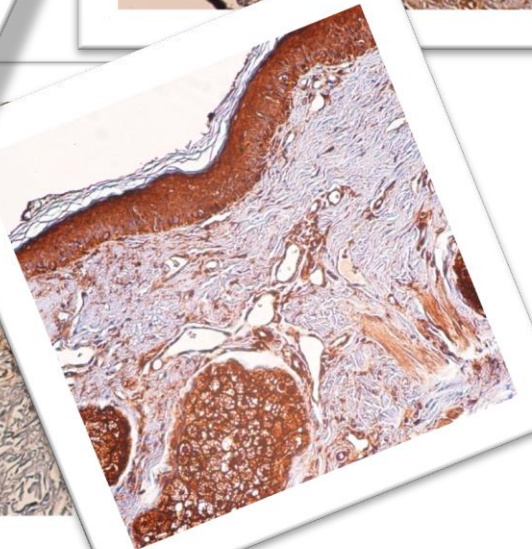
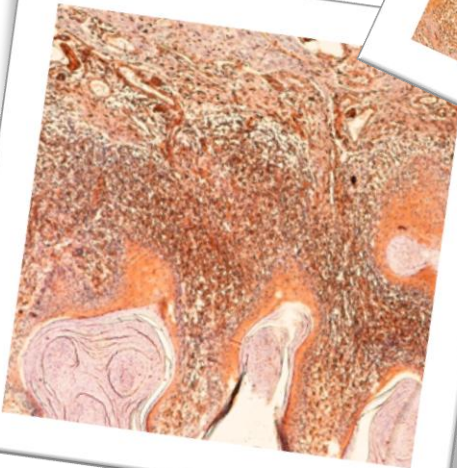
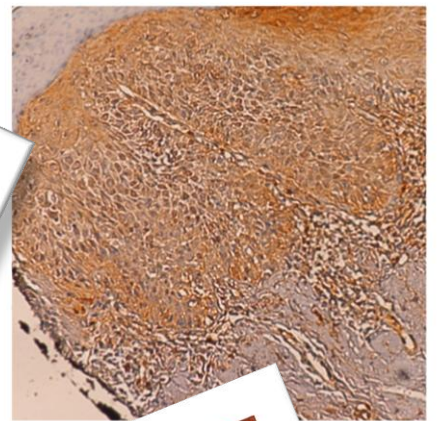
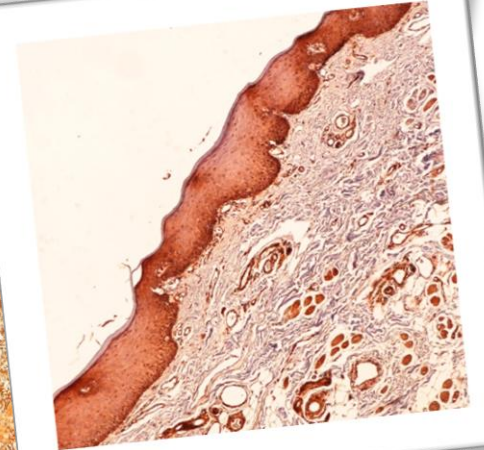
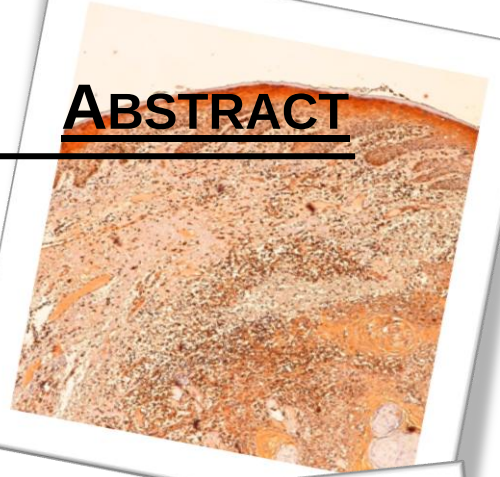
do a expressão do CD147 pode ser considerada um marcador útil para seleccionar doentes com alto risco e pior prognóstico clínico, propondo uma terapia mais adequada para estes ^(42,46).

O presente estudo avalia as variáveis clínico-patológicas com significado prognóstico, a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global e correlaciona-as com a imunoexpressão das proteínas RKIP e CD147. Os cortes histológicos foram marcados com anticorpos anti-RKIP e anti-CD147 e posteriormente avaliados independentemente por dois patologistas que não tinham conhecimento prévio das características clínico-patológicas dos doentes. Para a análise estatística utilizou-se o programa específico *SPSS 17.0*[®] para Windows.

Nos 94 casos em que foi analisada a imunoreactividade do RKIP verificou-se que a localização do tumor primário é um factor de prognóstico da sobrevivência dos doentes com cancro do lábio. As variáveis clínico-patológicas estágio e localização do tumor primário relacionam-se com a probabilidade que os doentes têm de recedivarem. Assim, os doentes com idades inferiores ou iguais a 72 anos, cujos tumores estejam localizados à comissura labial e/ou em estágio III têm pior prognóstico. Quando se analisou a expressão do RKIP no tecido tumoral propriamente dito e na frente de invasão, verificou-se que esta expressão, em ambos os locais, se relaciona com o estágio do tumor. Verificou-se ainda, que os níveis de expressão de RKIP são mais elevados no tumor do que na frente de invasão. Assim, no tecido tumoral predominam os casos em que a expressão de RKIP é positiva enquanto, na frente de invasão é notório um aumento dos casos em que a expressão da proteína é inexistente ou ocorre de uma forma heterogénea. A expressão da proteína não mostrou, contudo, ser um factor de prognóstico no desenvolvimento do carcinoma do lábio. Nos 66 casos marcados com anticorpo anti-CD147, verificou-se que a localização do tumor primário é um factor de prognóstico. Doentes com tumores localizados à comissura possuem sobrevivências globais menores e um alto risco de recidiva. A expressão da proteína, contudo, não se relacionou com nenhuma variável clínico-patológica nem se mostrou um factor de prognóstico para os doentes com cancro do lábio. No entanto, verificou-se um aumento de expressão do CD147 no tumor relativamente ao tecido normal. Este estudo permitiu, também, concluir que possivelmente a função das duas proteínas em estudo não está correlacionada, pelo menos no que diz respeito ao cancro do lábio.

O facto de o cancro do lábio ser uma lesão visível e geralmente diagnosticada numa fase precoce, aliado à evidência de esta neoplasia raramente metastizar a nível ganglionar ou à distância, faz com que esta seja patologia com bom prognóstico ⁽¹⁾. Estas podem ser duas das razões que expliquem o facto de a expressão das duas proteínas estudadas não funcionarem como um factor de prognóstico no tumor do lábio.

ABSTRACT



Lip cancer is the second most frequent cancer between head and neck neoplasias⁽¹⁾. In Portugal it verifies, in 2005, 78 new cases of this neoplasia where the males with ages up 50 years old are the most affected ones^(1,2). The sun exposure and the high smoking habits are the main etiological factors that contribute to the development of this cancer type^(1,3,4,5,6). Since they usually are visible lesions, their diagnosis it's usually made early⁽¹⁾ and due to it the patient's prognosis is generally good^(1,7,8,9), however, the presence of lymphatic and vascular and perineural invasion substantially decrease the patient survival⁽¹⁰⁾. The surgery, brachytherapy and radiotherapy sometimes combined with chemotherapy and also the lymphadenectomy are the most usual terapeutical techniques applied to lip cancer patients'^(1,10,11,12).

RKIP, Raf Kinase Inhibitory Protein⁽¹³⁾, it's a cytosolic protein of phosphatidylethanolamine protein family member^(14,15) and is involved in the regulation of many signalization cascades, where the most important are ERK, GPCR and NF-κB pathways. Due to its action in this cascades, RKIP influences cellular processes like growth, proliferation, differentiation, transformation and cellular survival. Its action influences neurotransmission processes, enzyme and hormone release, cytokine production and inflammation. This protein influences also the cancer patients' response to treatment.^(14,16,17,18,19) In most studies made so far, RKIP expression is high or moderated in normal tissues, decreasing in primary tumors and being lower or undetectable in metastases of these tumors^(17,20,21,22). Thus, RKIP is being considered a promising target therapy molecule and can be useful as a prognostic marker in many cancers^(23,24).

CD147 is a transmembrane protein⁽²⁵⁾, imunoglobulin family member⁽²⁶⁾, that plays important functions either in normal or pathological conditions whereas it has the capacity to regulate the tumor development being associated with tumor grow, metastization, tumoral invasiveness and angiogenesis. For that CD147 stimulate MMPs production by the peritumoral fibroblasts and tumor cells^(25,27,28). MMPs have a proteolytic action able to degrade collagen and so the ECM components and basal membranes allowing tumor metastasis^(25,29,30,31,32,33). CD147 has also the capacity to regulate intracellular adhesion^(19,28) and drug resistance mechanism^(34,35,36,37). Many studies show that there is a positive association between the tumor agressivity and the higher protein expression^(29,38,39,40). For all that was previous said, we can considered the CD147 protein as a bad prognosis factor^(32,39,41,42,43,44,45) and so the CD147 expression can be a useful market to select higher risk and worst prognosis patients' to propose a more proper therapy technique for them^(42,46).

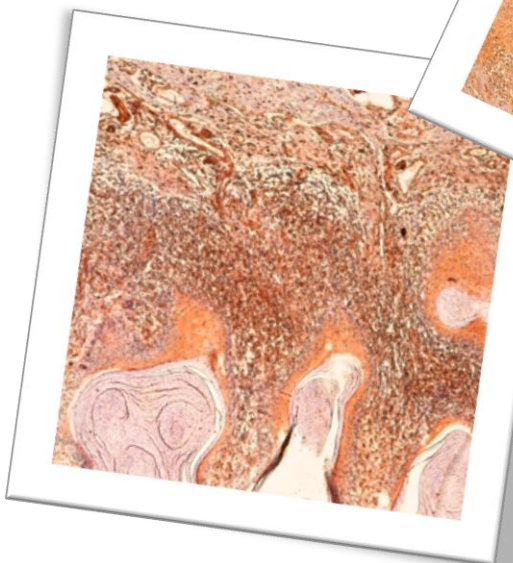
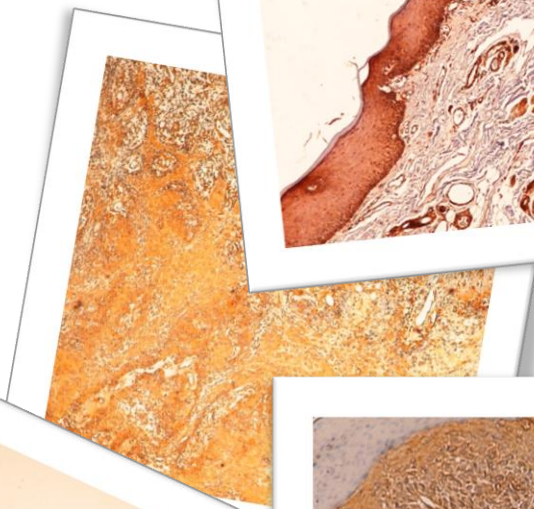
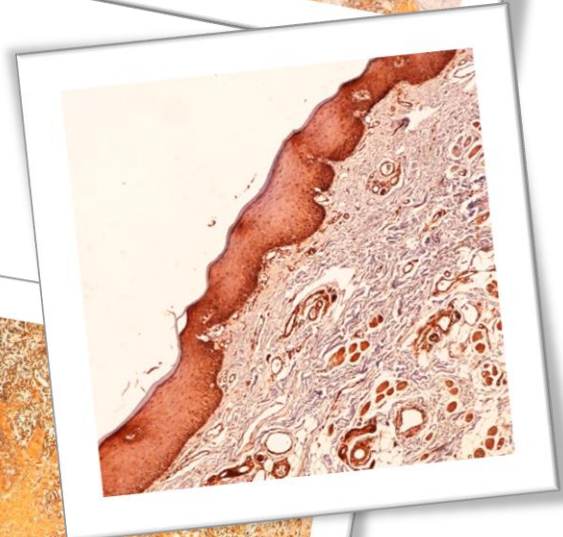
This study evaluates clinical-pathological variables that have prognosis meaning, the disease-free survival and the global survival and connect them with RKIP and CD147 proteins imunoexpression. The samples were stained with anti-RKIP and anti-CD147 an-

tibodies and next independently evaluated by two different pathologists that had not the previous knowledge of the clinical-pathologic features of the patients. For the statistical analysis we used the *SPSS 17.0*[®] program for Windows.

In the 94 cases where the immunoreactivity of RKIP was analyzed, it was verified that the site of primary tumor is a prognostic factor of the survival of lip cancer patients. The stage and tumor site are the clinical-pathological variables that show a correlation with the relapse probability of the patients. So, the patients with ages under or equal to 72 years, whose tumors are in commissure and/or in stage III have worst prognosis. When we analyzed RKIP expression in tumoral tissue and in the invasion front, we demonstrated that the protein expression is related with the stage of the tumor. We can also see that protein expression levels in tumor decrease when we compare them with the levels in invasion front. So, in tumor is much more common the cases with positive RKIP expression while in invasion front we can see an increase in cases where there is no protein expression or it occurs in a heterogeneous way. RKIP expression didn't appear to be a prognosis factor in lip cancer development. In the 66 cases stained with anti-CD147 antibody, we verified that the primary tumor site is a prognostic factor. Patients with commissure localized tumors had lower global survivals and higher relapse risk. CD147 expression was not related with any clinical-pathological variables and was not show to be a prognostic factor for lip cancer patients. However, we noted that the CD147 expression was higher on the tumor than in normal tissue. This study indicates, also, that it is possible that there is no relation between the function of this two proteins, at least in lip cancer.

The fact that lip cancer is a visible lesion and, in general, diagnosed in a early phase combined with the evidence that this is a neoplasia where the appereance of regional or distant metastasis are rare makes this pathology a good prognosis one ⁽¹⁾. These may be two of the reasons that explain the fact that the expression of the two studied protein doesn't work as a prognostic factors in lip cancer.

INTRODUÇÃO



1. CANCRO DO LÁBIO

1.1. Anatomia do lábio

O cancro do lábio é uma entidade patológica que deve ser considerada separadamente de outros cancros orais e dos cancros de pele ⁽⁴⁷⁾. Os lábios são móveis, formam sulcos microfibrosos em redor da boca e estendem-se desde o sulco nasolabial (superiormente e lateralmente) ao sulco mentolabial (inferiormente) ⁽⁴⁸⁾. Circundam a abertura da boca, designada fissura oral. O lábio social marca o início de uma zona de transição entre a pele e a membrana mucosa do lábio ^(47,48). A pele da zona de transição não tem pêlos e uma vez que é pouco espessa, a sua sensibilidade está aumentada e permite que os lábios apresentem uma cor diferente da restante pele da face adjacente devido à grande abundância de capilares ⁽⁴⁸⁾. A junção lateral entre o lábio superior e inferior designa-se comissura. O ângulo descrito entre o centro dos lábios e a comissura é designado ângulo da boca e aumenta quando a boca abre e diminui quando esta fecha ⁽⁴⁸⁾. A parte central do lábio superior forma um tubérculo, acima do qual se encontra o filtro labial, um sulco que se estende até ao septo nasal. As dobras musculofibrosas dos lábios continuam lateralmente até à bochecha ⁽⁴⁸⁾. Esta última está separada do lábio pelo sulco nasolabial, que se estende obliquamente desde a ala do nariz ao ângulo da boca. Estas estruturas são fáceis de observar durante o sorriso ⁽⁴⁸⁾. O lábio inferior é separado da protuberância mental, queixo, pelo sulco mentolabial. A bochecha e queixo de um homem adulto apresentam crescimento de pêlo, uma característica sexual secundária do sexo masculino ⁽⁴⁸⁾. Parte das informações acima referidas encontram-se esquematizadas na Figura 1.

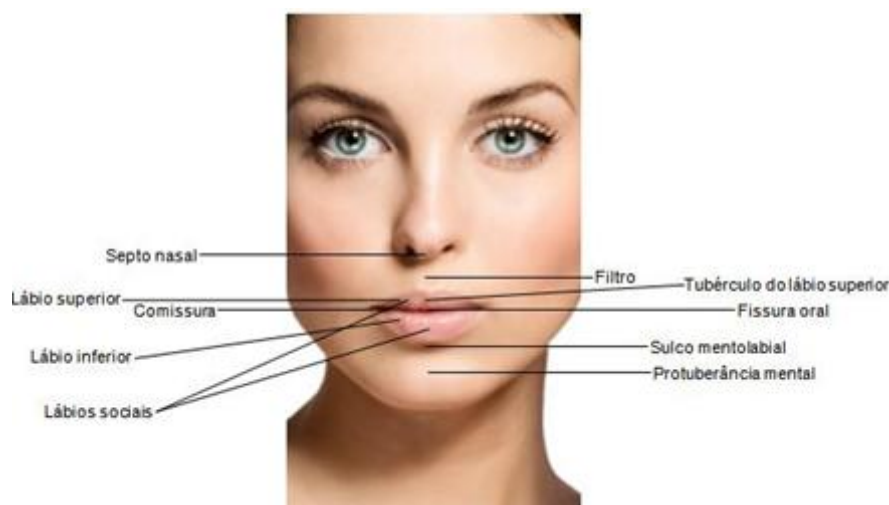


Figura 1: Legenda da anatomia da superfície da face. (Adaptado de ⁴⁸)

Os lábios contêm diversos músculos, vasos sanguíneos e nervos. São cobertos externamente por pele e internamente por membrana mucosa ^(47,48). Funcionam como válvulas da fissura oral, contendo um esfíncter, o orbicular dos lábios, que controla a entrada e saída da boca bem como dos tractos digestivo e respiratório superior ⁽⁴⁸⁾. Os lábios são usados para agarrar a comida, sorver líquidos, manter a comida fora do vestíbulo oral, formar as palavras e oscular ⁽⁴⁸⁾. A zona de transição dos lábios, comumente considerada, só por si, o lábio, apresenta cores que vão do espectro do castanho ao vermelho e prossegue para a cavidade oral onde tem continuidade com a membrana mucosa ⁽⁴⁸⁾. O lábio é composto por diversos músculos cuja acção permite a apresentação de diferentes expressões. Os músculos que contribuem para uma expressão de tristeza são os músculos elevadores do lábio superior e o pequeno zigmático que se inserem na pele do lábio superior, bem como o músculo depressor do ângulo da boca e o músculo depressor do lábio inferior, sendo que o primeiro se insere no ângulo da boca e o segundo na pele do lábio inferior. Para uma expressão de sorriso contribuem os músculos do grande zigmático e o elevador do ângulo da boca que se inserem, ambos, no ângulo da boca. A expressão de oscular deve-se à acção do músculo orbicular dos lábios que se insere na membrana mucosa dos lábios. Por último, o riso é permitido graças ao músculo risório que se insere no ângulo da boca ⁽⁴⁸⁾. A nível de fornecimento de sangue os lábios possuem artérias e veias. As artérias labial superior e inferior, ramos das artérias faciais, irrigam para cada um dos lábios para formar um anel arterial. Os ramos superiores labiais das artérias infraorbital e facial, irrigam no lábio superior. Os ramos inferiores labiais das artérias facial e mental irrigam no lábio inferior. A veia facial, uma continuação da veia angular drena para os lábios ⁽⁴⁸⁾. A enervação do lábio superior é feita pelos ramos labiais superiores dos nervos infraorbitais (do CN V₂) enquanto, a enervação do lábio inferior é feita pelos ramos labiais inferiores do nervo mental (do CN V₃) ⁽⁴⁸⁾. A rede linfática do lábio superior e partes laterais do lábio inferior passa inicialmente pelos nódulos linfáticos submandibulares, enquanto a rede linfática da parte média do lábio inferior passa inicialmente pelos nódulos linfáticos submentais, tal como está ilustrado na Figura 2 ⁽⁴⁸⁾.

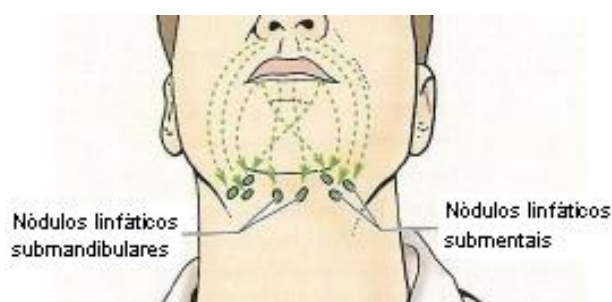


Figura 2: Principais grupos ganglionares envolvidos na drenagem linfática do lábio. ^(Adaptado de 48)

1.2. Epidemiologia

O cancro do lábio é o segundo cancro mais frequente nas neoplasias da cabeça e pescoço ⁽¹⁾. No ano de 2008, foram diagnosticados 263020 novos casos de cancro do lábio e cavidade oral em todo mundo (taxa de incidência padronizada de 3,8) ⁽⁴⁹⁾, sendo que 91148 dos casos ocorreram nos países desenvolvidos (taxa de incidência padronizada de 4,4) ⁽⁵⁰⁾, tendo, nestes últimos, ocorrido 1,9 vezes menos casos do que nos países em desenvolvimento ^(50,51). O número total de doentes que padeceram, em todo mundo, nesse ano, devido a estas patologias foi de 127654 (taxa de incidência padronizada de 1,9) ⁽⁴⁹⁾, tendo ocorrido 30689 desses casos nos países desenvolvidos (taxa de incidência padronizada de 1,4) ⁽⁵⁰⁾. Em todo mundo, a neoplasia do lábio e cavidade oral, foi em 2008, a décima quinta mais frequente. ⁽⁴⁹⁾ No mesmo ano, foram verificados 1025 novos casos de cancro do lábio e cavidade oral em Portugal (taxa de incidência padronizada de 5,8) tendo sido o número de óbitos por estas neoplasias de 341 (taxa de incidência padronizada de 1,8) ⁽⁵²⁾. No nosso país estas neoplasias ocupam a nona posição por entre as mais frequentes ⁽⁵²⁾. Quando analisamos a epidemiologia apenas do cancro do lábio, verificamos que, em 2005, foram diagnosticados 78 novos casos (taxa de incidência padronizada de 0,54) ⁽²⁾, correspondendo 63 deles à zona norte do país ⁽⁵³⁾. Em todo o Mundo, o sexo masculino é o mais afectado por tumores do lábio e cavidade oral sendo essa diferença entre sexos maior entre os países desenvolvidos ^(4,49). Em Portugal, os primeiros novos casos de cancro do lábio são diagnosticados a partir do grupo etário que compreende idades entre os 35 e os 39 anos, sendo mais comum a partir dos 50 anos com o maior número de casos diagnosticados a indivíduos com idade igual ou superior a 75 anos ^(1,2). Em muitos países industrializados, a taxa de incidência de cancro do lábio nos homens tem vindo a descer. Tal situação poderá dever-se ao facto de terem vindo a decrescer entre os homens destes países os hábitos tabágicos, bem como os trabalhos ao ar livre. No entanto, no que diz respeito às mulheres, esta taxa tende a aumentar ao longo dos anos, embora permaneça baixa actualmente. Pode apontar-se como razão para este facto o aumento dos hábitos tabágicos e a exposição solar a que estão sujeitas na praia ⁽⁴⁾. O cancro do lábio inferior é muito mais comum do que o cancro do lábio superior, uma vez que o primeiro está mais sujeito à radiação UV derivada do sol. Assim, na altura do diagnóstico, cerca de 90% dos carcinomas do lábio localizam-se no lábio inferior, 5% no lábio superior e cerca de 1 a 2% na comissura ^(1,3,4,5,6). No entanto, quando ocorre, o cancro do lábio superior é mais comum no sexo feminino, já o cancro do lábio inferior é mais comum entre os homens ⁽⁴⁾. As populações de pele branca do Canadá e Austrália são aquelas que possuem maiores taxas de incidência de cancro do lábio. Por exemplo, mais de 50% dos cancros orais nos Australianos estão locali-

zados no lábio. Esta neoplasia afecta quase exclusivamente indivíduos de cor branca ^(54,55), devido à maior quantidade de melanina que os indivíduos de cor mais escura possuem nos seus lábios e que os protege da radiação solar. O carcinoma espinocelular do lábio é o tipo histológico mais frequente ^(1,2), com cerca de 85,9% dos casos ⁽²⁾. No entanto, podem ocorrer carcinomas do lábio de células basais, carcinomas verrucosos e carcinomas espinocelulares queratinizantes em percentagens muito menores ^(1,2).

1.3. Factores de risco

Como já foi sugerido acima, o cancro do lábio tem alguns factores de risco que contribuem para a sua ocorrência. Embora o cancro do lábio apresente alguns factores de risco em comum com outros cancros de pele, a existência de um epitélio de transição combinado com a sua posição anatómica faz do lábio social uma estrutura vulnerável a uma combinação única de exposições que têm sido consideradas com potencial carcinogénico ⁽⁵⁶⁾. Assim, o factor principal para o desenvolvimento desta neoplasia é a exposição solar ^(4,55,57). As populações que trabalham ao ar livre ou residentes em zonas rurais são as mais afectadas ^(9,57). Indivíduos fumadores ou que consumam grandes quantidades de bebidas alcoólicas, têm maior risco de desenvolverem este tipo de neoplasia ^(4,9,47,54,55,57,58,59,61). O risco de desenvolver cancro do lábio pode depender de uma predisposição genética (mutações no gene supressor tumoral p53) e da evolução a partir de lesões pré-cancerígenas (radiodematite, xerodema pigmentosum) ⁽⁵⁵⁾. Os doentes submetidos a transplantes renais apresentam um risco aumentado de desenvolver esta neoplasia ^(56,59,62,63,64). O aumento de risco de desenvolver carcinomas após a realização de transplantes resulta da interacção de vários factores que favorecem a carcinogénese, tal como a exposição continuada a imunossuppressores ⁽³⁾.

1.4. Diagnóstico e prognóstico

Visto serem lesões visíveis, o seu diagnóstico é geralmente feito numa fase inicial ⁽¹⁾. Embora a apresentação sob uma forma ulcerada seja, de longe, a mais frequente, outras formas de manifestação do cancro do lábio, tal como lesões exofíticas ou “lesão com ferida” podem também ocorrer ⁽⁵⁸⁾. Estas lesões podem, ocasionalmente, ser dolorosas ou provocar sangramento e são geralmente de pequeno tamanho ⁽¹⁾. Em carcinomas do lábio, as metástases à distância são muito raras e verificam-se essencialmente nos tumores com maior dimensão e sem controlo local ⁽¹⁾. A metastização linfática ocorre

apenas entre 5 a 10% dos casos. Os tumores do lábio inferior metastizam, sobretudo, para os gânglios do grupo submandibular e submentoniano e seguidamente para grupo jugular superior. Por outro lado, nos tumores do lábio superior e da comissura a disseminação linfática ocorre de forma mais extensiva estendendo-se aos gânglios pré-auriculares, infra-parotídeos, sub-mandibular e músculo bucinador homolateral e daí para os gânglios do grupo jugular superior ⁽¹⁾. A incidência de metástases nodulares depende principalmente do grau histológico e do estágio, sendo mais frequentes nos estádios avançados e tumores indiferenciados. Na altura do diagnóstico, 7% dos tumores bem diferenciados apresentam metástases ganglionares, subindo para 23% no caso dos tumores moderadamente diferenciados e 35% no caso de tumores indiferenciados. Dependendo do tamanho do tumor, as metástases ganglionares verificam-se em 5% dos tumores T1 e em 52% dos tumores T2, podendo atingir valores próximos dos 73% nos tumores T3 ⁽¹⁾. Nos doentes com esta neoplasia não é pouco usual a ocorrência de metastização perineural. Esta é mais comum em doentes com metástases ganglionares cervicais, tumores localizados no lábio inferior ou à comissura, em lesões mais avançadas e de maior tamanho e em doentes com historial prévio de submissão à radioterapia ⁽⁶⁵⁾. A invasão perineural associa-se com o aparecimento de carcinomatose das meninges em 60% a 80% dos casos. Aquando da presença de invasão perineural, a taxa de metastização é muito mais elevada nos carcinomas espinocelulares do lábio do que nos carcinomas espinocelulares da pele. Assim, no lábio a presença de invasão perineural, associa-se fortemente com um pior prognóstico ⁽⁶⁵⁾.

O prognóstico dos doentes com cancro do lábio é geralmente favorável e dependente, principalmente, do tamanho da lesão (diâmetro e espessura), mas também do estágio do tumor, da presença de metástases, da localização do tumor primário e do tratamento inicial aplicado ^(1,7,8,9). Em estádios T1, a sobrevivência aos 5 anos situa-se entre os 90 e 95%, descendo para valores entre 75 e 85% nos tumores T2, com uma diminuição drástica de sobrevivência nos casos de T3 e T4, sendo que esta descida depende muito do envolvimento ganglionar. Nos estádios clínicos III e IV, a taxa de sobrevivência aos 5 anos ronda os 67% ^(1,10,12). A presença de metástases diminui a sobrevivência aos 5 anos destes doentes para metade. A presença de invasão vascular e linfática bem como a invasão perineural também diminuem consideravelmente a sobrevivência destes doentes ⁽¹⁰⁾. Doentes com menor idade na altura do diagnóstico têm, geralmente, doenças mais agressivas e, por isso, um prognóstico mais reservado ⁽¹⁾.

1.5. Tratamento

A escolha do tratamento adequado para tratar estes doentes depende muito do tamanho do tumor, do local específico dentro da região labial onde o tumor se encontra e, dos resultados funcionais e estéticos esperados para cada opção terapêutica ^(1,10,11,12). Nas lesões mais pequenas, a cirurgia é geralmente o tratamento mais indicado. Em lesões perto da comissura, a braquiterapia é a técnica mais aconselhada, uma vez que permite preservar a função labial e permite melhores resultados estéticos. Em estádios mais avançados, III e IV, a cirurgia pode ser o tratamento de escolha, geralmente com necessidade de reconstituição plástica, recorrendo-se à radioterapia pós-operatória para obtenção de melhores resultados. Quando há envolvimento ganglionar e nos casos de T3-T4 N0, é recomendada a realização de linfadnectomia no pescoço e a radioterapia é realizada quer sob o local do tumor primário quer sob os nódulos afectados. Em tumores muito avançados, muitas vezes, o recurso à cirurgia não é possível, sendo a única opção terapêutica a radioterapia, que pode ser combinada com quimioterapia ^(1,10,11,12). Existem complicações inerentes ao tratamento: quando se recorre à cirurgia e é necessária a realização de uma reconstrução labial com recurso a um retalho de grande tamanho, pode verificar-se microstomia e incompetência oral como principais problemas. No caso de doentes submetidos a radioterapia, pode ocorrer uma atrofia dos tecidos irradiados, bem como uma necrose dos tecidos moles. Ambos os tipos de doentes podem sofrer raras afecções de fala e alguns problemas estéticos inerentes aos tratamentos ⁽¹²⁾. O sucesso do tratamento do cancro do lábio depende da detecção do tumor numa fase inicial bem do tipo de tratamento aplicado, dependendo destes factores a morbilidade e a mortalidade dos doentes ⁽¹⁰⁾.

2. **RKIP**

2.1. **Características gerais da proteína**

O RKIP, proteína inibidora da cinase Raf ⁽¹³⁾, é uma proteína citosólica, membro da família de proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina (PEBPs) ^(14,15) e, por essa razão, é também conhecida por PEBP1 ⁽¹⁴⁾. O gene do RKIP humano está localizado no cromossoma 12q24.23 ⁽¹⁵⁾ e codifica uma proteína com 187 aminoácidos e com peso molecular de 21 kDa ⁽¹⁷⁾. Esta proteína tem afinidade de ligação a nucleótidos, aniões orgânicos, opióides, esteróides e, como já foi dito, a um componente da membrana lipídica, a fosfatidiletanolamina ^(67,68,69). É uma proteína globular com um centro de folhas β e um bolso proeminente e exposto a solventes. Esse bolso é constituído por resíduos altamente conservados, sendo o único local de ligação dos ligandos ⁽⁷⁰⁾. O RKIP é expresso na maior parte dos tecidos sendo, contudo, mais abundante no cérebro, testículos, fígado e rim ^(71,72). Funciona como um inibidor de serina proteases tal como a trombina, a neurop-sina e quimotripsina, no entanto, não apresenta qualquer homologia com outra família destes inibidores ^(72,73,74). Foi pela primeira vez estudado, há mais de 25 anos, por Bernier et al ^(68,69) e, é considerado, hoje em dia, uma molécula promissora como alvo de terapia dirigida ⁽²³⁾. O RKIP está envolvido na regulação de cascatas de sinalização celular, tais como as vias do ERK, GPCR e NF- κ B ⁽¹⁴⁾. Está também envolvido na regulação do ciclo, crescimento, diferenciação e migração celular bem como de processos neurodegenerativos e morte celular programada, na supressão de metástases, na modulação das emoções e na reprodução ⁽⁷⁵⁾.

2.2. **RKIP como regulador de cascatas de sinalização**

Tal como já foi referido, o RKIP está envolvido na regulação de diversas cascatas de sinalização, sendo as mais importantes, a cascata do ERK, do GPCR e do NF- κ B. Devido à sua acção sobre estas, o RKIP influencia processos celulares, tais como o crescimento, proliferação, diferenciação, mobilidade, transformação, adesão e sobrevivência celular. A sua acção tem ainda efeitos sobre processos de neurotransmissão, libertação de enzimas e hormonas, produção de citocinas e seus receptores, transcrição, inflamação, de regulação da pressão sanguínea e de coordenação da expressão de um grande número de genes que controlam a resposta imune e o stress ^(14,16,17,18,19).

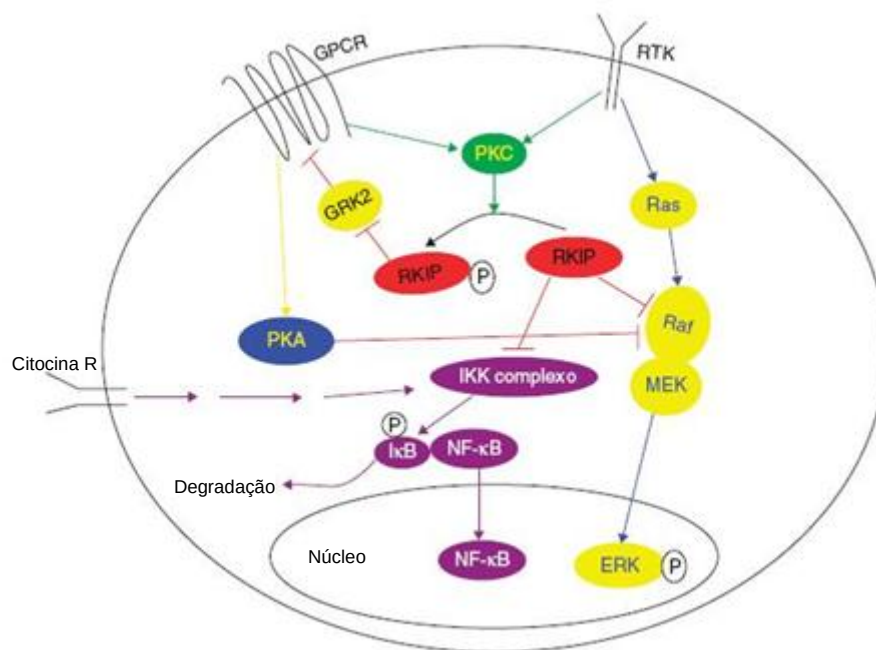


Figura 3: Papel do RKIP nas cascatas do ERK, GPCR e NF-κB. Nas células quiescentes, o RKIP liga-se ao Raf-1 e inibe a cascata do ERK a jusante deste. Sob estímulo de sinais mitogénicos, o RKIP é fosforilado e libertado do Raf-1. O RKIP fosforilado liga-se e inibe o GRK2, promovendo assim a sinalização GPCR. Por outro lado, o RKIP pode inibir a sinalização NF-κB, por inibir as cinases a montante deste, NIK e TAK1 (IKKα/β). (Adaptado de 17)

2.2.1. Cascata do ERK

A cascata MAPK pode ser iniciada por um grande número de estímulos, incluindo o EGF, TPA e a luz ultravioleta ⁽⁷⁵⁾. Foram descritas três cascatas MAPK, sendo que todas têm características em comum. São as três constituídas por uma proteína G e três cinases a jusante desta. Em todas, a proteína G activa o MAPKKK que, por sua vez, activa o MAPKK que activa o MAPK. Uma das cascatas MAPK é a cascata do ERK. Nesta, a proteína G é denominada Ras, ao MAPKKK corresponde o Raf, ao MAPKK o MEK e, por último o MAPK equivale ao ERK. O ERK é o último a ser activado nesta cascata e, depois de ser translocado para o núcleo, irá afectar factores de transcrição como o ELK, entre outros, envolvidos no crescimento, proliferação, diferenciação, mobilidade, transformação e sobrevivência celular ⁽¹⁶⁾, bem como estimular a produção de MMPs e consequente o processo de EMT ⁽⁷⁵⁾. As proteínas Raf são activadas pelo Ras, uma pequena GTPase que se localiza na membrana celular e se torna activa em resposta a uma grande variedade de mitogénios. A ligação do Raf ao Ras implica que o Raf seja deslocado do citosol para a membrana celular, onde a sua activação tem lugar. O Raf activado pode depois

fosforilar as cinases MEK1 e MEK2 que, por sua vez, podem activar o ERK, iniciando assim uma resposta apropriada ao sinal extracelular ^(76,77,78).

A cascata do ERK foi considerada constitutivamente activa em cerca de 30% de todos os cancros. Dois dos membros desta cascata, o Ras e o Raf, são considerados oncogenes. O Ras está frequentemente mutado em vários cancros, incluindo do pâncreas, pulmão, cólon, tiróide, fígado e testículos ⁽⁷⁹⁾. A família Raf tem a capacidade de fosforilar resíduos de serina/treonina ⁽²³⁾ e é composta por três membros: a a-Raf, o B-Raf e o Raf-1, também designado por c-Raf. As três isoformas Raf partilham o Ras como activador e o MEK como substrato ⁽⁸⁰⁾. Apesar deste último ter funções independentes da activação do Raf, não foram, até à data, identificados alvos do Raf além do MEK ⁽⁸¹⁾. O gene B-Raf apresenta mutações somáticas em 66% dos melanomas malignos ⁽⁸²⁾ e tem vindo a ser implicado em muitos outros cancros, inclusive nos cancros colorectal, papilar da tiróide e cancro seroso do ovário ^(83,84). A mutação mais comum no gene B-Raf deve-se a uma transversão missense de uma timina para uma adenina no nucleótido 1799, levando a uma troca V600E no exão 15 da proteína que este codifica ⁽⁸⁵⁾. Esta mutação é encontrada em cerca de 80% dos melanomas malignos não sendo, no entanto, encontrada em carcinoma de células basais ⁽⁸⁶⁾. A ocorrência desta transversão, tem como consequência a activação constitutiva do B-Raf, sem que para isso seja necessária acção do Ras. Cerca de 30% de todos os tumores humanos, apresentam uma hiperactivação da cascata do MAPK resultado de mutações quer no Ras quer no B-Raf ⁽⁸⁷⁾. Não foram identificadas mutações activadoras do c-Raf ou a sua expressão aberrante no cancro ^(82,88,89). Contudo, o c-Raf continua a ser um alvo terapêutico atractivo no tratamento de neoplasias, devido ao seu papel na transformação oncogénica a jusante do Ras oncogénico e de vários factores de crescimento. No entanto, o c-Raf não tem sido considerado de facto um oncogene. Porém, esta situação tem vindo a ser questionada recentemente com a identificação de mutações que ocorrem naturalmente no c-Raf e foram encontradas em alguns tipos de cancro ^(90,91), correlacionando-se com o grau e estágio tumoral ^(92,93). O c-Raf tem sido encontrado sobreexpresso em alguns tumores primários, tal como, tumores do fígado, pulmão, próstata, tumores neuroectodermas, leucemia mielóide e carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço ^(94,95,96,97,98,99). Apesar da incerteza do facto do c-Raf poder funcionar como um oncogene principal, não há dúvidas quanto ao facto de a sua função influenciar a presença de sinais oncogénicos num largo número de cancros ^(100,101,102,103,104,105,106,107,108,109). Além do seu papel na mediação dos efeitos provocados pelo Ras oncogénico, muitos estudos estabelecem para o c-Raf, um papel na promoção de efeitos transformantes numa grande variedade de receptores de factores de crescimento, oncogenes e mitogénios ^(101,108,110,111). Alguns efeitos de mutações activantes

ou oncogénicas do B-Raf podem ser mediados através do c-Raf ^(112,113). O c-Raf foi, também, implicado na invasão celular.

Aparentemente, apenas uma mutação na cascata MAPK parece ser suficiente para a progressão tumoral ⁽¹¹⁴⁾. O RKIP funciona como um regulador negativo da cascata de sinalização Raf-MEK-ERK ⁽¹³⁾. Inibe a cínase Raf por se ligar directamente ao Raf-1 prevenindo a sua fosforilação e consequente activação ⁽¹⁴⁾. Ao ligar-se ao Raf-1 impede que este interaja e, consequentemente, fosforile o MEK, prevenindo assim a activação da cascata a jusante deste ^(18,115). Em contraste com o que acontece com o Raf-1, a activação do B-Raf não é directamente regulada pelo RKIP. No entanto, o papel do RKIP na regulação do Raf-1 pode afectar indirectamente a sinalização do B-Raf ⁽⁶⁷⁾. A ligação de um ligando no bolso do RKIP ou uma mutação neste local impede que este se possa ligar e, portanto, inibir, o Raf-1. Assim, conclui-se que mutações no bolso do RKIP têm consequências na sinalização MAPK ⁽¹⁴⁾. A Locostatina é uma molécula que tem como alvo o RKIP e que pode inibir a capacidade deste último se ligar ao Raf-1 e, assim, inibir a propagação de sinal na cascata MAPK ⁽⁷⁵⁾.

2.2.2. Cascata dos GPCRs

A família PKC é uma família de serina treonina cínases que são mediadoras de alguns processos celulares tais como o crescimento, morte, diferenciação e transformação ⁽¹¹⁶⁾. A PKC fosforila o RKIP na serina 153 o que resulta na dissociação entre o RKIP e o Raf-1, impedindo a inibição do Raf-1 pelo RKIP, convertendo este último num inibidor do GRK-2, promovendo a sinalização GPCR e activando a cascata do ERK. Assim ocorre uma interacção entre estas duas cascatas ^(70,115). PKC é, tal como o Ras, capaz de activar o Raf-1 e/ou o MEK, activando assim a cascata do ERK ⁽¹¹⁶⁾. GPCR são receptores de membrana, acoplados a proteínas G, que transmitem sinais para o citoplasma ⁽¹¹⁵⁾ e controlam processos como a neurotransmissão, libertação de enzimas e hormonas, inflamação e regulam a pressão sanguínea. O GRK2 é uma cínase que funciona como inibidor de algumas GPCRs. Actua fosforilando os GPCR activados, desacoplando-os das proteínas G a ele associadas e, marcando-os para a degradação. Fica, assim, inibida a sinalização GPCR ^(17,67,75). Bloqueando a actividade do GRK2, a sinalização através das GPCRs é estimulada ⁽⁷⁵⁾.

2.2.3. Cascata do NF-κB

A família de factores de transcrição nucleares, NF-κB, tem um papel importante na coordenação da expressão de um grande número de genes que controlam a resposta

imune e o stress ⁽¹⁷⁾. O RKIP inibe a actividade do NF- κ B por interactivar com parte dos seus activadores, nomeadamente o NIK e o TAK-1 (IKK α/β) ^(15,23,117). A inibição do RKIP promove a transcrição mediada pelo NF- κ B. Contrariamente, a sobreexpressão do RKIP reduz esta transcrição ⁽¹⁸⁾. Assim, o RKIP influencia os processos mediados pelo NF- κ B, tais como a produção de citocinas e seus receptores, a adesão celular de moléculas e efectores apoptóticos ⁽¹⁹⁾ e a metastização estimulada pelas Snail ⁽⁷⁶⁾. Surpreendentemente, a regulação da via do NF- κ B por acção do RKIP não é verificada em células não tumorais ⁽⁶⁷⁾.

2.3. RKIP e o ciclo e diferenciação celular

A separação igual dos cromossomas nas células filhas durante a mitose, é controlada por inúmeros factores. As proteínas Aurora B cinases são as principais responsáveis. Contudo, a cascata MAPK tem, também, um papel fundamental na regulação do ciclo celular. O RKIP associa-se com os centrossomas e cinetocoros e regula a formação do fuso mitótico. A perda ou inibição do RKIP, bem como uma sobreexpressão da cinase Raf, promove a hiperactivação da cascata do ERK e, conseqüente, a inibição da Aurora B cínase originando problemas na separação dos cromossomas, aumentando a ocorrência de anomalias cromossómicas, muitas delas, características de alguns tipos tumorais ^(67,118). Conclui-se assim que o RKIP tem um papel importante na manutenção da estabilidade genómica ⁽¹¹⁹⁾ e que, a ausência de expressão do RKIP pode aumentar a instabilidade genética na célula ⁽¹¹⁸⁾ bem como a taxa de divisão celular ⁽¹²⁰⁾. Assim, ausência de expressão do RKIP pode levar a um crescimento tumoral e à disseminação do mesmo, sendo portanto um factor de mau prognóstico ⁽⁶⁷⁾.

Existem algumas evidências que sugerem que o RKIP pode regular a diferenciação de células de mamíferos. O RKIP é expresso nas camadas granulares da pele normal, mas não na camada basal da epiderme. Os níveis de expressão de RKIP são também inexistentes em carcinomas indiferenciados. A expressão do RKIP está associada com a diferenciação das células da pele e o aumento dos níveis de RKIP promove a diferenciação de queratinócitos humanos. A expressão desta proteína também se correlaciona com a diferenciação de macrófagos e células dendríticas e a sua sobreexpressão induz a expressão de marcadores específicos para a maturidade dos macrófagos (CD11c e CD36) ⁽¹²¹⁾. Contudo, ainda existem algumas lacunas nesta teoria e, portanto, mais estudos são necessários neste domínio.

2.4. Expressão do RKIP em diferentes tecidos

Estudos de imunohistoquímica anteriormente realizados em tecidos de doentes com diferentes tipos tumorais, indicaram que a expressão do RKIP é alta ou moderada em tecidos normais, diminuindo em tumores primários e sendo baixa ou indetectável em metástases desses mesmos tumores ^(17,20,21,22). A expressão de RKIP é, também, mais alta em tumores benignos do que malignos ⁽¹⁵⁾. Assim, verifica-se uma diminuição dos níveis de RKIP em células de carcinomas espinocelulares ⁽²⁴⁾, melanomas malignos ^(85,122,123), carcinoma da próstata ^(124,125), carcinoma colorectal ^(20,126,127), carcinoma gástrico ⁽¹⁵⁾, carcinoma da mama ^(22,40,120,124), carcinoma da nasofaringe ⁽¹²⁹⁾, carcinoma do pulmão ⁽²¹⁾, carcinoma hepatocelular ^(120,128), carcinoma anaplásico da tiróide ⁽¹³⁰⁾, carcinoma da vesícula biliar ⁽¹³¹⁾ e insulinosomas ⁽¹³²⁾ relativamente aos mesmos tecidos normais. No entanto, os valores de expressão do RKIP nos tumores primários acima referidos são mais elevados do que nas células metastáticas dos mesmos tumores ^(15,20,21,22,24,40,85,120,122,123,124,125,126,127,128,129,130,132). Com recurso a estes estudos, foi possível concluir que existe uma correlação entre a expressão diminuída de RKIP e a ocorrência de metástases ⁽²¹⁾. Tumores primários com níveis reduzidos de expressão de RKIP têm maior tendência para metastizar ⁽¹⁵⁾, estando a diminuição de expressão do RKIP associada a um aumento do índice angiogénico e da capacidade invasiva das células tumorais ⁽²¹⁾. Foi também verificado que o aumento de expressão do RKIP está associado a uma diminuição do desenvolvimento de metástases sem, no entanto, afectar a taxa de crescimento do tumor primário, concluindo-se que o RKIP funciona, assim, como um gene supressor de metástases em alguns tumores sólidos, tal como os carcinomas da mama e da próstata ^(21,124,133,134,135). Os níveis de RKIP podem servir como marcadores de prognóstico nos cancros da próstata ⁽¹²⁵⁾, colorectal ^(23,126) e em tumores espinocelulares cutâneos ⁽²⁴⁾. Na realidade, a diminuição dos níveis de expressão do RKIP está associada a um estado clínico mais avançado e com presença de metástases ganglionares ⁽⁷³⁾ bem como a uma diminuição do tempo de sobrevivência de doentes com cancro da próstata ⁽¹²⁵⁾, colorectal ^(20,126) e gástrico ⁽¹³⁶⁾. Assim, o gene do RKIP pode ser útil como marcador de prognóstico e alvo de tratamento terapêutico nestes tipos de cancro ⁽²⁴⁾. Uma possível estratégia para o tratamento destes doentes poderá passar por restaurar os níveis de expressão do RKIP através de terapia génica. No entanto, seria necessário, averiguar a segurança e a especificidade desse tratamento. Assim, existem outras estratégias como o uso de pequenas moléculas com o objectivo de induzir a expressão do RKIP ou modular as cascatas reacionais com este relacionadas ⁽¹⁷⁾. Por tudo o que foi anteriormente dito, o RKIP tem sido considerada uma molécula promissora como alvo de terapia dirigida ⁽²³⁾.

2.5. RKIP e a resposta ao tratamento

O RKIP influencia a resposta dos doentes oncológicos ao tratamento. Assim, em células tumorais da próstata ⁽¹²⁴⁾, da mama ⁽¹²⁴⁾ bem como em doentes com linfoma de células B não Hodgkin ⁽¹³⁷⁾, o RKIP sensibiliza as células tumorais para a apoptose mediada por drogas. Verifica-se um aumento dos níveis de RKIP após a apoptose induzida por quimiotráticos. ⁽¹²⁴⁾ Esta situação deve-se ao facto da já referida capacidade do RKIP inibir a sinalização do ERK e NF-κB e induzir danos no DNA ⁽¹²⁴⁾. Por outro lado, os níveis de expressão de RKIP influenciam a resposta à radioterapia. Doentes com carcinomas da nasofaringe ⁽¹³⁾ e da próstata ⁽⁷³⁾ e que apresentem níveis mais baixos de RKIP nas células dos seus tumores, têm pior prognóstico e maior probabilidade de recidiva, em parte devido ao facto de os seus tumores serem radorresistentes. O RKIP pode funcionar como um biomarcador para a sensibilidade à radiação e prognóstico nestes tipos de cancro, fazendo desta proteína essencial para que possa ocorrer apoptose induzida por radiação ^(13,73).

2.6. RKIP e a doença de Alzheimer e a espermatogénese

Além de poder estar envolvido em processos que directa ou indirectamente culminem no desenvolvimento tumoral, o RKIP desempenha um papel importante na doença de Alzheimer e na espermatogénese normal. O RKIP é altamente expresso no tecido neurológico e, dada a importância das cascatas MAPK, GPCR e NF-κB no sistema nervoso, é lógico que o RKIP deva desempenhar aqui um papel importante. O RKIP é precursor do péptido HCNP, que corresponde a 11 aminoácidos da parte N-terminal do RKIP. Este péptido promove a diferenciação dos neurónios colinérgicos do septohipocampo, através do estímulo de produção de colina acetiltransferase ⁽¹³⁸⁾. Recentemente, o RKIP foi implicado em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. Verificou-se a existência de uma expressão reduzida do RKIP no hipocampo destes doentes ⁽¹³⁷⁾. Estudos nesta área concluíram que a redução nos níveis de RKIP ou do seu derivado, HCNP, pode originar disfunções colinérgicas no cérebro que estão relacionadas com a perda de memória com o avançar da idade, bem como défices olfactivos, sintomas característicos dos doentes com doença de Alzheimer ⁽⁷⁵⁾.

Foi, também, identificada a expressão do RKIP no esperma de mamíferos ⁽⁷¹⁾ e fluidos epididimais e testiculares ⁽⁷⁵⁾. Esta proteína parece ser importante na habilidade dos espermatozóides fecundarem o oócito ⁽⁷⁵⁾. Contudo, nem todos os estudos até hoje realizados, são coerentes com o facto de o RKIP ter um papel importante na espermatogénese ⁽¹³⁹⁾. Assim, será necessário intensificar os estudos nesta área.

2.7. Controvérsia e dúvidas a esclarecer

Apesar de praticamente todos os estudos tirarem as mesmas conclusões sobre a acção do RKIP, outros há que põem em causa muito do que foi dito até aqui. Em estudos realizados em doentes com melanoma, o RKIP encontra-se expresso de uma forma homogénea em tumores primários e tumores metastáticos e a imunoexpressão do RKIP não parece estar correlacionada com a fosforilação do ERK ou com o prognóstico dos doentes ⁽¹⁴⁰⁾. Em nódulos regionais e metastáticos de cancro da mama, não foi encontrada uma correlação inversa entre a expressão de RKIP e a fosforilação do ERK ⁽²²⁾. Em linhas celulares de carcinoma de células de Merkel, o silenciamento do RKIP não leva a um aumento nos níveis de fosforilação do ERK, sugerindo que a acção do RKIP não é crítica para o silenciamento da cascata MAPK. Mais estudos necessitam por isso de ser realizados com o objectivo de definir com certeza o papel do RKIP na progressão na cascata do ERK.

Embora a acção biologia do RKIP esteja parcialmente delineada, muitas questões necessitam ainda de resposta. Como é que é regulada a função do RKIP? A fosforilação de alguns resíduos em particular, tal como a Serina 153 pode ser um mecanismo importante. Além das cascatas do MAPK, NF- κ B e GPCR, regulará o RKIP outras vias? A identificação sistemática dos padrões de ligação do RKIP podem ajudar a responder a esta questão. A maior parte dos estudos, localizou o RKIP no citosol, contudo existem poucos estudos que o localizaram na membrana ou fluido extracelular ^(74,141,142). Terá o RKIP diferentes funções dependendo da sua localização? A função dos genes homólogos do RKIP, PEBP2 e PEBP4 não tem sido extensamente estudada. Haverá alguma interacção entre estes genes e o RKIP? Como será regulada a expressão do RKIP quer a nível da transcrição quer a um nível posterior? Recentemente, a transcrição do RKIP foi descrita como sendo inibida por proteínas designadas Snail ^(143,117,76). Além da inibição do RKIP, estas proteínas têm duas funções essenciais: a inibição da caderina E e o estímulo da produção de MMPs. Estes fenómenos associados à perda de adesão célula-célula e à invasão, metástase e recorrência tumoral estimulam o processo de EMT. Durante este processo, as células epiteliais adquirem certas características das células mesenquimatosas tornando-se aptas a penetrarem através da membrana basal e invadirem tecidos vizinhos. A penetração da camada mesenquimatosa leva, por sua vez, à infiltração venosa e à migração para outras partes do corpo ⁽⁷⁶⁾. A metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético para o silenciamento de vários genes e é interessante estudar este mecanismo na acção do RKIP. Alguns estudos demonstram que a hipermetilação do RKIP não é a causa da sua subregulação em células de melanoma ⁽¹²²⁾, linhas celulares de carcinoma da próstata ⁽¹⁴³⁾ e cancro colorectal ⁽¹²⁶⁾. No entanto, um artigo recente con-

cluiu que a metilação do promotor do RKIP é um mecanismo fulcral pelo qual a expressão do RKIP é silenciada no cancro colorectal ⁽¹¹⁹⁾. Em que é que a regulação da cascata MAPK realizada pelo RKIP difere da regulação feita por outros inibidores, tal como as proteínas Sprouty ⁽⁷⁴⁾? O RKIP foi descrito como sendo um inibidor de serina proteases ⁽¹¹⁴⁾. Qual a relevância fisiológica desta descoberta? Estas são algumas das dúvidas que têm que ser esclarecidas para que possa vir a ser totalmente entendida a função e acção do RKIP.

3. CD147

3.1. Características gerais da proteína

O CD147 é uma proteína transmembranar ⁽²⁵⁾, membro da superfamília das imunoglobulinas ⁽²⁶⁾, que foi originalmente isolado a partir da membrana plasmática de células tumorais malignas ^(145,146), tendo sido inicialmente designado por Biswas como factor estimulante da collagenase derivada de células tumorais, TCSF ⁽¹⁴⁷⁾. Actualmente, além de CD147 é, também, designado por EMMPRIN, indutor extracelular de metaloproteínas da matriz ⁽²⁵⁾, ou Basigina, um homólogo deste no rato e humano ^(148,149).

Tal como podemos observar na Figura 4, o CD147 é constituído por um domínio extracelular com 185 resíduos e composto por dois loops de imunoglobulina, um domínio transmembranar com 24 resíduos e um domínio citoplasmático com 39 aminoácidos ^(25,149,150,151). A região transmembranar da proteína é uma região altamente conservada nos humanos e outras espécies, sendo este facto indicador da sua importância na função da molécula. O aminoácido carregado, glutamato, encontra-se no centro deste domínio e permite que o CD147 se possa associar a outras proteínas transmembranares ⁽¹⁵¹⁾. O domínio intracelular do CD147 é também altamente conservado e pode fazer a transdução de sinal intracelular. Na região N-terminal presente no domínio extracelular, o CD147 possui três locais de glicosilação ^(152,153,154). Esta glicosilação funciona como um importante mecanismo regulador da função da proteína ⁽²⁶⁾, determinando a sua capacidade estimuladora de MMPs ^(151,153), uma vez que proporciona uma maior associação com os componentes da matriz extracelular ⁽²⁶⁾. Quanto maior a glicosilação do CD147, maior essa capacidade. A razão entre o CD147 altamente glicosilado e o CD147 pouco glicosilado é muito superior em lesões espinocelulares pré-malignas da cavidade oral e em carcinomas espinocelulares metastáticos, quando comparado com as células escamosas orais primárias ⁽³⁸⁾. É também na região N-terminal do domínio extracelular da proteína que se pode ligar outra molécula de CD147, formando um homo-oligómero. Se a ponte dissulfeto presente no loop de imunoglobulina mais próximo da região N-terminal da proteína for destruída por alguma mutação, o CD147 não forma esse homo-oligómero, comprometendo a sua função ⁽²⁵⁾.

A sua localização foi essencialmente verificada a nível da superfície celular ⁽²⁵⁾. No entanto, em alguns estudos, verificou-se a presença de CD147 solúvel. Pode encontrar-se esta proteína sob forma solúvel graças a um processo que ocorre devido à quebra proteolítica da sua região C-terminal ^(25,42). Esta forma solúvel tem uma maior capacidade de estimular a expressão de MMPs, potenciando a formação de metástases à distância ⁽¹⁵⁷⁾. Estudos de imunohistoquímica verificaram uma distribuição organizada do CD147

que é perdida no tecido tumoral, onde esta proteína é expressa em toda a lesão tumoral, de uma forma semelhante em todas as células ⁽²⁵⁾. Além da sua expressão elevada em células tumorais, o CD147 é altamente expresso nos linfócitos T e B activos, tal como em células dendríticas, em monócitos, macrófagos ⁽¹⁵⁸⁾ camadas basais do epitélio da derme ⁽¹⁵⁹⁾ e da córnea ⁽¹⁶⁰⁾.

O gene que codifica a proteína CD147 é designado BSG e localiza-se no cromossoma 19q13.3. ^(161,162), tendo sido descrito como um dos genes mais vezes sobrerregulado em células metastáticas ⁽¹⁶³⁾. Este gene pode estimular a sua própria expressão através de um mecanismo de feedback positivo ^(156,157).

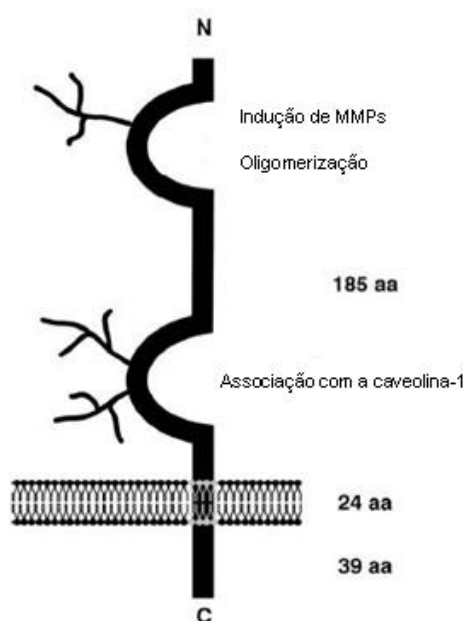


Figura 4: Esquema representativo da molécula CD147. (Adaptado de 25)

3.2. Funções gerais do CD147

O CD147 é sobretudo regulado a nível da transcrição por alguns factores de transcrição sensíveis a reacções redox, tal como o NF- κ B e o AP-1 ⁽¹⁶⁴⁾, mas também por algumas proteínas intracelulares, tal como o p38-MAPK e o ERK. O CD147 desempenha funções importantes, quer em condições normais, quer patológicas. Assim, tem a capacidade de regular o desenvolvimento tumoral, estando associado com o crescimento do tumor, metastização, invasividade tumoral e angiogénese tumoral. Para que tal aconteça, o CD147 estimula a produção de MMPs pelos fibroblastos peritumorais e células tumorais ^(25,27,28), controla o balanço entre a remodelação/restauro da homeostase e a destruição do estroma através de um mecanismo de feedback ⁽²⁵⁾, induz a produção de VEGF e hia

luronano ^(25,27), desempenha funções fulcrais como molécula de adesão ^(26,28) e é capaz de regular o mecanismo de resistência a certas drogas. ^(34,35,36,37,157,165,166,167,168,170) Esta proteína está também envolvida na formação de placas de aterosclerose ⁽¹⁷¹⁾ estando também ligada à disfunção cardiovascular e remodelação do miocárdio ⁽¹⁷²⁾. O CD147 está envolvido em funções fisiológicas importantes tal como o desenvolvimento e diferenciação celular ⁽²⁵⁾, a maturação e activação de células do sistema imunitário e de processos que medeiam a entrada de vírus nas células, nas interacções célula-célula, no desenvolvimento do sistema nervoso, no desenvolvimento da barreira hematoencefálica, no desenvolvimento retinal, no desenvolvimento fetal, na reprodução, na ovulação, na espermatogénese e na activação de plaquetas ^(26,46,173,151,174,175,176,177,178).

3.2.1. CD147 como estimulador da produção de MMPs

O CD147 do tumor induz de uma forma parácrina a produção, expressão e activação, pelas células peritumorais (sobretudo fibroblastos, mas também células endoteliais e inflamatórias ^(179,180,181)), de MMPs solúveis, ancoradas à membrana, bem como dos seus activadores endógenos ^(42,182). Contudo, pode fazê-lo também de uma forma autócrina, estimulando as próprias células do tumor ⁽⁴²⁾. Estas funções do CD147 são reguladas por complexos mecanismos que incluem factores de transcrição dependentes da cascata do ERK, tal como o ETS-1 ^(182,183), factores parácrinos como as citocinas ⁽²⁵⁾, factores de crescimento de células neoplásicas ^(25,173) ou elementos reactivos do estroma ⁽¹⁷³⁾, interacções célula-célula ⁽¹⁷³⁾ ou hormonas ⁽²⁵⁾.

Os fibroblastos quiescentes produzem pequenas quantidades de MMPs. No entanto, os fibroblastos estimulados, por estarem junto a células tumorais, produzem níveis aumentados de MMPs ⁽⁶⁶⁾. As interacções célula-célula ou célula-ECM são um sinal crucial para a sobrerregulação de expressão de MMP nas células tumorais e células peritumorais ⁽¹⁸⁴⁾.

3.2.1.1. Características gerais das MMPs

Diferentes tipos de células podem produzir diferentes tipos de MMPs em resposta ao estímulo do CD147 ⁽²⁵⁾. Dessas MMPs, fazem parte a MMP-1 (colagenase intersticial) ^(35,36,42,150,185,186), a MMP-2 (gelatinase A) ^(35,36,42,150,185,186), a MMP-3 (eritromelina 1) ^(35,36,42,150,185,186), a MMP-9 (gelatinase B) ^(42,185,186), a MMP-11 ^(35,36,150), a MMP-14 ⁽⁴²⁾, a MMP-15 ⁽⁴²⁾ e algumas MT-MMPs ⁽¹⁸⁷⁾. Até 2009, foram caracterizados pelo menos 28 tipos diferentes de MMPs ⁽¹⁸⁸⁾ que partilham uma homologia considerável (30 a 50%) nos seus principais domínios ⁽²⁹⁾ e que podem ser classificadas em subgrupos de gelatinases,

colagenases, eritromelisinases, MMPs de membrana e outros ⁽¹⁸⁹⁾. As MMPs são enzimas que requerem o íon zinco no seu centro activo para que possam exercer as suas funções, sendo inibidas por agentes quelantes de zinco e cálcio ⁽²⁹⁾, bem como por moléculas inibidoras de metaloproteínases específicas do tecido, os TIMPs ⁽²⁹⁾.

3.2.1.2. Funções gerais das MMPs

Tal como o CD147, as MMPs desempenham tanto funções fisiológicas, como patológicas ⁽¹⁷³⁾. Assim, as MMPs estão envolvidas na remodelação do tecido normal, restabelecendo a homeostase dos tecidos ⁽²⁵⁾, estando, por isso, envolvidas no desenvolvimento e reprodução, processos que envolvem uma grande remodelação tecidual ⁽¹⁹⁰⁾. Têm um papel importante na diferenciação tecidual pela sua capacidade de modificação da matriz extracelular e de clivagem de substratos extracelulares, como as citocinas e receptores membranares ⁽¹⁹¹⁾. Assim, os níveis de MMPs aumentam com o grau de diferenciação tecidual ⁽¹⁹¹⁾.

As MMPs têm uma acção proteolítica capaz de degradar o colagénio, quebrando-o num único local da tripla hélice ⁽²⁹⁾. Assim, degradam os ECM e as membranas basais, constituídas por colagénio, lamina, hialuronano e proteoglicanos de sulfato de heparina ⁽¹⁹²⁾. As MMPs podem também influenciar o microambiente celular, já que alteram sinais celulares ⁽¹⁹³⁾. Adicionalmente, a expressão de MMPs pode contribuir para libertar e activar citocinas, como os membros da família TGF β , podendo este processo ser importante na regulação da miogénese ^(194,195). Estão também envolvidas no processo de cicatrização, reparação tecidual, reabsorção óssea, angiogénese e morfogénese tecidual ^(30,33,196). Por outro lado, as MMPs podem ter um papel na criação e manutenção de um microambiente celular que facilita os estádios iniciais do desenvolvimento tumoral ^(197,198). As MMPs regulam o ambiente tumoral e a sua expressão está aumentada na maior parte das neoplasias ⁽²⁵⁾. As metaloproteínases da matriz intervêm em processos como a angiogénese tumoral, a manutenção do microambiente das células tumorais, necessário para a proliferação e invasão tumoral e, portanto, metastização ^(29,30,31,32,33). A expressão de MMPs está aumentada em diversos tipos cancro e constitui um factor de mau prognóstico ⁽¹⁷³⁾.

Das MMPs estimuladas pelo CD147, a MMP-2 e MMP-9 são as que estão mais associada com a progressão tumoral em algumas formas de cancro ^(29,199,200,201,202,203). A MMP-2 tem 72 kDa e é expressa constitutivamente na maior parte das células, incluindo células endoteliais e epiteliais, sendo a MMPs mais amplamente distribuída nos tecidos. Esta metaloproteínase é secretada numa forma inactiva e, quando convertida na sua forma activa, pode degradar colagénio tipo IV, V e IX, gelatina, lamina, fibronectina, elas

tina e proteínas ligadas ao peptidoglicano ^(173,204,205). Tal situação acontece quer em tecidos normais quer tumorais, sendo que, nestes últimos, a degradação da membrana basal permite que as células tumorais escapem do tumor primário, levando à invasão e metastização ⁽²⁰⁶⁾. Em situações patológicas, a razão entre a MMP-2 activa/MMP-2 total está relacionada com a agressividade do tumor ^(181,207). Assim, níveis altos de MMP-2 activa estão relacionados com um pior prognóstico ^(202,209,210). As metaloproteínases de matriz do tipo de membrana (MT-MMP) parecem ser um importante activador celular das MMP-2 ⁽²⁰⁴⁾.

Por outro lado, a MMP-9 tem 92 kDa e é produzida pelas células inflamatórias ⁽²⁹⁾ e pode degradar o colagénio IV, um componente maioritário da membrana basal, potenciando, em situações patológicas, a invasão tumoral. Os níveis de expressão ou actividade da MMP-9 são mais elevados em tumores invasivos do que em tumores não invasivos ⁽²⁰⁶⁾. Os níveis de expressão de MMP-9 e CD147 correlacionam-se com a invasão e metástase ganglionar ^(43,208) em carcinomas espinocelulares do colo do útero, podendo funcionar como marcadores moleculares na previsão da metastização nodular neste carcinoma ⁽⁴³⁾. Em carcinomas espinocelulares da cavidade oral, a expressão aumentada das duas proteínas acima referidas pode estar associada com a invasão do osso ⁽¹⁹²⁾.

Num estudo em biopsias de carcinoma endometrial, verificou-se um aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9, correlacionando-se este aumento com a promoção da angiogénese e invasão tumoral ⁽²¹¹⁾. Num modelo *in vivo* de angiogénese e invasão tumoral, o tratamento com um inibidor de MMP-2 causou uma supressão da actividade angiogénica e invasora do tumor ⁽²¹²⁾. Este resultado permite-nos concluir que a MMP-2 está fortemente implicada na angiogénese tumoral. A regulação da angiogénese pelas MMPs sugere que possam ser descobertas estratégias clínicas que directamente diminuam a actividade das MMPs do tumor e assim, diminuam a angiogénese ⁽²⁹⁾. Apesar da maior parte dos estudos, mostrar uma associação entre a expressão de MMP-9 e a metastização ganglionar, Charous et al ⁽²¹³⁾ concluiu que não há diferença nos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9, entre os carcinomas espinocelulares da cavidade oral primários e metastáticos ⁽¹⁹²⁾. Mais estudos são, por isso, necessários para compreender a acção das MMPs na progressão e agressividade tumoral.

3.2.2. CD147 e a adesão celular

A segunda função do CD147 melhor caracterizada, depois da sua capacidade de estimular a produção de MMPs, é a sua capacidade de regular a adesão intracelular ⁽²⁸⁾. Para que tal aconteça, o CD147 interage com outras moléculas de superfície celular, tal como os membros da família das integrinas ^(214,215,216). As integrinas são receptores que

medeiam o contacto entre a célula e os tecidos que a rodeiam (outras células ou a matriz extracelular). Entre os ligandos das integrinas podemos destacar a fibronectina, a vitronectina, o colagénio e a lamina. As integrinas desempenham também um papel importante na transdução de sinal entre a célula e a matriz extracelular. Os sinais que a célula recebe através das integrinas podem estar relacionados com o crescimento, diferenciação, divisão e sobrevivência celular e apoptose. A acção entre as integrinas e o CD147 pode também influenciar a expressão de MMPs ^(25,216,217).

3.3. CD147 e o transporte de lactato

A carcinogénese epitelial inicial ocorre sob condições de hipoxia, uma vez que algumas das células ficam separadas do estroma vascularizado que lhes fornece oxigénio e nutrientes. Para manter os níveis de ATP as células tumorais aumentam as suas taxas de glicólise anaeróbia desenvolvendo vantagens proliferativas significativas. Contudo, este fenótipo origina um excesso de ácido láctico que necessita de ser expelido da célula, causando uma diminuição do pH extracelular. Consequentemente, a sobre-regulação da glicólise requer adaptações, nomeadamente resistência à apoptose e sobre-regulação dos transportadores de membrana para manter o pH intracelular ^(218,219). Apesar de ser uma adaptação ao fenótipo altamente glicolítico, um ambiente ácido representa, por si só, uma vantagem significativa para as células tumorais, uma vez que está associado com a inibição da função citotóxica das células T peritumorais, permitindo um crescimento tumoral contínuo ⁽²⁶⁾, um aumento da migração, invasão e metástase, entre outros ^(218,220,221). Assim, a acidose tumoral, resultante do excessivo transporte de lactato para o meio extracelular, produz fenótipos mais agressivos ^(221,222,223,224).

A sobre-regulação da glicólise anaeróbia e a adaptação à acidose são eventos chave na transição entre carcinomas *in situ* e cancro invasor ⁽²¹⁸⁾. Um dos grupos de proteínas mais importante na regulação do pH intracelular é o grupo dos MCTs ⁽²²⁵⁾, proteínas transportadoras que catalisam o transporte de monocarboxilato, incluindo lactato e piruvato, num mecanismo de simporte de prótons ^(41,226). Dois membros desta família de proteínas, MCT1 e MCT4, precisam do CD147 como um chaperone, para que sejam expressas na membrana plasmática e, assim, poderem exercer a sua função ⁽²²⁷⁾. O CD147 liga-se a dois monómeros de MCT quando forma um homo-oligómero ⁽²²⁷⁾. Só quando a ligação entre o CD147 e os MCTs ocorre é que estes últimos são transportados para a membrana plasmática ⁽²²⁷⁾, podendo este processo ser observado na Figura 5.

A supressão dos transportadores monocarboxilados associados a prótons, MCT1 e MCT2, induz necrose nas células malignas de glioma através da acumulação de lactato e da diminuição do pH intracelular ⁽²²⁸⁾. O CD147 também regula a sobrevivência de célu-

las tumorais em associação com o MCT1. Um anticorpo monoclonal anti-CD147 induz a necrose em células de melanoma maligno e cancro do cólon. Uma vez que as células tumorais dependem mais da glicólise anaeróbia para a produção de energia do que as células normais como os fibroblastos, a morte células induzida é específica para as células tumorais ⁽²²⁹⁾.

Altos níveis de expressão de MCT1 e MCT4 correlacionam-se com o grau do tumor, o estágio clínico, tumor residual mas não com o tipo histológico ⁽⁴¹⁾ e são indicadores da transição entre tecido normal e maligno. Assim, os inibidores de MCT têm sido propostos como agentes anti-cancro. ^(228,229,230,231,232). Existe um aumento de expressão de MCTs em carcinoma colorectal ^(41,233,234), do colo do útero ⁽¹⁶⁵⁾, do pulmão ⁽²³⁵⁾, estômago ⁽²³⁶⁾ e carcinoma espinocelular ⁽⁴¹⁾.

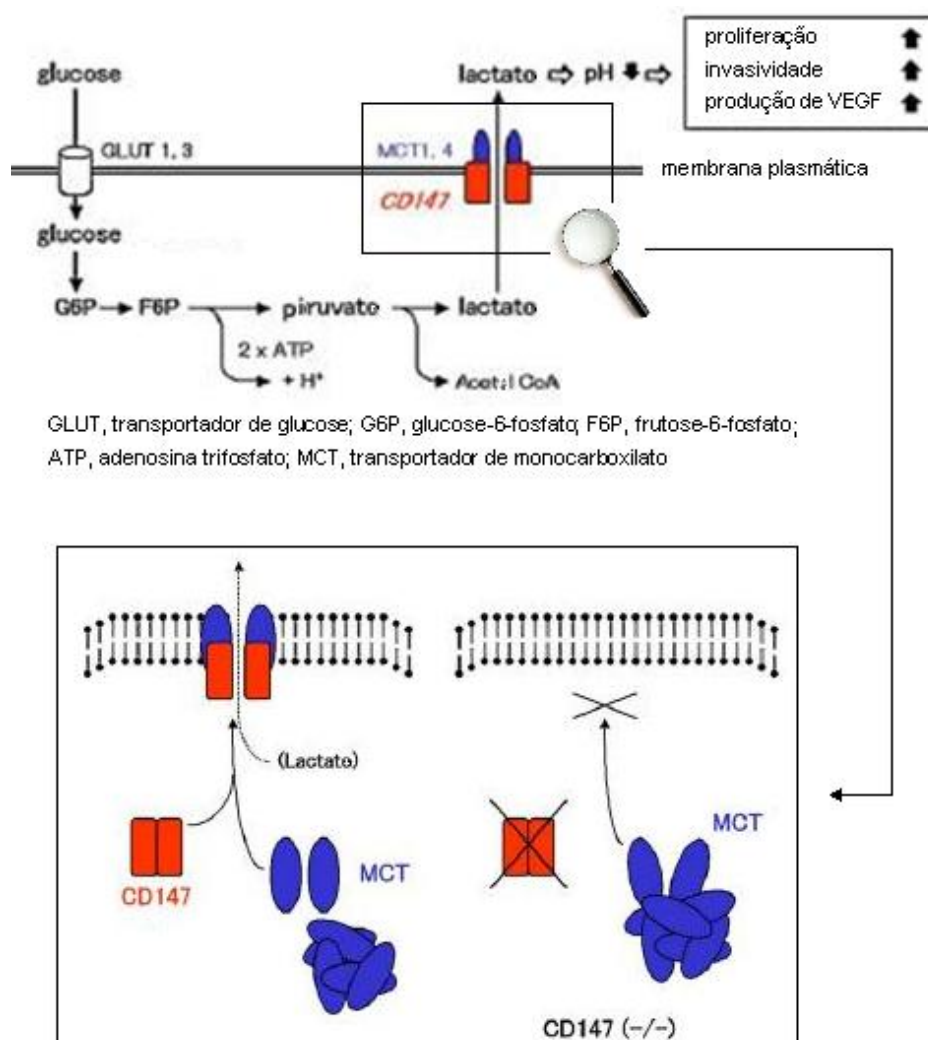


Figura 5: Papel do CD147 no transporte de lactato. Apenas quando o CD147 se liga aos MCT o lactato é transportado para o exterior da célula, conseqüentemente o pH extracelular diminui, propiciando a proliferação celular, invasividade e produção de VEGF. ^(Adaptado de 187)

3.4. CD147 e a angiogénese

O processo angiogénico requer: (a) degradação da membrana basal e dos componentes da matriz extracelular que circundam os vasos sanguíneos; (b) quimiotaxia das células endoteliais através de um estímulo angiogénico; (c) proliferação das células endoteliais e (d) remodelação da membrana basal, resultado da actividade das MMPs e formação de novos vasos sanguíneos ^(237,238). O CD147 promove a angiogénese não só através da estimulação da expressão de MMPs, mas também através da estimulação da expressão de VEGF ^(157,239). O aumento da expressão do CD147 resulta num estímulo imediato da produção de VEGF pelas células do estroma peritumoral e/ou na libertação de factores de crescimento angiogénico, biologicamente activos, que modulam a secreção de VEGF num modo que pode ser, ou não, dependente das MMPs ^(157,240). O VEGF promove a angiogénese, estimulando a formação de neovasos ⁽²⁴¹⁾ e está relacionado com a taxa de metastização do tumor primário e com mau prognóstico em doentes com carcinomas gástrico, colorectal e esofágico ^(242,243). O Bevacizumab é um anticorpo IgG que funciona como terapia-alvo e neutraliza a actividade do VEGF causando inibição da angiogénese e por isso do crescimento tumoral. A perda de CD147 diminui a produção de VEGF. Um estudo anterior sugere que a expressão de CD147 é necessária para que os tumores respondam à terapia com Bevacizumab. Esta terapia é efectiva em tumores que expressem CD147 mas não em tumores com silenciamento da expressão desta proteína. Este estudo sugere que os níveis de CD147 podem ajudar a determinar se os doentes responderão ou não a esta terapia ⁽²⁴⁴⁾. Um outro estudo sugere que a expressão de VEGF e de CD147 está associada à resistência a outros tipos de tratamento e a um pior prognóstico em alguns tumores ⁽²⁴⁵⁾.

3.5. CD147 como estimulador da actividade do hialuronano e ciclofilina A

Além das moléculas já acima referidas, o CD147 tem a capacidade de estimular a actividade do hialuronano e da ciclofilina A. A expressão aumentada de CD147 estimula a síntese de hialuronano pelas células tumorais ⁽²⁴⁶⁾. O hialuronano, também designado por ácido hialurónico, é um glicosaminoglicano carregado negativamente e que se encontra distribuído no tecido conjuntivo, epitelial e neurológico. Esta molécula está envolvida em processos relacionados com o crescimento independente de ancoragem, proliferação, sobrevivência e metástase de células tumorais e com a cicatrização tecidular. Através de um processo dependente do hialuronano e mediado pelas cascatas PI3K, ERK1/2 e FAK, o CD147 afecta a resistência das células a quimiotráticos ⁽²⁴⁷⁾. Em células de carcinoma

espinocelular da cavidade oral resistentes a drogas existe uma abundância de moléculas que interagem com o CD147, nomeadamente o hialuronano ⁽¹⁷⁰⁾.

O CD147 funciona como um receptor de superfície celular na interacção com a ciclofilina A, uma isomerase citosólica. Esta interacção proporciona a proliferação de células tumorais, inibição da apoptose induzida por stress oxidativo, síntese de DNA e quimiotaxia. Estes processos são potenciados devido à acção da ciclofilina A e CD147 sobre as cascatas do ERK e p38-MAPK. Sob acção do CD147, a ciclofilina A pode ainda induzir a expressão da MMP-9, bem como activar cada uma das três cascatas MAPK. Os níveis de expressão da ciclofilina A encontram-se aumentados em diversos tipos de cancro ^(170,248,249,250,251,252,253,254,255).

3.6. A caveolina-1 como inibidor da acção do CD147

A caveolina-1 é o principal componente estrutural da caveolae e está envolvida em inúmeras funções incluindo a endocitose, o tráfego de vesículas, homeostase de colesterol e transdução de sinal ⁽³⁸⁾. Esta associa-se ao domínio citoplasmático do CD147 com baixo grau de glicosilação e inibe a formação da forma altamente glicosilada do CD147, ocorrendo um enovelamento da superfície celular do CD147, inibindo a indução de MMPs ^(154,156,222). A caveolina -1 é, assim, um regulador negativo da glicosilação do CD147, da sua homo-oligomerização e da actividade das MMPs e tem a capacidade de diminuir a expressão de CD147 ^(25,256,257,258). O gene da caveolina-1 é considerado um gene supressor tumoral devido ao seu efeito inibitório na glicosilação do CD147 ^(154,258). Este gene está frequentemente ausente ou mutado em várias neoplasias epiteliais, incluindo carcinoma espinocelular da cavidade oral ^(259,260). Por outro lado, a sua expressão proteica é reduzida no cancro do ovário ⁽²⁶¹⁾, cancro da mama ⁽²⁶²⁾ e cancro do pulmão ⁽²⁶³⁾.

Surpreendentemente, a expressão de caveolina-1 é superior no cancro da bexiga ⁽²⁶⁴⁾, próstata ⁽²⁶⁵⁾ e carcinoma espinocelular do esófago ⁽²⁶⁶⁾. Pacientes com carcinoma da nasofaringe e com sobreexpressão quer de caveolina-1 quer de CD147 nas células tumorais, têm um prognóstico significativamente pior e uma taxa de sobrevivência global aos 5 anos, muito menor do que os pacientes apenas com sobreexpressão de caveolina-1 ou CD147 ⁽²⁶⁷⁾. Estes últimos dados entram em contradição com os primeiros que foram apresentados. Por isso, podemos concluir que o papel da caveolina-1 na carcinogénese é ainda contraditório e está longe de ser compreendido ⁽²⁶⁷⁾.

3.7. Expressão do CD147 em diferentes tecidos

Os níveis de expressão de CD147 estão aumentados em lesões pré-malignas relativamente ao tecido normal ⁽²⁹⁾, em tumores primários relativamente a lesões pré-malignas ^(29,25), em tumores invasivos relativamente a tumores não invasivos ^(44,45), em lesões metastáticas relativamente a tumores primários ⁽³⁴⁾ e também em tumores malignos relativamente a tumores benignos ^(44,66,268,269,270). Assim, quanto mais agressivo for o tumor, maior serão os níveis de CD147 ^(38,39,272,273,274,275,276,277,278). O CD147 foi identificado como sendo a proteína mais frequentemente expressa em tumores primários e células de micrometástases, sugerindo um papel importante desta na progressão tumoral e metástase inicial ⁽¹⁶³⁾. Um aumento de expressão do CD147 tem sido detectado no carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço, um dos carcinomas com maiores níveis de expressão de CD147 ⁽²⁴⁴⁾, nomeadamente no carcinoma espinocelular da cavidade oral ^(32,182), no carcinoma espinocelular esofágico ^(32,210) e no carcinoma da orofaringe ⁽¹⁶⁰⁾. Valores elevados de expressão de CD147 têm também sido verificados no carcinoma seroso do ovário ⁽²¹⁵⁾, carcinoma gástrico ⁽²⁷⁸⁾, carcinoma da mama ^(182,275,279,280), adenocarcinoma medular da mama ^(27,276,281), carcinoma pancreático ^(27,276,281), carcinoma renal ^(27,182,276,281), hepatoma ^(27,269,276,281), glioblastoma ^(27,276,281), glioma ^(182,282), linfoma ^(182,281), melanoma ^(182,172), carcinoma do pulmão ^(45,156,182) e carcinoma da bexiga ^(182,270).

3.8. CD147 como factor de resistência a drogas

As células tumorais resistentes a múltiplas drogas expressam altos níveis de CD147. Esta elevada expressão de CD147 provoca um aumento de expressão de MDR1, MMP-2, MMP-9 e promove um fenótipo invasor às células tumorais, conferindo resistência a drogas tais como a adriamicina, vincristina e paclitaxel. Por outro lado, o silenciamento do CD147 nas células resistentes a várias drogas diminui a expressão de MDR1 e MMPs e aumenta a quimiossensibilidade das células, para drogas cujo substrato se baseie em P-gp. O silenciamento de CD147 normaliza, ainda, a sensibilidade de linhas celulares de carcinoma espinocelular da cavidade oral e da mama à vincristina, taxol e 5-fluorouracilo e a todos os ácidos trans-retinóicos ⁽¹⁷⁰⁾. Deste modo, conclui-se que, a perda de CD147 sensibiliza as células aos ROS e consequentemente pode aumentar a eficácia da resposta dos pacientes à quimioterapia e radioterapia ⁽⁴⁰⁾.

3.9. CD147 como factor de prognóstico em diferentes neoplasias

Níveis elevados de expressão de CD147 correlacionam-se com o grau do tumor, estado clínico, presença de tumor residual, insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, resistência à terapia, invasividade e potencial metastático ganglionar e à distância e, portanto, com um mau prognóstico ^(32,41,42,43,44,45), designadamente nos cancros da bexiga ⁽²⁸³⁾, ovário e colo do útero ⁽¹⁵³⁾. O CD147 apresenta também uma associação positiva com estádios TNM mais elevados ⁽²³⁶⁾. Assim, a expressão do CD147 pode ser um marcador útil para seleccionar pacientes com alto risco e pior prognóstico clínico, propondo uma terapia mais adequada para estes ^(42,46).

3.10. Conclusões obtidas por silenciamento do CD147 (técnica siRNA)

O silenciamento do CD147, utilizando uma técnica de siRNA pode inibir a expressão e a função de MCT1 e MCT4, resultando na redução da taxa de glicólise e da produção de ATP e aumentando o pH extracelular. Subsequentemente, a proliferação, invasão celular e produção de VEGF são significativamente inibidas ^(41,284,187).

Um estudo realizado em murganhos, com silenciamento do CD147, concluiu que estes animais apresentavam um défice de visão ⁽¹⁵¹⁾. Nestes, a expressão de MCT1 e MCT4 na membrana celular das células de Müller, bem como nas células retiniais fotoreceptoras adjacentes às primeiras, encontra-se diminuída. Assim, o fluxo de lactato nestas células encontra-se comprometido. A perda de visão nos murganhos com silenciamento do CD147 pode ser atribuída à reduzida expressão de MCT na membrana celular das referidas células ⁽¹⁸⁷⁾. O silenciamento do CD147 aumenta os danos oxidativos induzidos por H₂O₂, por aumentar os ROS celulares e destruir as defesas antioxidantes intrínsecas das células ⁽⁴⁰⁾, diminui a viabilidade das células tumorais da mama e promove a sensibilidade celular à anoikis ⁽²⁸⁵⁾. O silenciamento do CD147 reduz, também, a produção de MMPs e inibe a activação de TGFβ, podendo funcionar como uma nova terapia em algumas doenças como a miopatia inflamatória ou distrofias congénitas ⁽²⁸⁶⁾.

Apesar de o CD147 ser expresso na superfície tumoral fazendo com que seja um novo alvo para terapias com anticorpos monoclonais ⁽²⁸⁴⁾, mais estudos são necessários neste campo pois, estudos anteriores ⁽²⁷⁶⁾, concluíram que não só as células epiteliais mas também as células germinativas, miócitos do ventrículo esquerdo do coração e células do endotélio vascular do cérebro, são positivas para o CD147, sugerindo que uma terapia sistémica anti-CD147 pode causar severos efeitos secundários. Adicionalmente, vários processos fisiológicos, tal como a proliferação e diferenciação de células epiteliais

^(287,288), fertilização ⁽²⁸⁹⁾, processos de transporte selectivo em células endoteliais para manter a função de barreira hematoencefálica ⁽²⁹⁰⁾, maturação de eritrócitos ⁽²⁹¹⁾, ou cicatrização de feridas ⁽¹⁶⁰⁾, podem ser também influenciados por uma terapia anti-CD147. Por todas estas razões, é necessário encontrar medidas eficazes de bloquear a expressão de CD147 mas de uma forma selectiva.

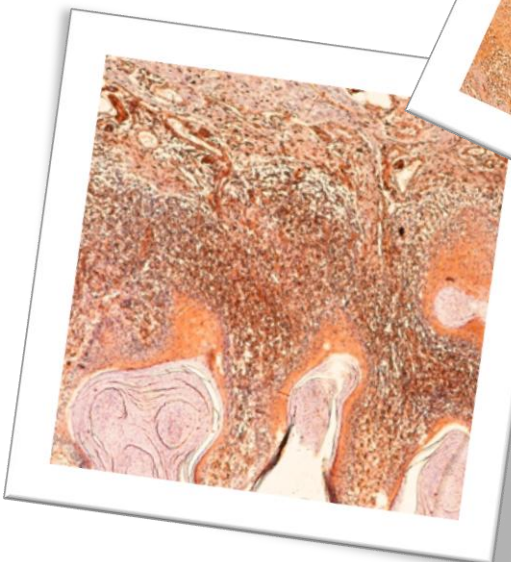
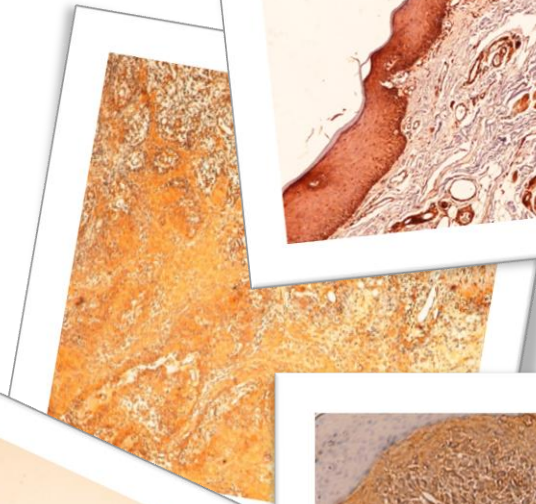
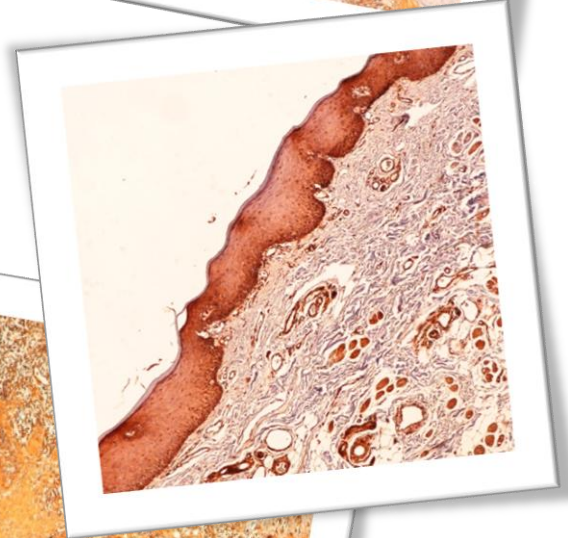
3.11. CD147 e a doença de Alzheimer e aterosclerose

Além da já referida função do CD147 no desenvolvimento da capacidade visual, esta proteína está envolvida em outras doenças, tais como o Alzheimer e a aterosclerose. A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela progressiva perda cognitiva. A produção de péptidos β amilóides leva à formação de placas e depósitos neurofibrilares nas regiões neurocorticais e subcorticais do cérebro que resultam nesta patologia. O complexo γ secretase regula a produção de péptidos β amilóides ⁽²⁹²⁾. O CD147 funciona como um componente regulador do complexo γ secretase ⁽¹⁷⁵⁾. A perda de CD147 do complexo γ secretase em linhas celulares resulta num aumento da produção de placas β amilóides mas não tem efeito nos níveis de expressão de outros componentes do complexo ⁽²⁶⁾.

O CD147 é, por outro lado, expresso em ateromas humanos e está sobrerregulado mediante a diferenciação de monócitos e macrófagos, um evento importante na progressão da aterosclerose ⁽¹⁷¹⁾. A angiotensina- α tem um papel fundamental na ruptura final de placas de aterosclerose, já que induz a expressão de CD147, através da cascata NF- κ B, a qual afecta também a actividade das MMPs ⁽²⁹³⁾.

Por tudo o que foi anteriormente dito, conclui-se que é de suma importância a realização de estudos que visem compreender o mecanismo de acção do CD147 e os seus efeitos biológicos e patológicos, como forma de alterar os seus níveis de expressão, podendo encontrar-se terapias que ajudem doentes com diversas patologias, nomeadamente doentes oncológicos, na cura ou melhoramento do seu estado clínico.

OBJECTIVOS



1. OBJECTIVOS

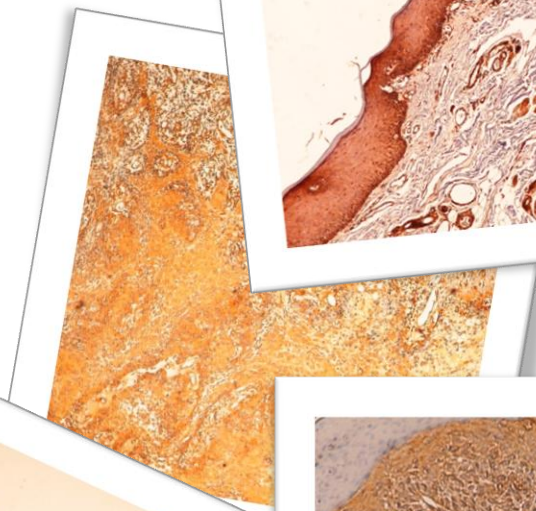
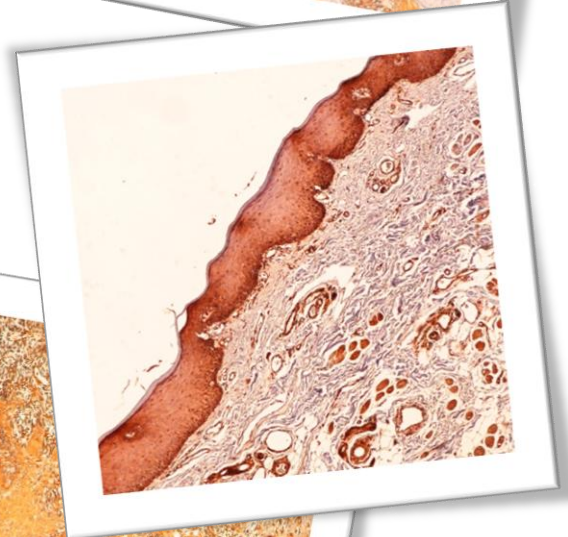
1.1. Objectivo geral

O presente trabalho teve por objectivo geral estudar os factores de prognóstico em carcinoma espinocelular do lábio.

1.2. Objectivos específicos

Mais especificamente, pretendeu-se avaliar as variáveis clínico-patológicas (idade, género, estágio, localização do tumor primário, estágio do mesmo e disseminação tumoral) como factores de prognóstico no carcinoma do lábio, assim como o significado da imunoexpressão de RKIP e de CD147 no prognóstico de doentes com carcinoma do lábio e compreender a relação entre a expressão de RKIP e a expressão de CD147 em doentes com cancro do lábio.

MATERIAL E MÉTODOS



1. POPULAÇÃO E VARIÁVEIS DE ESTUDO

Este estudo englobou 107 doentes com carcinoma espinocelular do lábio, admitidos no Instituto Português de Oncologia do Porto – Francisco Gentil (IPOPFE-EPE), de Janeiro de 2003 a Março de 2006 e tratados com intenção curativa.

As neoplasias foram seleccionadas a partir do Arquivo Clínico e do Departamento de Anatomia Patológica do IPOPFE-EPE com base na disponibilidade de blocos de tecidos incluídos em parafina e na existência de dados de *follow-up* adequados. Cortes (corados pela coloração de hematoxilina-eosina) de todos os tumores foram revistos e classificados pelo mesmo patologista especialista em neoplasias da cabeça e pescoço.

Com o intuito de determinar a expressão das proteínas RKIP e CD147 nos tumores, estudou-se a imunorreactividade destes. Estudaram-se as variáveis clínico-patológicas do tumor, a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global.

No entanto, das 107 amostras iniciais, 13 casos foram excluídos devido a marcação imuno-histoquímica equívoca ou ausência de tumor nos cortes disponíveis.

Da série estudada (n=94) em 28 casos não foi possível avaliar, por motivos técnicos, a imunoexpressão de CD147. Assim, 94 casos foram estudados em relação à imunoexpressão de RKIP e 66 casos em relação à imunoexpressão de CD147. De salientar que em todos os casos em que a imunoexpressão de CD147 foi avaliada também se avaliou a imunoexpressão de RKIP.

1.1. RKIP

Avaliou-se a imunoexpressão de RKIP em 94 espécimes de carcinoma espinocelular do lábio. A maioria dos tumores apresentava-se em estágio I (75,5%) e localizava-se no lábio inferior (90,4%). A idade mediana da amostra era 72 anos (Tabela 1).

Tabela 1: Características clínico-patológicas da amostra estudada com anticorpo anti-RKIP (n=94)

Idade, anos	
Mediana [min-máx]	72 [22-91]
Gênero, n (%)	
Masculino	67 (71,3%)
Feminino	27 (28,7%)
Localização	
Lábio superior	6 (6,4%)
Lábio inferior	85 (90,4%)
Comissura	3 (3,2%)
Estadio *, n (%)	
I	71 (75,5%)
II	19 (20,2%)
III	4 (4,3%)
Disseminação, n (%)	
Sem	90 (95,7%)
Perineural	3 (3,2%)
Ganglionar	1 (1,1%)

Classificação realizada segundo a proposta de 2002 do AJCC (American Join Committee on Cancer) ⁽²⁹⁴⁾.

1.2. CD147

A expressão de CD147 foi avaliada em 66 espécimes de carcinoma espinocelular do lábio. A maioria dos tumores apresentava-se em estágio I (75,8%) e localizava-se no lábio inferior (92,4%). A idade mediana da amostra era 72 anos (Tabela 2).

Tabela 2: Características clínico-patológicas da amostra estudada com anticorpo anti-CD147 (n=66)

Idade, anos	
Mediana [min-máx]	72 [22-91]
Género, n (%)	
Masculino	48 (72,7%)
Feminino	18 (27,3%)
Localização	
Lábio superior	4 (6,1%)
Lábio inferior	61 (92,4%)
Comissura	1 (1,5%)
Estadio *, n (%)	
I	50 (75,8%)
II	15 (22,7%)
III	1 (1,5%)
Disseminação, n (%)	
Sem	65 (98,5%)
Ganglionar	1 (1,5%)

Classificação realizada segundo a proposta de 2002 do AJCC (American Join Committee on Cancer) ⁽²⁹⁴⁾.

2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RKIP E CD147

2.1. Protocolos de imunohistoquímica

2.1.1 RKIP

Dos blocos com tecidos parafinados foram obtidos cortes com 4 µm de espessura que se fizeram aderir a lâminas de vidro. Posteriormente, esses tecidos foram desparafinados em xilol e rehidratados em concentrações decrescentes de etanol até à água. Seguidamente, realizou-se a recuperação antigénica pelo método do calor: tampão citrato com pH 6 foi previamente aquecido a 98°C tendo as lâminas sido mergulhadas nesse tampão mantendo a temperatura referida constante durante 20 minutos. Findado esse período de tempo, as lâminas foram retiradas dessa solução e arrefecidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente executada uma lavagem em PBS 1x. O passo seguinte consistiu no bloqueio da peróxidase endógena recorrendo a uma solução de H₂O₂ 0,3% em metanol que reagiu com o tecido das lâminas por um período de 10 minutos a uma temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em PBS 1x. Seguidamente, o tecido foi bloqueado durante 10 minutos, recorrendo a uma solução de UV Block (kit streptavidina peroxidase). Posteriormente, o anticorpo monoclonal primário anti-RKIP foi diluído em BSA 5% numa concentração de 1:400. Todas os tecidos foram recobertos com esta solução, exceptuando os controlos negativos que, apenas foram postos em contacto com BSA 5%. O anticorpo primário actuou durante 2 horas, tendo sido então realizada nova lavagem com PBS 1x. Depois, os tecidos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit streptavidina peroxidase) durante 10 minutos sendo, seguidamente, lavados com PBS 1x. Foi feita então a adição do complexo streptavidina peroxidase (kit streptavidina peroxidase) durante 10 minutos e realizada nova lavagem com PBS 1x. No passo seguinte, os tecidos foram incubados com o substrato cromogénico DAB, durante 10 minutos. As lâminas foram posteriormente lavadas com água corrente. O passo seguinte, consistiu no contraste com hematoxilina de Harris durante 2 a 3 minutos e, depois de lavar novamente as lâminas em água corrente durante cerca de 10 minutos, estas foram desidratadas numa concentração crescente de etanol e os cortes fixados em xilol. Por fim montaram-se as lâminas, do seguinte modo: um pouco de entellan foi usado para fazer aderir a lamela à lâmina que continha o tecido. Depois de secar durante um dia, observaram-se os cortes ao microscópio óptico.

2.1.2. CD147

Dos blocos com tecidos parafinados foram obtidos cortes com 4 µm de espessura que se fizeram aderir a lâminas de vidro. Posteriormente, esses tecidos foram desparafinados em xilol e rehidratados em concentrações decrescentes de etanol até à água. Seguidamente, realizou-se a recuperação antigénica pelo método do calor: tampão citrato com pH 6 foi previamente aquecido durante 1 minuto à potência máxima no microondas tendo as lâminas sido mergulhadas nesse tampão e aquecidas durante 1 minuto na potência máxima do microondas, verificando se o tampão citrato atingia o ponto de ebulição. Posteriormente, a potência do microondas foi diminuída até à potência média e durante 15 minutos as lâminas contactaram com o tampão citrato. Findado esse período de tempo, as lâminas foram retiradas dessa solução e arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo posteriormente executada uma lavagem em PBS 1x. O passo seguinte consistiu no bloqueio da peróxidase endógena recorrendo a uma solução de H₂O₂ 0,3% em metanol que reagiu com o tecido das lâminas por um período de 10 minutos a uma temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em PBS 1x. Seguidamente, o tecido foi bloqueado durante 10 minutos, recorrendo a uma solução de UV Block (kit streptavidina peroxidase). Posteriormente, o anticorpo monoclonal primário anti-CD147 foi diluído em BSA 5% numa concentração de 1:70. Todas os tecidos foram recobertos com esta solução, exceptuando os controlos negativos que, apenas foram postos em contacto com BSA 5%. O anticorpo primário incubou overnight, tendo sido então realizada nova lavagem com PBS 1x. Depois, os tecidos foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado (kit streptavidina peroxidase) durante 10 minutos, sendo, seguidamente, lavados com PBS 1x. Foi feita então a adição do complexo streptavidina peroxidase (kit streptavidina peroxidase) durante 10 minutos e realizada nova lavagem com PBS 1x. No passo seguinte, os tecidos foram incubados com o substrato cromogénico, DAB, durante 10 minutos. As lâminas foram posteriormente lavadas com água corrente. O passo seguinte, consistiu no contraste com hematoxilina de Harris durante 2 a 3 minutos e, depois de lavar novamente as lâminas em água corrente, estas foram desidratadas numa concentração crescente de etanol e os cortes fixados em xilol. Por fim montaram-se as lâminas, do seguinte modo: um pouco de entellan foi usado para fazer aderir a lamela à lâmina que continha o tecido. Depois de secar durante um dia, observou-se os cortes ao microscópio óptico.

2.2. Quantificação e avaliação da imunoreactividade das proteínas

2.2.1. RKIP

Os resultados foram avaliados independentemente por dois patologistas que não tinham conhecimento prévio das características clínico-patológicas dos pacientes. Foi avaliada a expressão de RKIP no tecido normal, no tecido tumoral e na frente de invasão. Nos três locais a expressão de RKIP foi classificada em três níveis: ausência de expressão da proteína em mais de 90% das células; expressão positiva da proteína em mais de 90% das células; expressão heterogénea de RKIP. Por expressão heterogénea entendem-se todos os casos em que se verifica a presença de células marcadas e não marcadas em percentagens bastante idênticas no mesmo local histológico.

2.2.2. CD147

Os resultados da imunohistoquímica foram avaliados independentemente por dois patologistas que não tinham conhecimento prévio das características clínico-patológicas dos pacientes. Foi feita uma estimativa semi-quantitativa como descrito em ^(236,267). Foi usado um score obtido pela multiplicação dos valores da intensidade da coloração e a abundância relativa de células CD147 positivas. A intensidade foi avaliada de 0 a 3, sendo 0 (negativa), 1 (fracamente positiva), 2 (moderadamente positiva) e 3 (fortemente positiva). A abundância de células positivas foi classificada de 0 a 4 (0, < 5% de células positivas; 1, 5-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%). O score total maior ou igual ao valor médio (≥ 6) foi considerado como expressão positiva de CD147 e o score total menor que o valor médio (< 6) foi considerado ausência de expressão.

2.3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados em tabelas de frequência. A análise univariada foi efectuada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou pelo teste exacto de Fisher, quando apropriado. 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 Log-Rank ou pelo teste de Breslow, quando apropriado.

Para a análise estatística utilizou-se o programa específico *SPSS 17.0®* (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos (variável informativa) quando $p < 0,05$.

3. DEFINIÇÕES

Disseminação tumoral: Ocorrência de metastização. Presença de metástases perineurais, ganglionares ou à distância.

Frente de invasão: Local histológico onde o tumor deixa de estar encapsulado (circunscrito) e começa a invadir tecidos vizinhos.

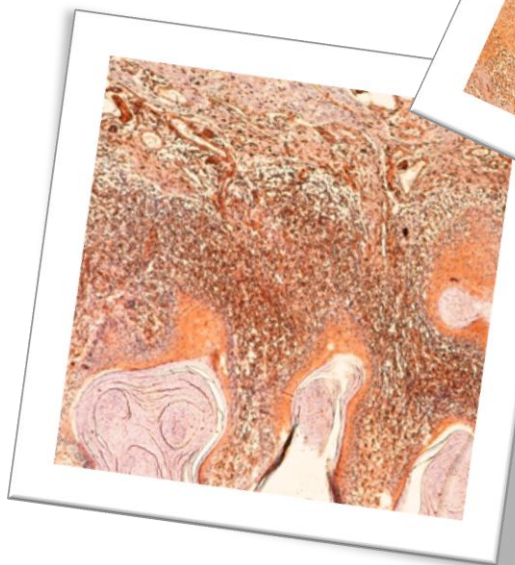
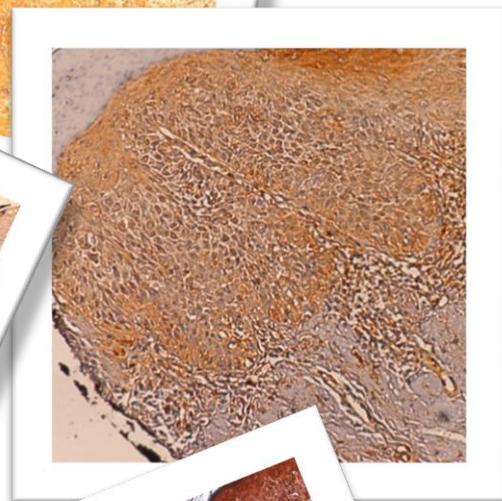
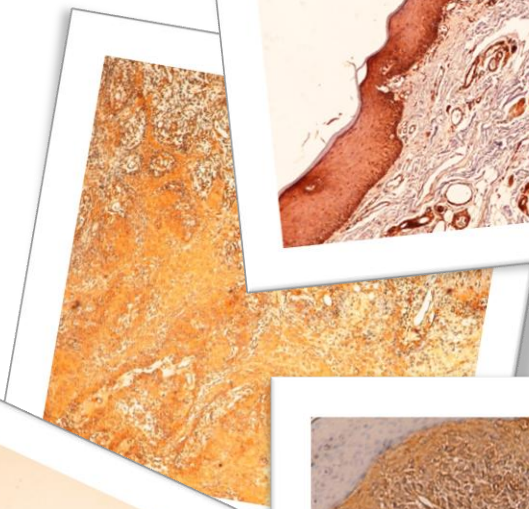
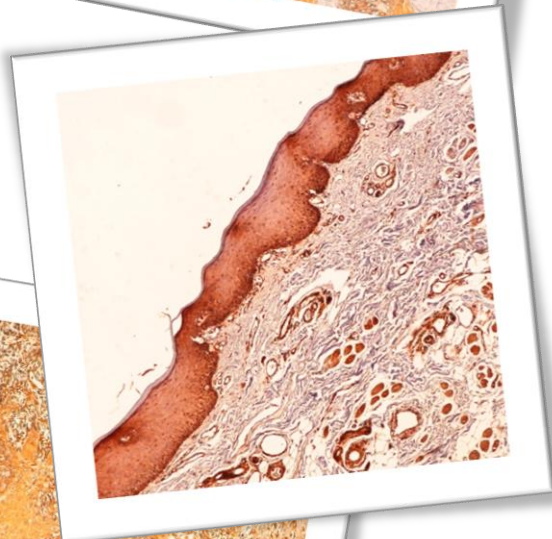
Mucosa normal: Local histológico que não se encontra em contiguidade com o tumor e sem evidências histopatológicas de neoplasia ou hiperplasia.

Permeação perineural pelo tumor: Envolvimento dos nervos pelas células neoplásicas.

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

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

RESULTADOS



1. RKIP

1.1. Significado prognóstico das variáveis clínico-patológicas

A análise da sobrevivência livre de doença em função das características clínico-patológicas da amostra estudada identificou a idade dos pacientes, o estágio da doença e a localização do tumor primário como sendo variáveis informativas na determinação do risco de recidiva ($p=0,04$, $p=0,001$ e $p=0,001$ respectivamente). A análise da sobrevivência global revelou que apenas a localização do tumor primário se associou significativamente com o prognóstico ($p=0,001$). A sobrevivência global dos pacientes diminui com o aumento estágio da doença, contudo, esta diferença não foi significativa ($p=0,07$).

Os doentes com tumores da comissura labial, ou estágio III, ou com idades inferiores ou iguais a 72 anos têm maior probabilidade de recidivarem (Tabela 3).

Tabela 3: Sobrevivência livre de doença e sobrevivência global, aos 3 anos, de 94 doentes com carcinoma do lábio posteriormente analisados com anticorpo anti-RKIP, em função das características clínico-patológicas da amostra. A sombreado encontram-se os valores com significado estatístico ($p<0,05$).

	n	Sobrevivência global aos 3 anos	p*	Sobrevivência livre de doença aos 3 anos	p*
Idade, n (%)					
≤ 72 anos	49	85,4%	0,80	68,2%	0,04
> 72 anos	45	89,8%		93,1%	
Gênero, n (%)					
Masculino	67	84,5%	0,42	79,0%	0,38
Feminino	27	96,2%		80,1%	
Localização, n (%)					
Lábio superior	6	50,0%		66,7%	
Lábio inferior	85	92,3%	0,001	83,2%	0,001
Comissura	3	0,0%		0,0%	
Estadio, n (%)					
I	71	90,6%		85,6%	
II	19	81,0%	0,07	69,7%	0,001
III	4	50,0%		0,0%	
Disseminação, n (%)					
Sem	90	87,5%		79,6%	
Perineural	3	100%	1,00	100%	0,94
Ganglionar	1	100%		100%	

*Teste de Log-Rank ou Teste de Breslow

1.2. Expressão da proteína RKIP

Em todos os casos analisados, verificou-se expressão citoplasmática de RKIP que ocorre em todo o epitélio e com especial intensidade na camada basal (Figura 6). Na totalidade dos casos, também no estroma se observou expressão de RKIP, contudo esta expressão é menos intensa do que no epitélio exceptuando os nervos, ácinos e ductos (Figura 7). No tecido hiperplásico, verificou-se a existência tanto de casos com expressão de RKIP (Figura 9) como casos onde a expressão da proteína é negativa (Figura 8). O tecido tumoral, por sua vez, apresentou diferentes tipos de marcação. Existem amostras sem expressão da proteína (Figuras 10), outras em que existe um equilíbrio entre o número de células com expressão e sem expressão de RKIP – expressão heterogênea de RKIP (Figura 13) – e ainda amostras em que as células tumorais estão completamente coradas (Figuras 11 e 12). No entanto, apesar de neste último caso, o tecido tumoral expressar a proteína, o RKIP é expresso a diferentes níveis. Assim, existem amostras com uma marcação intensa (Figura 12) enquanto outras apresentam uma marcação mais tênue (Figura 11). Na frente de invasão (início de metastização) acontece o mesmo que no tumor (Figuras 14, 15 e 16). Nos 3 casos em que existia invasão perineural observou-se uma ausência de expressão de RKIP ou uma expressão heterogênea da proteína (Figuras 17 e 18).

Tecido Normal

Epitélio

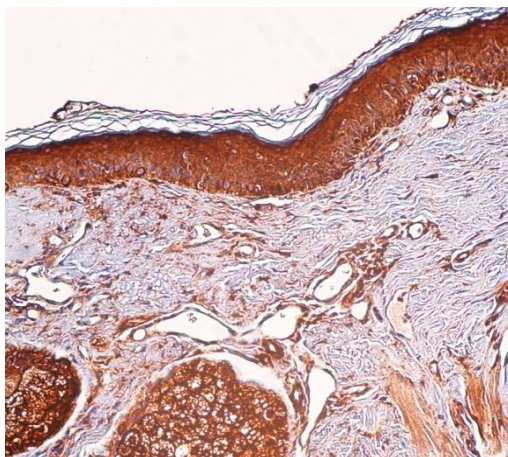


Figura 6: Expressão positiva de RKIP no epitélio (100x).

Estroma

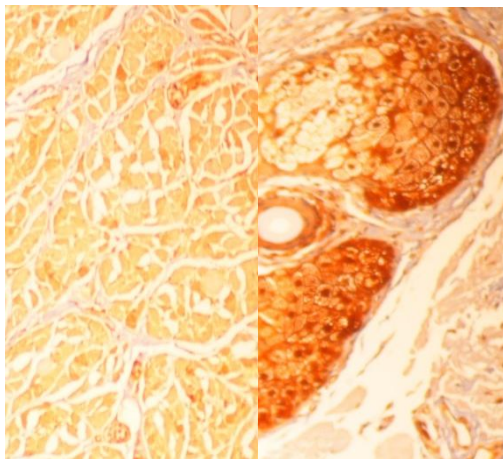


Figura 7: Expressão positiva de RKIP no estroma (100x).

Hiperplasia

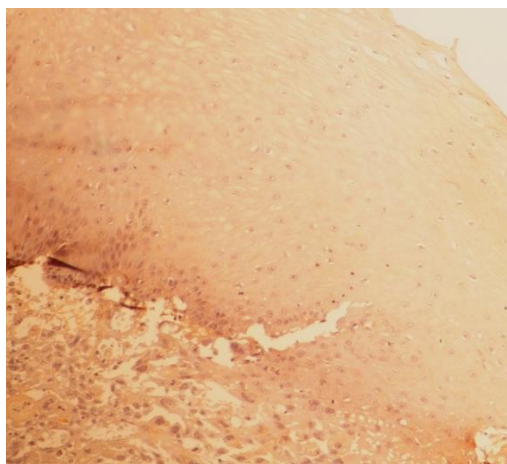


Figura 8: Ausência de expressão de RKIP no tecido hiperplásico (100x).



Figura 9: Expressão positiva de RKIP no tecido hiperplásico (100x).

Tumor primário

Tecido Tumoral

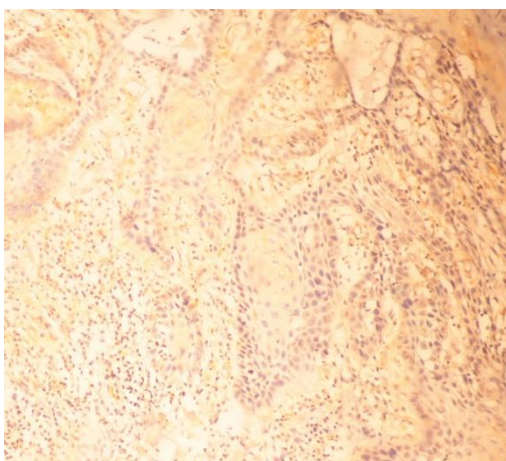


Figura 10: Ausência de expressão de RKIP no tumor primário (100x).

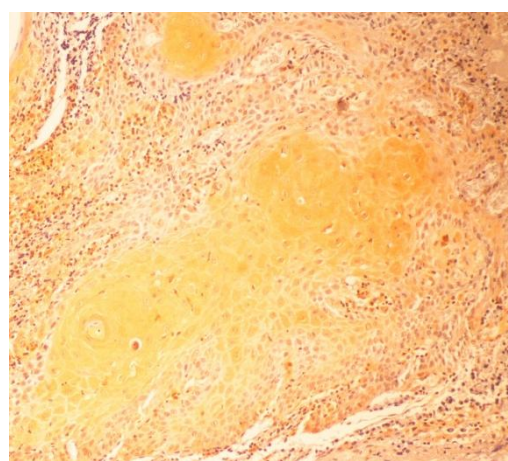


Figura 11: Expressão positiva de RKIP no tumor primário – baixos níveis de expressão (100x).



Figura 12: Expressão positiva de RKIP no tumor primário - altos níveis de expressão (100x).

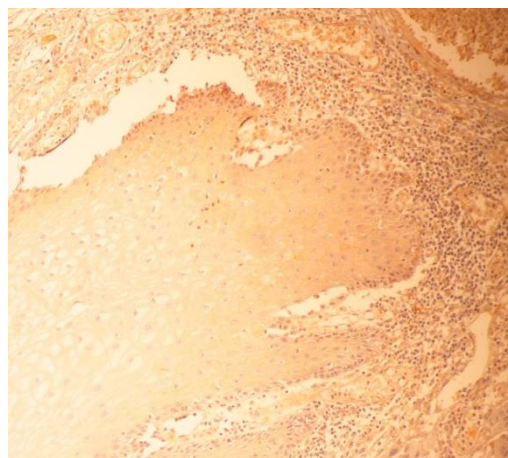


Figura 13: Expressão heterogênea de RKIP no tumor primário (100x).

Frente de invasão

Tecido Tumoral

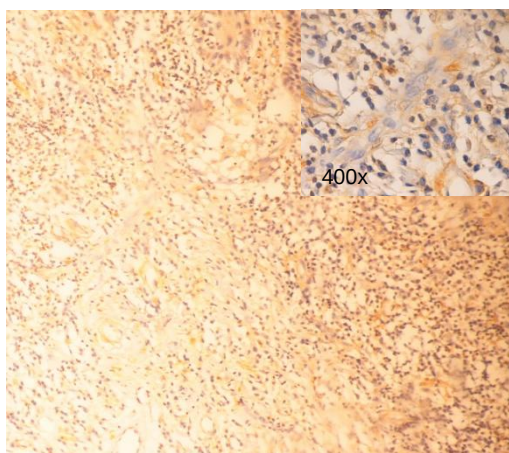


Figura 14: Ausência de expressão de RKIP na frente de invasão (100x).

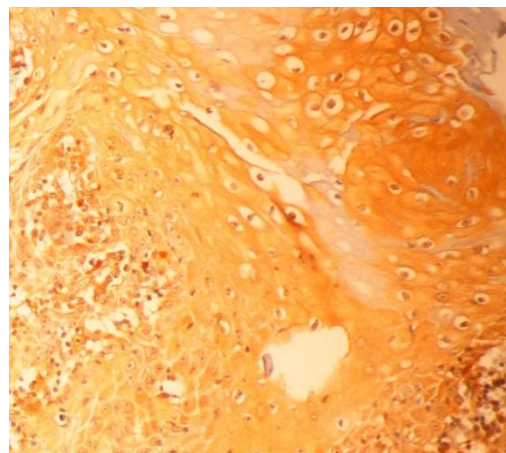


Figura 15: Expressão positiva de RKIP na frente de invasão (100x).

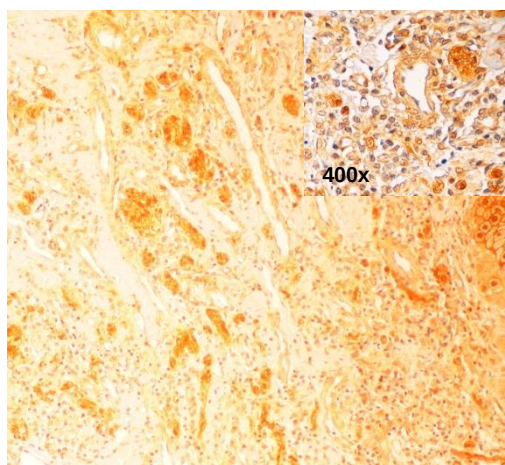


Figura 16: Expressão heterogênea de RKIP na frente de invasão (100x).

Invasão perineural

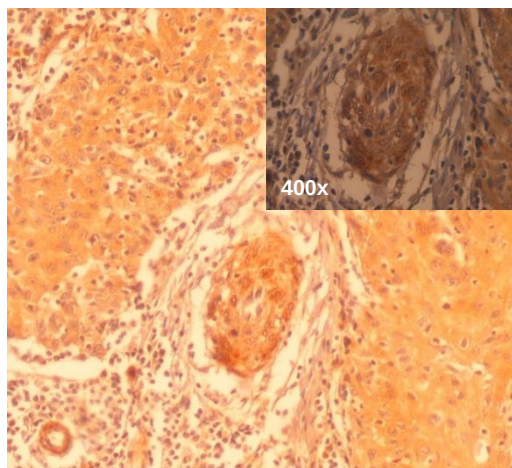


Figura 17: Ausência de expressão de RKIP na invasão perineural (100x).

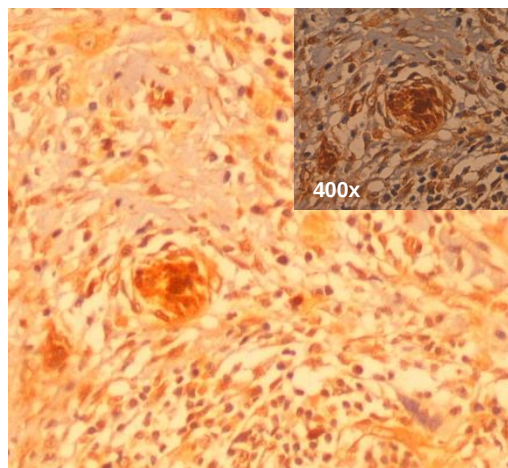


Figura 18: Expressão heterogênea de RKIP na invasão perineural (100x).

1.2.1. Correlação entre a expressão da proteína e as variáveis clínico-patológicas

Foi avaliada a expressão de RKIP em todos os tumores. Dos 94 tumores analisados, em 30 observou-se uma ausência de expressão da proteína, em 10 casos uma expressão heterogênea e nos restante 54 uma expressão positiva.

O estágio mostrou-se uma variável estatisticamente significativa ($p=0,02$). Não foi verificada qualquer outra associação entre a expressão da proteína e as características clínico-patológicas da amostra.

Tabela 4: Relação entre a expressão de RKIP no tecido tumoral e as características clínico-patológicas da amostra. A sombreado encontram-se os valores com significado estatístico ($p<0,05$).

	Ausência de expressão do RKIP no tumor	Expressão heterogênea de RKIP no tumor	Expressão positiva do RKIP no tumor	Total	p*
Idade, n (%)					
≤ 72 anos	4 (40,0%)	17 (56,7%)	28 (51,9%)	49 (52,1%)	0,05
> 72 anos	6 (60,0%)	13 (43,3%)	26 (48,1%)	45 (47,9%)	
Gênero, n (%)					
Masculino	7 (70,0%)	22 (73,3%)	38 (70,4%)	67 (71,3%)	0,96
Feminino	3 (30,0%)	8 (26,7%)	16 (29,6%)	27 (28,7%)	
Localização, n (%)					
Lábio superior	1 (10,0%)	1 (3,3%)	4 (7,4%)	6 (6,4%)	0,65
Lábio inferior	9 (90,0%)	27 (90,0%)	49 (90,7%)	85 (90,4%)	
Comissura	0 (0,0%)	2 (6,7%)	1 (1,9%)	3 (3,2%)	
Estádio, n (%)					
I	7 (70,0%)	29 (96,7%)	35 (64,8%)	71 (75,5%)	0,02
II	3 (30,0%)	1 (3,3%)	15 (27,8%)	19 (20,2%)	
III	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (7,4%)	4 (4,3%)	
Disseminação, n (%)					
Sem	9 (90,0%)	29 (96,7%)	52 (96,2%)	90 (95,7%)	0,64
Perineural	1 (10,0%)	1 (3,3%)	1 (1,9%)	3 (3,2%)	
Ganglionar	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,9%)	1 (1,1%)	

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) ou Teste exacto de Fisher

Pode verificar-se que a ausência de proteína se observa essencialmente no estágio I (Figura 19).

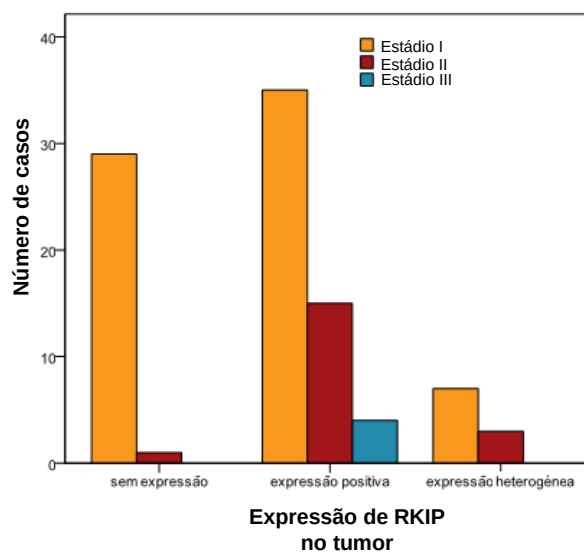


Figura 19: Expressão de RKIP no tumor dependendo do estágio.

Foi avaliada a expressão de RKIP na frente de invasão de todos os tumores. Dos 94 casos analisados, em 36 observou-se a ausência de expressão da proteína, em 35 uma expressão heterogénea e em 23 a expressão positiva e de RKIP na frente de invasão.

O estágio mostrou-se uma variável estatisticamente significativa ($p=0,01$) ao contrário das restantes características clínico-patológicas da amostra ($p \geq 0,05$).

Tabela 5: Relação entre a expressão de RKIP na frente de invasão e as características clínico-patológicas da amostra. A sombreado encontra-se o valor com significado estatístico ($p < 0,05$).

	Ausência de expressão do RKIP na frente de invasão	Expressão heterogénea de RKIP na frente de invasão	Expressão positiva do RKIP na frente de invasão	Total	P*
Idade , n (%)					
≤ 72 anos	20 (55,6%)	10 (43,5%)	20 (57,1%)	50 (53,2%)	0,67
> 72 anos	16 (44,4%)	13 (56,5%)	15 (42,9%)	44 (46,8%)	
Gênero, n (%)					
Masculino	26 (72,2%)	15 (65,2%)	26 (74,3%)	67 (71,3%)	0,75
Feminino	10 (27,8%)	8 (34,8%)	9 (25,7%)	27 (28,7%)	
Localização, n (%)					
Lábio superior	2 (5,6%)	2 (8,7%)	2 (5,7%)	6 (%)	0,79
Lábio inferior	33 (91,7%)	21 (91,3%)	31 (88,6%)	85 (90,4%)	
Comissura	1 (2,8%)	0 (0,0%)	2 (5,7%)	3 (3,2%)	
Estadio, n (%)					
I	23 (63,9%)	16 (69,6%)	32 (91,4%)	71 (75,5%)	0,01
II	12 (33,3%)	4 (17,4%)	3 (8,6%)	19 (20,2%)	
III	1 (2,8%)	3 (13,0%)	0 (0,0%)	4 (4,3%)	
Disseminação, n (%)					
Sem	35 (97,2%)	21 (91,3%)	34 (97,1%)	90 (95,7%)	0,51
Perineural	1 (2,8%)	1 (4,3%)	1 (2,9%)	3 (3,2%)	
Ganglionar	0 (0,0%)	1 (4,3%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) ou Teste exacto de Fisher

Pode verificar-se que no estágio I predominam casos com ausência de expressão de RKIP, no estágio II verifica-se a presença sobretudo de expressão heterógena da proteína e no estágio III é mais comum a expressão positiva de RKIP. Contudo, o número de casos em estágio III é bastante diminuto (Figura 20).

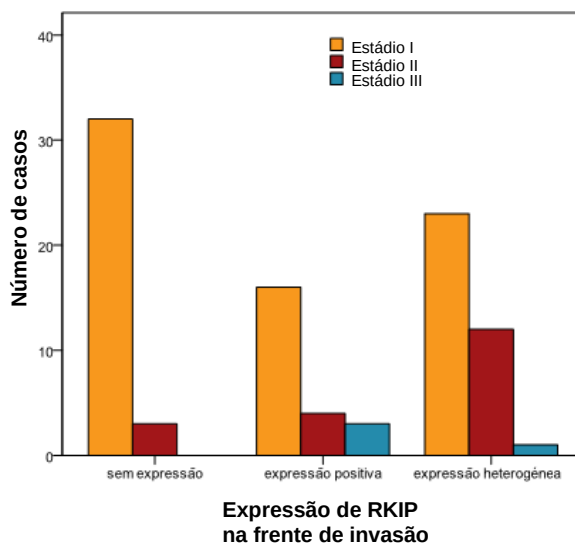


Figura 20: Expressão de RKIP na frente de invasão dependendo do estágio.

Quando se comparou o padrão de expressão do RKIP no tumor com o padrão de expressão na frente de invasão (Tabela 6 e Figura 21) verificou-se que a expressão na frente de invasão é geralmente coincidente com a expressão no tumor ($p=0,001$).

Tabela 6: Relação entre a expressão de RKIP no tumor e na frente de invasão. A sombreado encontra-se o valor com significado estatístico ($p<0,05$).

		Frente de invasão			Total	p*
		Sem expressão de RKIP	Expressão heterogénea de RKIP	Expressão positiva de RKIP		
Tumor	Sem expressão de RKIP	29	1	0	30	0,001
	Expressão heterogénea de RKIP	3	7	0	10	
	Expressão positiva de RKIP	3	28	23	54	
	Total	35	36	23	94	

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) ou Teste exacto de Fisher

Nos casos em que tal não acontece, verificou-se que o número de casos com expressão negativa, mas sobretudo heterogénea, tende a aumentar na frente de invasão. Assim, há uma perda de expressão da proteína na frente de invasão quando a comparada com o tecido tumoral.

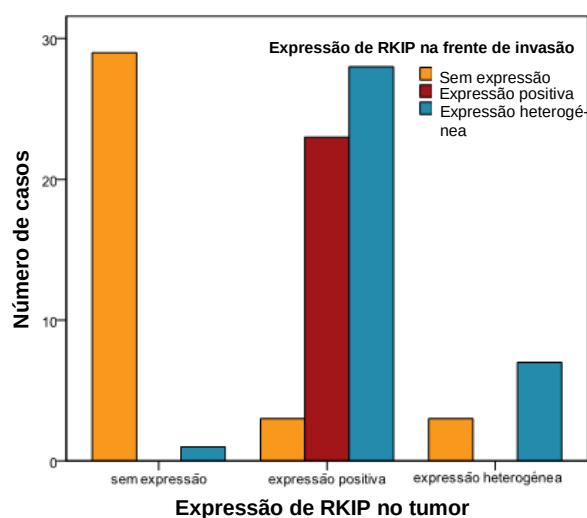


Figura 21: Relação entre a expressão de RKIP no tumor e na frente de invasão.

Avaliou-se, ainda, a expressão de RKIP nos três casos onde se observou invasão perineural. Na maioria das células que permeavam o tumor observou-se uma ausência de expressão da proteína RKIP.

1.2.2. Significado prognóstico dos resultados obtidos

A expressão de RKIP quer no tumor quer na frente de invasão não se associou com o prognóstico dos doentes com carcinoma espinocelular do lábio ($p \geq 0,05$).

Tabela 7: Relação entre sobrevivência livre de doença e sobrevivência global aos 3 anos e a expressão de RKIP no tecido tumoral na frente de invasão.

		n	Sobrevivência global aos 3 anos	p*	Sobrevivência livre de doença aos 3 anos	p*
Tumor	Sem expressão de RKIP	30	82,3%	0,59	77,7%	0,45
	Expressão heterogênea de RKIP	10	100%		100%	
	Expressão positiva de RKIP	54	87,2%		77,1%	
Frente de invasão	Sem expressão de RKIP	35	78,4%	0,27	80,8%	0,42
	Expressão heterogênea de RKIP	36	95,5%		83,8%	
	Expressão positiva de RKIP	23	85,0%		72,6%	

*Teste de Log-Rank ou Teste de Breslow

2. CD147

2.1. Significado prognóstico das variáveis clínico-patológicas

A análise da sobrevivência livre de doença em função das características clínico-patológicas da amostra estudada identificou a localização do tumor primário como sendo uma variável informativa ($p=0,001$) na determinação de um alto risco de recidiva. Na análise da sobrevivência global verificou-se que a localização do tumor primário é, mais uma vez, uma variável de prognóstico ($p=0,001$). Os pacientes com tumores do lábio localizados à comissura tiveram uma sobrevivência livre de doença e uma sobrevivência global menores (Tabela 8).

Tabela 8: Sobrevivência livre de doença e sobrevivência global, aos 3 anos, de 66 doentes com carcinoma do lábio posteriormente analisados com anticorpo anti-CD147, em função das características clínico-patológicas da amostra. A sombreado encontram-se os valores com significado estatístico ($p<0,05$).

	n	Sobrevivência global aos 3 anos	p*	Sobrevivência livre de doença aos 3 anos	p*
Idade, n (%)					
≤ 72	34	83,3%	0,69	79,6%	0,20
> 72	32	89,9%		96,9%	
Gênero, n (%)					
Masculino	48	86,2%	0,99	87,4%	0,93
Feminino	18	94,1%		94,1%	
Localização, n (%)					
Lábio superior	4	50,0%	0,001	100%	0,001
Lábio inferior	61	91,7%		88,9%	
Comissura	1	0,0%		0,0%	
Estadio, n (%)					
I	47	91,0%	0,51	86,5%	0,97
II	13	81,6%		92,9%	
III	1	41,7%		100%	
Disseminação, n (%)					
Sem	65	86,7%	0,90	87,8%	0,827
Perineural	0	100%		100%	
Ganglionar	1	100%		100%	

*Teste de Log-Rank ou Teste de Breslow

2.2. Expressão da proteína CD147

A expressão de CD147 no tecido normal, quando existe, está restrita à camada basal do epitélio (Figuras 22 e 23). É uma marcação tênue, citoplasmática e, por vezes, membranar. O mesmo acontece no tecido hiperplásico, contudo, aqui, a marcação é mais intensa (Figuras 25 e 26). O tecido tumoral apresenta, também, diferentes tipos de marcação. Existem amostras sem expressão da proteína (Figura 27) e amostras em que as células tumorais estão completamente coradas (Figuras 28 e 29). No entanto, apesar de neste último caso, o tecido tumoral expressar a proteína, o CD147 é expresso a diferentes níveis. Assim, existem amostras com uma marcação intensa (Figura 29) enquanto outras, apresentam uma marcação mais tênue (Figura 28). Esta marcação é geralmente citoplasmática e, por vezes, membranar.

Epitélio

Tecido Normal

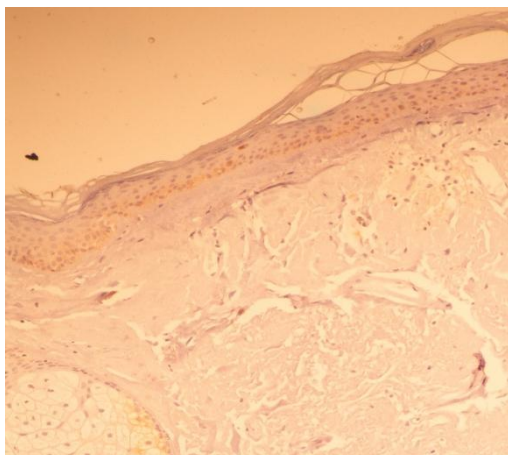


Figura 22: Ausência de expressão de CD147 no epitélio (100x).

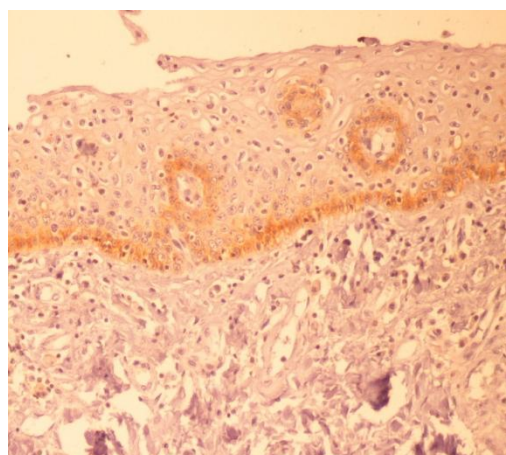


Figura 23: Expressão positiva de CD147 no epitélio (100x).

Estroma

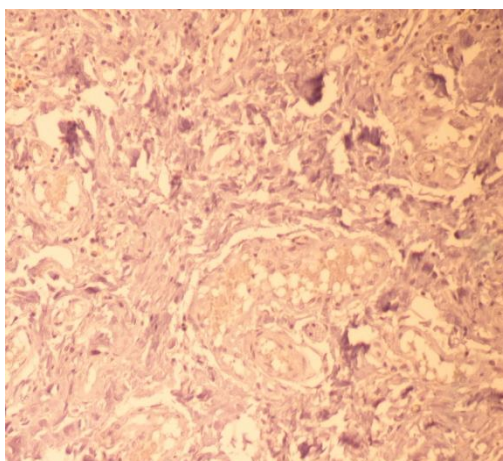


Figura 24: Ausência de expressão de CD147 no estroma (100x).

Hiperplasia

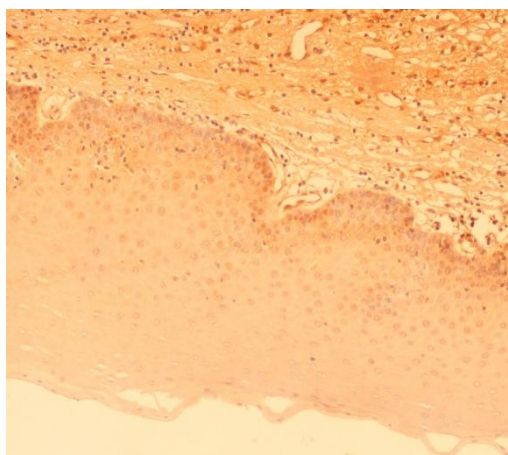


Figura 25: Ausência de expressão de CD147 no tecido hiperplásico (100x).



Figura 26: Expressão positiva de CD147 no tecido hiperplásico (100x).

Tumor primário

Tecido Tumoral

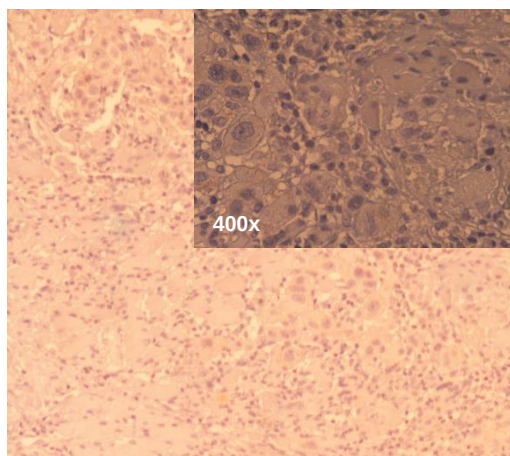


Figura 27: Ausência de expressão de CD147 no tumor (100x).

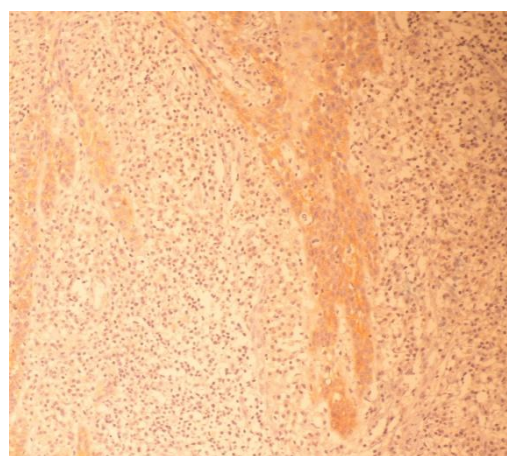


Figura 28: Expressão positiva de CD147 no tumor primário – baixos níveis de expressão (100x).

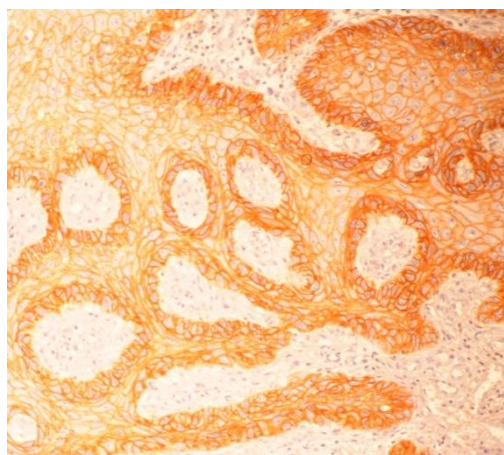


Figura 29: Expressão positiva de CD147 no tumor primário - altos níveis de expressão (100x).

2.2.1. Correlação da expressão da proteína com os parâmetros clínico-patológicos

Foi avaliada a expressão de CD147 em todos os tecidos tumorais. Dos 66 tumores analisados, em 24 observou-se uma ausência de expressão da proteína e em 42 casos uma expressão positiva. Nenhuma das cinco variáveis analisadas (idade, género, localização, estágio e disseminação) se mostrou estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 9: Relação entre a expressão de CD147 em tecido normal e tumoral e as características clínico-patológicas do tumor.

	Ausência de expressão de CD147 no tumor	Expressão positiva de CD147 no tumor	Total	p*
Idade , n (%)				
≤ 72 anos	15 (62,5%)	19 (45,2%)	34 (51,5%)	0,54
> 72 anos	9 (37,5%)	23 (54,8%)	32 (48,5%)	
Género, n (%)				
Masculino	20 (83,3%)	28 (66,7%)	48 (72,7%)	0,14
Feminino	4 (16,7%)	14 (33,3%)	18 (27,3%)	
Localização, n (%)				
Lábio superior	1 (4,2%)	3 (7,1%)	4 (6,1%)	0,37
Lábio inferior	22 (91,7%)	39 (92,9%)	61 (92,4%)	
Comissura	1 (4,2%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	
Estadio, n (%)				
I	20 (83,3%)	30 (71,4%)	50 (75,8%)	0,48
II	4 (16,7%)	11 (26,2%)	15 (22,7%)	
III	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (1,5%)	
Disseminação, n (%)				
Sem	24 (100%)	41 (97,6%)	65 (98,5%)	0,82
Ganglionar	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Perineural	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (1,5%)	

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) ou Teste exacto de Fisher

2.2.2. Significado prognóstico dos resultados obtidos

No presente estudo, a expressão de CD147 não se associou com o prognóstico dos doentes com carcinoma espinocelular do lábio ($p \geq 0,05$).

Tabela 10: Relação entre sobrevivência livre de doença e sobrevivência global aos 3 anos e a expressão de CD147 no tecido tumoral.

	n	Sobrevivência global aos 3 anos	p*	Sobrevivência livre de doença aos 3 anos	p*
Sem expressão de CD147 no tumor	24	95,5%	0,44	89,4%	0,90
Expressão positiva de CD147 no tumor	42	82,0%		86,5%	

*Teste de Log-Rank ou Teste de Breslow

3. Relação entre as expressões de RKIP e CD147

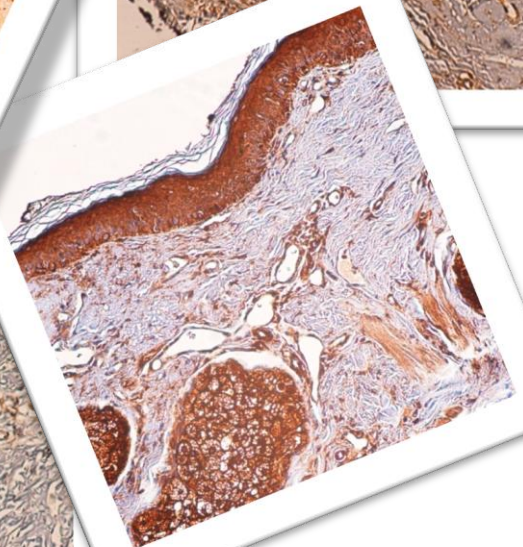
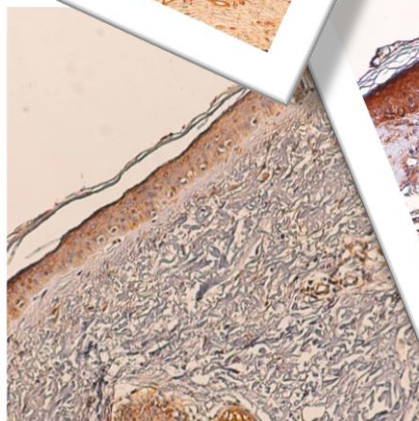
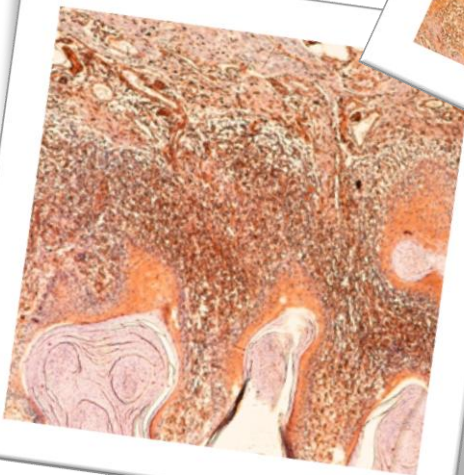
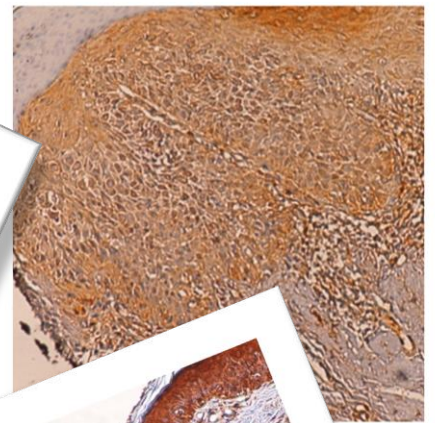
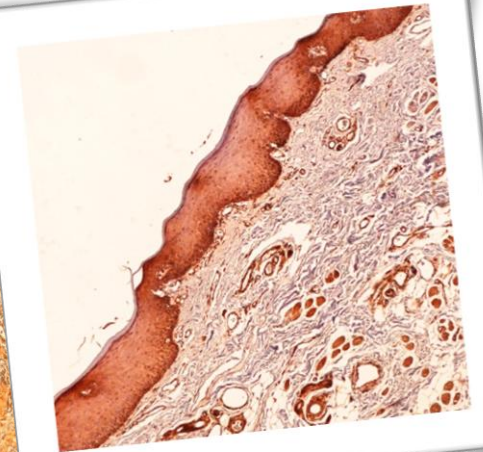
Por último avaliou-se a expressão de CD147 em função da expressão de RKIP com o objectivo de tentar estabelecer uma relação entre a expressão das duas proteínas, ou seja, verificar se nos casos em que não existe expressão de CD147 a expressão de RKIP é positiva e se nos casos em que a expressão de CD147 é positiva, a expressão de RKIP é negativa. No entanto, não se verificou qualquer associação estatística entre os resultados ($p \geq 0,05$).

Tabela 11: Relação entre a expressão de CD147 e RKIP no tecido tumoral.

	Sem expressão de CD147	Expressão positiva de CD147	p*
Sem expressão de RKIP	11	11	0,23
Expressão heterogénea de RKIP	2	7	
Expressão positiva de RKIP	11	24	

*Teste de Qui-quadrado (χ^2) ou Teste exacto de Fisher

DISCUSSÃO



Além de avaliar as variáveis clínico-patológicas (idade, género, localização do tumor primário, estágio e disseminação tumoral) como factores de prognóstico no carcinoma espinocelular do lábio, o presente estudo pretende avaliar a expressão de duas proteínas, RKIP e CD147 e relaciona-la com as características clínico-patológicas e com o prognóstico dos doentes com esta neoplasia.

Em cada amostra, a expressão de ambas as proteínas foi avaliada em diferentes locais histológicos: epitélio, estroma, tecido hiperplásico, tecido tumoral e frente de invasão tumoral. A imunoexpressão de RKIP foi, ainda, quando possível, avaliada no local de invasão perineural. O tecido foi classificado como normal quando não se encontrava em contiguidade com o tumor e não existiam evidências histopatológicas de presença de neoplasia ou hiperplasia. Quer o epitélio quer o estroma correspondem a tecido aparentemente normal. Por frente de invasão entende-se o local histopatológico onde o tumor deixa de estar encapsulado (circunscrito) e começa a invadir tecidos vizinhos, sendo aqui que se inicia a disseminação, correspondendo, por isso, à fase mais inicial da metastização e invasão. Por invasão perineural entende-se o envolvimento dos nervos pelas células neoplásicas. No cancro do lábio, a presença de invasão perineural é usual e um factor de mau prognóstico, já que está relacionada com o aparecimento de carcinomatose das meninges, ou seja, metastização à distância ⁽⁶⁵⁾.

Quando se avaliaram as variáveis clínico-patológicas como factores de prognóstico na amostra n=94, posteriormente marcada com RKIP, verificou-se que a idade dos doentes, a localização e o estágio do tumor primário se associam com o prognóstico dos doentes com carcinoma espinocelular do lábio. A localização do tumor associou-se não só com a sobrevivência global dos doentes, mas também com o risco de recidiva. Assim, os tumores localizados à comissura têm pior prognóstico do que os restantes. Tumores localizados no lábio inferior têm um melhor prognóstico. A idade dos doentes e o estágio do tumor associaram-se, apenas, com o risco dos doentes com esta neoplasia recidivarem. Os doentes com idades inferiores ou iguais a 72 anos e/ou com tumores com estadiamento III, têm um pior prognóstico que os demais.

Podemos apontar pelo menos uma fragilidade neste estudo: o reduzido número de amostras com uma característica específica. Por exemplo, apesar do estágio do tumor ter sido considerada uma variável informativa no que diz respeito ao prognóstico dos doentes com cancro do lábio, apenas 4 tumores eram de estágio III. Por outro lado, quando analisámos a disseminação tumoral, verificámos que 95,7% dos doentes não a possuem. Em apenas 3 doentes verificámos a presença de invasão perineural e unicamente num a presença de metástases ganglionares. Assim, seria interessante aumentar

a amplitude da amostra com o objectivo de obtermos um maior número de casos com estas características. No entanto, existe uma razão para o facto de estes casos serem escassos: visto ser uma lesão visível, a neoplasia do lábio é, na generalidade, uma neoplasia diagnosticada numa fase inicial. Assim, é relativamente difícil encontrar doentes com estádios avançados e com presença de metástases. Os tumores espinocelulares do lábio são, por isso, na generalidade dos casos, tumores com bom prognóstico ⁽⁶⁵⁾.

A expressão de RKIP foi avaliada em três níveis distintos: expressão negativa (quando em mais de 90% das células não existe expressão de RKIP); expressão heterogénea (quando existe um equilíbrio entre o número de células que expressa e não expressa o RKIP); expressão positiva (quando em mais de 90% das células existe expressão de RKIP). A expressão de RKIP observa-se, sobretudo, no citoplasma das células. Em todas as amostras de tecido aparentemente normal, verificamos a expressão positiva de RKIP, sobretudo na camada basal do epitélio, nervos, ácinos e ductos. Nos tumores e frente de invasão, verificou-se a presença de casos onde a proteína não é expressa, casos onde essa expressão se faz de uma forma heterogénea e, ainda, casos com expressão positiva da proteína. Quando positiva, a expressão de RKIP pode variar em níveis de intensidade, havendo, assim, tumores onde a marcação se faz de uma forma intensa e, outros, onde esta marcação é mais ténue, contudo, existente.

O RKIP, proteína inibidora da cínase Raf, está envolvido na regulação de diversas cascatas de sinalização celular, sendo as mais importantes, a cascata do ERK, do GPCR e do NF- κ B. Devido à sua acção sobre estas, o RKIP inibe processos celulares, tais como a proliferação e transformação celular ^(18,19). O RKIP tem ainda um papel importante na manutenção da estabilidade genómica ⁽¹¹⁹⁾ e a ausência de expressão do RKIP pode aumentar a instabilidade genética na célula ⁽¹¹⁸⁾ bem como a taxa de divisão celular ⁽¹²⁰⁾. O RKIP está, por isso, envolvido na manutenção da homeostase celular. Assim, a ausência de expressão do RKIP pode levar a um crescimento tumoral e à disseminação do mesmo. Estudos de imunohistoquímica anteriormente realizados em tecidos de doentes com diferentes tipos tumorais, indicaram que a expressão de RKIP é alta ou moderada em tecidos normais, diminuindo em tumores primários e sendo baixa ou indetectável em metástases desses mesmos tumores ^(17,20,21,22). Assim, verifica-se uma diminuição dos níveis de RKIP em células de carcinomas espinocelulares ⁽²⁴⁾, melanomas malignos ^(85,122,123), carcinoma da próstata ^(124,125), carcinoma colorectal ^(20,126,127), carcinoma gástrico ⁽¹⁵⁾, carcinoma da mama ^(22,40,120,124), carcinoma da nasofaringe ⁽¹²⁹⁾, carcinoma do pulmão ⁽²¹⁾ carcinoma hepatocelular ^(120,128), carcinoma anaplásico da tiróide ⁽¹³⁰⁾, carcinoma da vesícula biliar ⁽¹³¹⁾ e insulinomas ⁽¹³²⁾ relativamente aos mesmos tecidos normais. No entanto, os valores de expressão do RKIP nos tumores primários acima referidos são mais elevados do que nas células metastáticas dos mesmos tumores

(15,20,21,22,24,40,85,120,122,123,124,125,126,127,128,129,130,132). Com recurso a estes estudos, foi possível concluir que existe uma correlação entre a expressão diminuída de RKIP e a ocorrência de metástases ⁽²¹⁾.

Neste estudo foi possível observar que, apesar de nos 94 casos a expressão ser positiva no tecido normal, apenas em 54 casos esta expressão é positiva no tumor e, apenas em 23 casos é positiva na frente de invasão. Assim, concluímos que, existe uma diminuição da expressão do RKIP no tecido tumoral relativamente ao tecido normal e na frente de invasão relativamente ao tecido tumoral. Por outro lado, quando se comparou apenas a expressão de RKIP no tecido tumoral e frente de invasão concluiu-se que, dos 30 casos com expressão de RKIP negativa no tumor, 29 permanecem negativos e em um a expressão da proteína torna-se heterogénea na frente de invasão; dos 10 casos com expressão heterogénea de RKIP no tumor, em 3 casos esta expressão torna-se negativa na frente de invasão; dos 54 casos com expressão positiva de RKIP no tumor, 28 casos tornam-se heterogéneos e 3 negativos para a expressão de RKIP na frente de invasão. Assim, é notório o aumento do número de casos sem expressão de RKIP, mas sobretudo do número de casos em que a expressão de RKIP é heterogénea na frente de invasão relativamente ao tumor. Pode-se então concluir que a expressão da proteína diminui na frente de invasão. Quando se avaliou a expressão de RKIP na zona de invasão perineural verificámos que as células que tendem a migrar para os nervos são células com expressão de RKIP negativa ou heterogénea. Assim, concluiu-se que nos clones que poderão originar metástases por estarem presentes no local onde se inicia a metastização (frente de invasão) ou por rodearem os nervos nos casos com invasão perineural, a expressão de RKIP é heterogénea ou inexistente e, assim, a probabilidade de originarem metástases com baixos níveis de expressão de RKIP é elevada. Podem-se avançar algumas explicações para que ocorra a diminuição da expressão da proteína, entre elas a metilação do promotor do gene que codifica o RKIP ⁽¹¹⁹⁾, mutações neste gene, alterações pós-transcrição, ou ainda, alterações celulares decorrentes do processo de EMT ⁽⁷⁶⁾. No entanto, são necessários mais estudos para que se possam validar estas suposições. Os resultados obtidos no nosso estudo quanto à expressão de RKIP entram, por isso, em concordância com o que já havia sido descrito em outros tipos de carcinoma.

A expressão de RKIP no tumor e na frente de invasão foi correlacionada, separadamente, com os parâmetros clínico-patológicos da amostra. A expressão de RKIP no tumor correlacionou-se com o estadio do mesmo. No tumor, em qualquer um dos três estádios, predominam os casos com expressão positiva de RKIP. No entanto, os tumores em que não existe expressão de RKIP encontram-se quase exclusivamente em estágio I e, por isso, quer no estadio II, quer no estágio III, identificaram-se, quase unicamente, tumores com expressão positiva ou heterogénea de RKIP. Esta relação estatisticamente

significativa entre a expressão de RKIP e o estágio do tumor foi verificada também da frente de invasão. Contudo, neste local histológico, verificou-se que, no estágio I predominam casos onde não ocorre a expressão de RKIP, no estágio II é comum a expressão heterogênea da proteína e no estágio III existem, sobretudo, casos com expressão de RKIP positiva. Um estudo anterior, realizado em carcinoma da nasofaringe concluiu que a diminuição dos níveis de expressão do RKIP se associa com um estágio clínico mais avançado ⁽⁷³⁾. Contudo, no presente trabalho, verificou-se que nos casos com estágios mais avançados existe uma expressão positiva ou heterogênea de RKIP, enquanto os casos onde a expressão de RKIP é ausente encontram-se em estágio I. No estudo desenvolvido, a expressão de RKIP não se associou com a disseminação tumoral. Na realidade, o mesmo estudo realizado em nasofaringe verificou que a expressão de RKIP se associa com a presença de metástases ganglionares neste órgão ⁽⁷³⁾. Mais uma vez pode-se afirmar que o reduzido número de amostras com disseminação tumoral pode ser a causa da ausência de conclusões neste sentido.

Quando se analisou o significado prognóstico dos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a expressão do RKIP no tumor ou frente de invasão não se associa à sobrevivência global ou a sobrevivência livre de doença dos pacientes. Assim, ao contrário do que acontece no carcinoma colorrectal ^(20,126), no carcinoma da próstata ⁽¹²⁵⁾ e no carcinoma espinocelular cutâneo ⁽²⁴⁾, a expressão de RKIP no tumor não poderá ser usada para prever o prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular do lábio. Contudo, um outro estudo, realizado em melanoma ⁽¹⁴⁰⁾ verificou também que a expressão de RKIP não se correlaciona com o prognóstico dos pacientes. O facto do cancro do lábio e o melanoma terem, em comum, o principal factor de risco: a exposição solar ^(1,140), poderá estar na origem do facto de em ambos os casos a expressão de RKIP não ser um factor prognóstico. No entanto, para que se possa validar esta teoria, são necessários mais estudos.

Uma vez que o número de amostras marcadas com anticorpo anti-CD147 era diferente do número de amostras analisadas com anticorpo anti-RKIP, as variáveis clínico-patológicas das duas amostragens eram, logicamente diferentes e, portanto, quando se analisou o significado prognóstico destas variáveis obtiveram-se valores distintos. Assim, no estudo da proteína CD147 verificou-se que a localização do tumor primário se relacionava com o prognóstico dos doentes com carcinoma espinocelular do lábio. A localização do tumor relacionou-se quer com a sobrevivência global dos doentes quer com a sua probabilidade de recidivarem. Mais uma vez, os pacientes com carcinoma localizado no lábio inferior tiveram melhor prognóstico, ao contrário do paciente com carcinoma localizado à comissura labial. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos ante-

riormente ⁽¹⁾. Esta amostra é constituída por um número ainda mais pequeno de casos e, aqui, escasseiam casos com algumas características clínico-patológicas em particular, como por exemplo, indivíduos com tumores em estágio III ou com presença de disseminação tumoral. Assim, é natural, que nesta amostra apenas a localização do tumor tenha sido associada com o prognóstico dos doentes, ao contrário do que aconteceu na amostra posteriormente marcada com anticorpo anti-RKIP.

A expressão de CD147 foi avaliada em dois níveis: ausência de expressão; expressão positiva de CD147. Foi usado um score obtido pela multiplicação dos valores da intensidade da coloração e a abundância relativa de células CD147 positivas. Quando o score total foi maior ou igual ao valor médio a expressão foi considerada positiva, quando o score total era menor que esse valor a expressão foi considerada ausente. Na maior parte dos casos não se verificou expressão de CD147 no tecido normal. No entanto, quando existe, a expressão da proteína ocorre sobretudo na camada basal do epitélio e glândulas, sendo uma expressão ténue. No tecido hiperplásico, a imunoexpressão de CD147 é mais intensa do que no tecido aparentemente normal. O tecido tumoral apresenta, também, diferentes tipos de marcação. Existem amostras tumorais sem expressão da proteína e amostras em que as células tumorais estão completamente coradas. No entanto, apesar de neste último caso, o tecido tumoral expressar a proteína, o CD147 é expresso a diferentes níveis. Assim, existem amostras com uma marcação mais intensa que outras. A expressão de CD147 ocorre geralmente no citoplasma podendo, por vezes, ocorrer na membrana celular.

O CD147 do tumor tem como principal função induzir a produção, expressão e activação, de MMPs pelas células peritumorais. Estas últimas estão envolvidas na degradação dos ECM e das membranas basais ⁽¹⁹²⁾, regulam o ambiente tumoral e a sua expressão está aumentada na maior parte das neoplasias ⁽²⁵⁾. As metaloproteínases da matriz intervêm em processos como a angiogénese tumoral, a manutenção do microambiente das células tumorais, necessário para a proliferação e invasão tumoral e, portanto, metastização ^(29,30,31,32,33). A segunda função melhor definida do CD147 é a sua capacidade de regular a adesão intracelular ⁽²⁸⁾. Esta proteína funciona ainda como um chaperone. É necessário que ocorra a ligação entre o CD147 e os MCT para que se dê o transporte de lactato, resultante da glicólise anaeróbia realizada nas células do centro do tumor em hipoxia. Ao ser exportado para o exterior da célula o ácido láctico diminui o pH extracelular. Um ambiente ácido representa, por si só, uma vantagem significativa para as células tumorais, uma vez que está associado com a inibição da função citotóxica das células T peritumorais, permitindo um crescimento tumoral contínuo ⁽²⁶⁾, um aumento da migração, invasão e metástase, entre outros. Assim, a acidose tumoral, resultante do excessivo transporte de lactato para o meio extracelular, produz fenótipos mais agressivos ⁽²²¹⁾.

Em estudos anteriores, verificou-se que os níveis de expressão de CD147 estão aumentados em tumores primários relativamente ao tecido normal ⁽²⁹⁾ e em lesões metastáticas relativamente a tumores primários ⁽³⁴⁾. Assim, quanto mais agressivo for o tumor, maiores serão os níveis de CD147 ^(38,39,272,273,274,275,276,277,278). Um aumento de expressão do CD147 tem sido detectado no carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço, um dos carcinomas com maiores níveis de expressão de CD147 ⁽²⁴⁴⁾, nomeadamente no carcinoma espinocelular da cavidade oral ^(32,182), no carcinoma espinocelular esofágico ^(32,210) e no carcinoma da orofaringe ⁽¹⁶⁰⁾. Valores elevados de expressão de CD147 têm também sido verificados no carcinoma seroso do ovário ⁽²¹⁵⁾, carcinoma gástrico ⁽²⁷⁸⁾, carcinoma da mama ^(182,275,279,280), adenocarcinoma medular da mama ^(27,276,281), carcinoma pancreático ^(27,276,281), carcinoma renal ^(27,182,276,281), hepatoma ^(27,269,276,281), glioblastoma ^(27,276,281), glioma ^(182,282), linfoma ^(182,281), melanoma ^(182, 172), carcinoma do pulmão ^(45,156,182) e carcinoma da bexiga ^(182,270).

Dos 66 casos marcados com anticorpo anti-CD147, em 24 não se verificou expressão da proteína no tumor. Nos restantes 42 casos verificou-se uma expressão de CD147 que, apesar de ocorrer em diferentes níveis, é sempre mais intensa no tumor do que no tecido normal. Por essa razão, constatou-se que em mais de 60% dos casos a expressão da proteína aumenta no tumor relativamente à sua expressão no tecido normal. Assim, também no carcinoma espinocelular do lábio, a expressão de CD147, na maior parte dos casos, aumenta no tumor relativamente ao tecido aparentemente normal.

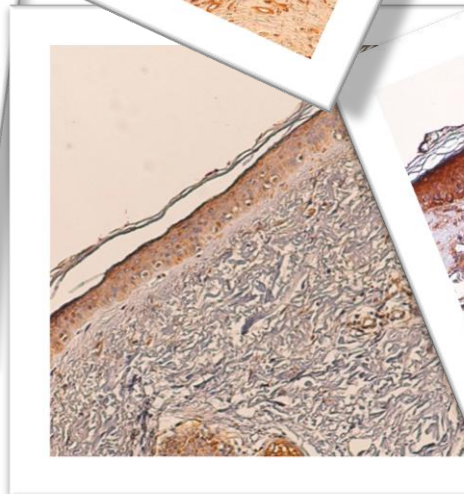
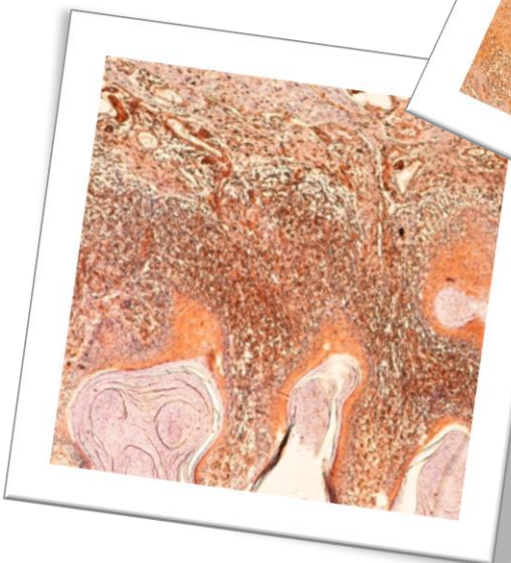
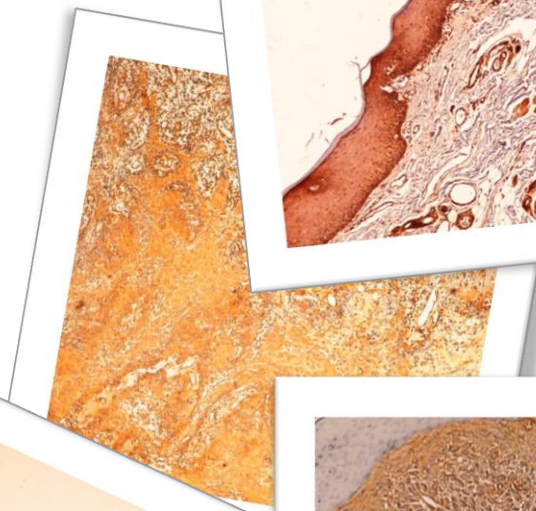
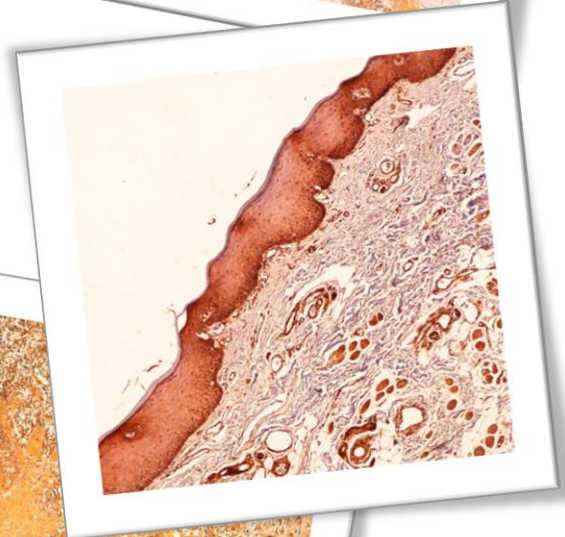
Diversos estudos correlacionam a expressão de CD147 com o grau do tumor, com os estádios TNM mais avançados, com a insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento e com o aumento do potencial metastático e ganglionar ^(41,42,43,44,45). Contudo, neste estudo não se identificou qualquer associação estatisticamente significativa entre a expressão do CD147 e cada uma das cinco variáveis clínico-patológicas em estudo (idade, género, localização do tumor primário, estágio, e disseminação tumoral). Mais uma vez a falta de amostras, por exemplo, em estágio III ou com disseminação tumoral, pode justificar a falta de associação encontrada.

Em estudos anteriores, os níveis de expressão de CD147 correlacionaram-se com um mau prognóstico ^(41,42,43,44,45), designadamente nos cancros da bexiga ⁽²⁸³⁾, ovário e colo do útero ⁽¹⁵³⁾. Nestes, a expressão do CD147 pode ser considerada um marcador útil para seleccionar pacientes com alto risco e pior prognóstico clínico, propondo uma terapia mais adequada para estes ^(42,46). Ao contrário do que se verificou em estudos anteriores, no nosso estudo a expressão de CD147 não se associou com o prognóstico dos doentes com carcinoma espinocelular do lábio.

Por fim, tentou verificar-se a existência de uma relação entre a expressão das duas proteínas, ou seja, verificar se nos casos em que a expressão de RKIP é negativa a expressão de CD147 é positiva e vice-versa. Na verdade, não se verificou qualquer associação entre a expressão das duas proteínas o que poderá significar que a função de ambas não está relacionada, pelo menos no que diz respeito ao carcinoma do lábio. Contudo não se detectou, em estudos anteriores, uma relação de funcionalidade entre as duas proteínas.

Existem algumas possíveis explicações para o facto das expressões de RKIP e CD147 no carcinoma do lábio não se associarem com o prognóstico dos doentes. Na realidade, na maior parte dos casos, esta é uma neoplasia diagnosticada precocemente, uma vez que é uma lesão visível ⁽¹⁾. Este facto, é possivelmente, muito mais preponderante para o prognóstico da doença do que a expressão de qualquer uma das duas proteínas. O cancro do lábio é também uma neoplasia com factores etiológicos bastante especiais. Assim, a exposição solar constitui o principal factor de risco para o seu desenvolvimento ^(4,55,57), apesar dos hábitos tabágicos terem, também, um papel importante na carcinogénese do lábio ^(4,55,57,58). Esta peculiaridade pode, de alguma forma, tornar a influência da expressão de ambas as proteínas no desenvolvimento tumoral do lábio menos importante do que é em outras neoplasias com factores de risco bastante diferentes. Estudos anteriores indicam que a expressão de RKIP poderá estar associada com a uma diminuição do aparecimento de metástases sem, no entanto, afectar o crescimento do tumor primário, podendo, assim, ser considerado um supressor de metástases. Por seu lado, o CD147 ao estimular a produção de MMPs ^(42,182) potencia indirectamente a metastização ^(29,30,31,32,33,192). O cancro do lábio é uma neoplasia onde a metastização não é comum ⁽¹⁾, uma vez que, possivelmente, as células tumorais do lábio são menos competentes para metastizar do que as células de outros carcinomas. Esta situação, poderá sugerir que o papel quer do RKIP quer do CD147 a nível da metastização no carcinoma do lábio, pode não ser relevante ou tão explícito como acontece em outras neoplasias.

CONCLUSÕES / PERSPECTIVAS FUTURAS



Nos 94 casos em que foi analisada a imunoreactividade do RKIP, verificou-se que a localização do tumor primário é um factor de prognóstico da sobrevivência dos pacientes com cancro do lábio. As variáveis clínico-patológicas, como a idade dos pacientes, estágio e localização do tumor primário, relacionaram-se com a probabilidade que os doentes têm de recedivarem num período de 3 anos de seguimento. Assim, os pacientes com idades inferiores ou iguais a 72 anos, cujos tumores estejam localizados à comissura labial e/ou em estágio III têm pior prognóstico. Quando se analisou a expressão do RKIP no tecido tumoral propriamente dito, verificou-se que esta se relaciona com o estágio do tumor. Em cada um dos 3 estágios da doença observou-se um grande número de casos em que a expressão da proteína é positiva. Os tumores em que não se verificou expressão da proteína, encontravam-se essencialmente em estágio I. Nos restantes estágios, existia uma maior prevalência de casos em que se verificava a expressão positiva ou por vezes heterogénea de RKIP. O estudo da expressão do RKIP na frente de invasão, permitiu concluir que a expressão da proteína se relaciona estatisticamente com o estágio do tumor primário. Constatou-se que no estágio I prevalecem os casos com ausência de expressão de RKIP na frente de invasão, no estágio II é mais comum a expressão heterogénea da proteína e no estágio III verificou-se a presença sobretudo de casos em que a expressão de RKIP na frente de invasão é positiva. Observou-se, ainda, que os níveis de expressão de RKIP na frente de invasão diminuem quando comparados com os níveis de expressão no tumor. Assim, no tecido tumoral predominam os casos em que a expressão de RKIP é positiva enquanto, na frente de invasão é notório um aumento dos casos em que a expressão da proteína é inexistente ou ocorre de uma forma heterogénea. Todavia, a expressão de RKIP, quer no tumor, quer na frente de invasão, não se mostrou um factor de prognóstico no desenvolvimento do cancro do lábio.

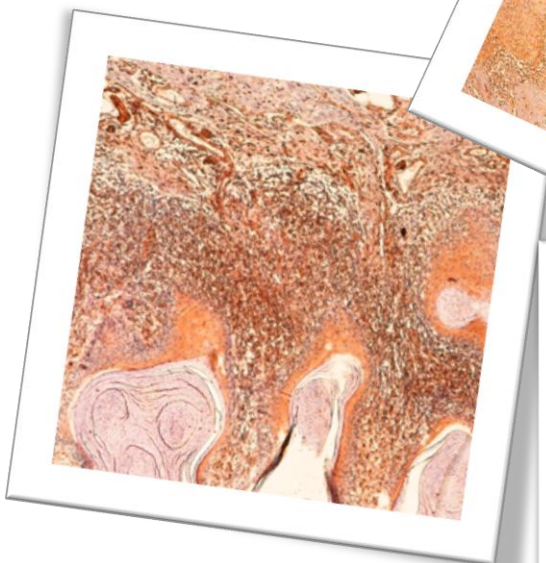
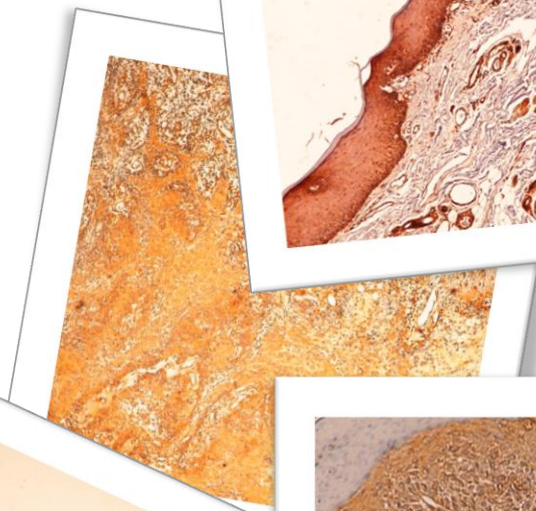
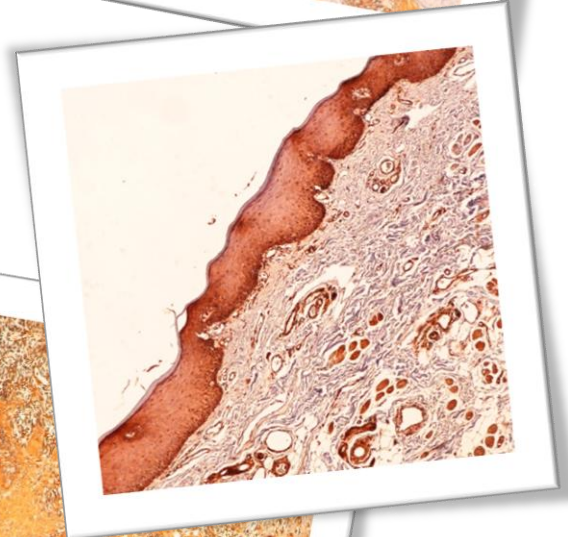
Nos 66 casos marcados com anticorpo anti-CD147, verificou-se que a localização do tumor primário é um factor de prognóstico para os doentes com cancro de lábio. Pacientes com tumores localizados à comissura possuem sobrevivências globais menores e um alto risco de recidiva em três anos de seguimento. A expressão da proteína não se relacionou com nenhuma variável clínico-patológica nem se mostrou um factor de prognóstico para os pacientes com a neoplasia em estudo. Contudo, observou-se um aumento de expressão de CD147 no tumor relativamente ao tecido normal adjacente.

Depois de se terem correlacionado os dados de expressão das duas proteínas com o objectivo de concluir se, nos casos em que o RKIP está expresso positivamente, não existe expressão de CD147 e vice-versa, não se verificou qualquer associação entre

os resultados, concluindo-se que a função de ambas não está relacionada, pelo menos no carcinoma do lábio.

Futuramente, seria interessante aumentar o número de pacientes em estudo. Assim, provavelmente ter-se-ia um maior número de pacientes em estágio III e um maior número de casos com disseminação tumoral (perineural ou ganglionar). Desta forma poder-se-ia tirar conclusões mais precisas quanto ao facto destas serem factores de prognóstico no cancro do lábio e encontrar uma relação entre a expressão de cada uma das proteínas e estas variáveis clínico-patológicas. Por outro lado, seria relevante validar os resultados obtidos recorrendo a outras técnicas que permitam estudar a expressão das proteínas, RKIP e CD147, tais como, as técnicas de PCR (qualitativo e em tempo real) e Western Blot. Seria também interessante verificar os efeitos do silenciamento das duas proteínas recorrendo à técnica de siRNA em modelos *in vivo* com cancro do lábio. Pouco se sabe sobre inibidores ou activadores de cada uma das duas proteínas, bem como aos processos que levam à perda/activação das mesmas no tecido tumoral relativamente ao tecido normal. Seria, portanto, bastante pertinente tentar esclarecer estes mecanismos.

REFERÊNCIAS



- (1)** Casino, Á. R., Toledano, I. P., Jorge, J. F., Díez, J. M. O., Llobet, C. C., Prat, M. A., 2006. Brachytherapy in lip cancer." *Braquiterapia en el cáncer de labio* 11(3): 137-143.
- (2)** RORENO, Registo Oncológico Regional do Norte, Publicações Nacionais, 2005. Registo Oncológico Nacional. http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2005.pdf (último acesso a 09/09/11).
- (3)** López-Pintor, R. M., Hernández, G., De Arriba, L., De Andrés, A. Lip cancer in renal transplant patients. *Oral Oncology* In Press, Corrected Proof.
- (4)** De Visscher, J. G. A. M., Schaapveld, M., Otter, R., Visser, O., Van Der Waal, I., 1998. Epidemiology of cancer of the lip in the Netherlands. *Oral Oncology* 34(5): 421-426.
- (5)** Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A., Menck, H. R., 1998. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 124(9): 951-962.
- (6)** Funk, G. F. Karnell, L. H., Robinson, R. A., Zhen, W. K., Trask, D. K., Hoffman, H. T., 2002. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A national cancer data base report. *Head and Neck* 24(2): 165-180.
- (7)** Antoniades, D. Z., Styanidis, K., Papanayotou, P., Trigonidis, G., 1995. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate-I. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 31(5): 333-339.
- (8)** Holmkvist, K. A., Roenigk, R. K., 1998. Squamous cell carcinoma of the lip treated with Mohs micrographic surgery: Outcome at 5 years. *Journal of the American Academy of Dermatology* 38(6 I): 960-966.
- (9)** Van Der Tol, I. G. H., De Visscher, J. G. A. M., Jovanovic, A., Van Der Waal, I., 1999. Risk of second primary cancer following treatment of squamous cell carcinoma of the lower lip. *Oral Oncology* 35(6): 571-574.
- (10)** Vukadinovic, M., Jezdic, Z., Petrovic, M., Medenica, L. M., Lens, M., 2007. Surgical Management of Squamous Cell Carcinoma of the Lip: Analysis of a 10-Year Experience in 223 Patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 65(4): 675-679.
- (11)** DeVita, V. T., Samuel, H., Rosenberg, S. A., 2001. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins 30.2: 609-611.
- (12)** DeVita, V. T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S. A., 2008. *Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 8th Edition, Lippincott Williams & Wilkins 36: 830-832.
- (13)** Woods Ignatoski, K. M., Grewal, N. K., Markwart, S. M., Vellaichamy, A., Chinnaiyan, A. M., Yeung, K., Ray, M. E., Keller, E. T., 2008. Loss of Raf Kinase Inhibitory

Protein Induces Radioresistance in Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 72(1): 153-160.

(14) Granovsky, A. E., Clark, M. C., McElheny, D., Heil, G., Hong, J., Liu, X., Kim, Y., Joachimiak, G., Joachimiak, A., Koide, S., Rosner, M. R., 2009. Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 29(5): 1306-1320.

(15) Wang, J., Yang, Y. H., Wang, A. Q., Yao, B., Xie, G., Feng, G., Zhang, Y., Cheng, Z. S., Hui, L., Dai, T. Z., Du, X. B., Wang, D., 2010. Immunohistochemical detection of the Raf kinase inhibitor protein in nonneoplastic gastric tissue and gastric cancer tissue. *Medical Oncology* 27(2): 219-223.

(16) Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E., Kolch, W., 2006. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and Cellular Biology* 26(6): 2262-2272.

(17) Zeng, L., Imamoto, A., Rosner, M. R., 2008. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): A physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12(10): 1275-1287.

(18) Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., Kolch, W., 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the Raf kinase inhibitor protein. *Molecular and Cellular Biology* 20(9): 3079-3085.

(19) Mercurio, S., Poleri, C., Carassai, M., Abdala, O., Lombardi, D., Levy, R., Rojas, O., Morero, J., Rosenberg, M., López, A. M., 1998. Malignant pleural mesotheliomas. *Mesotheliomas malignos pleurales* 58(6): 699-706.

(20) Al-Mulla, F., Hagan, S., Behbehani, A. I., Bitar, M. S., George, S. S., Going, J. J., Curto Garcia, J. J., Scott, L., Fyfe, N., Murray, G. I., Kolch, W., 2006. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 24(36): 5672-5679.

(21) Fu, Z., Smith, P. C., Zhang, L., Rubin, M. A., Dunn, R. L., Yao, Z., Keller, E. T., 2003. Effects of Raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 95(12): 878-889.

(22) Hagan, S., Al-Mulla, F., Mallon, E., Oien, K., Ferrier, R., Gusterson, B., CurtoGarcia, J. J., Kolch, W., 2005. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research* 11(20): 7392-7397.

(23) Zaravinos, A., Chatziioannou, M., Lambrou, G. I., Boulalas, I., Delakas, D., Spanidos, D. A., 2010. Implication of RAF and RKIP Genes in Urinary Bladder Cancer. *Pathology and Oncology Research*: 1-10.

- (24)** Zaravinos, A., Kanellou, P., Baritaki, S., Bonavida, B., Spandidos, D. A., 2009. BRAF and RKIP are significantly decreased in cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Cycle* 8(9): 1402-1408.
- (25)** Gabison, E. E., Hoang-Xuan, T., Mauviel, A., Menashi, S., 2005. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87(3-4 SPEC. ISS.): 361-368.
- (26)** Iacono, K. T., Brown, A. L., Greene, M. I., Saouaf, S. J., 2007. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Experimental and Molecular Pathology* 83(3): 283-295.
- (27)** Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., Kikuchi, M., 2006. Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathology International* 56(7): 359-367.
- (28)** Jia, L., Zhou, H., Wang, S., Cao, J., Wei, W., Zhang, J., 2006. Deglycosylation of CD147 down-regulates matrix metalloproteinase-11 expression and the adhesive capability of murine hepatocarcinoma cell HcaF in vitro. *IUBMB Life* 58(4): 209-216.
- (29)** Foda, H. D., Zucker S., 2001. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today* 6(9): 478-482.
- (30)** Qu, X., Yang, W., Jiang, M., Han, T., Han, L., Qu, Y., Wang, G., Shi, D., Xu, G., 2010. CD147 expression in pituitary adenomas and its significance for clinical outcome. *Human Pathology* 41(8): 1165-1171.
- (31)** Zou, W., Yang, H., Hou, X., Zhang, W., Chen, B., Xin, X., 2007. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells. *Cancer Letters* 248(2): 211-218.
- (32)** Bordador, L. C., Li, X., Toole, B., Chen, B., Regezi, J., Zardi, L., Hu, Y., Ramos, D. M., 2000. Expression of EMMPRIN by oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 85(3): 347-352.
- (33)** Tsai, C. H., Hsieh, Y. S., Yang, S. F., Chou, M. Y., Chang, Y. C., 2003. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: Preliminary observations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 95(6): 710-716.
- (34)** Kanekura, T., Chen, X., Kanzaki, T., 2002. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *International Journal of Cancer* 99(4): 520-528.

- (35)** Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., Biswas, C., 1993. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Research* 53(13): 3154-3158.
- (36)** Guo, H., Zucker, S., Gordon, M. K., Toole, B. P., Biswas, C., 1997. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(1): 24-27.
- (37)** Chen, X., Lin, J., Kanekura, T., Su, J., Lin, W., Xie, H., Wu, Y., Li, J., Chen, M., Chang, J., 2006. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Research* 66(23): 11323-11330.
- (38)** Vigneswaran, N., Beckers, S., Waigel, S., Mensah, J., Wu, J., Mo, J., Fleisher, K. E., Bouquot, J., Sacks, P. G., Zacharias, W., 2006. Increased EMMPRIN (CD 147) expression during oral carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology* 80(2): 147-159.
- (39)** Rosenthal, E. L., Shreenivas, S., Peters, G. E., Grizzle, W. E., Desmond, R., Gladson, C. L., 2003. Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 113(8): 1406-1410.
- (40)** Li, J., Peng, L., Wu, L., Kuang, Y., Su, J., Yi, M., Hu, X., Li, D., Xie, H., Kanekura, T., Chen, X., 2010. Depletion of CD147 sensitizes human malignant melanoma cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Journal of Dermatological Science* 58(3): 204-210.
- (41)** Chen, H., Wang, L., Beretov, J., Hao, J., Xiao, W., Li, Y., 2010. Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression. *Clinical and Experimental Metastasis* 27(8): 557-569.
- (42)** Han, Z. D., He, H. C., Bi, X. C., Qin, W. J., Dai, Q. S., Zou, J., Ye, Y. K., Liang, Y. X., Zeng, G. H., Zhu, G., Chen, Z. N., Zhong, W. D., 2010. Expression and Clinical Significance of CD147 in Genitourinary Carcinomas. *Journal of Surgical Research* 160(2): 260-267.
- (43)** Weiwei, Y., Jinhui, L., Xiaoliang, X., Yousheng, A., Huamin, W., 2009. Expression of MMP9 and CD147 in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix and their implication. *Pathology Research and Practice* 205(10): 709-715.
- (44)** Polette, M., Gilles, C., Marchand, V., Lorenzato, M., Toole, B., Tournier, J. M., Zucker, S., Birembaut, P., 1997. Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 45(5): 703-709.

- (45)** Caudroy, S., Polette, M., Tournier, J. M., Burlet, H., Toole, B., Zucker, S., Birembaut, P., 1999. Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47(12): 1575-1580.
- (46)** Zhong, W. D., Chen, Q. B., Ye, Y. K., Han, Z. D., Bi, X. C., Dai, Q. S., Liang, Y. X., Zeng, G. H., Wang, Y. S., Zhu, G., Chen, Z. N., He, H. C., 2010. Extracellular matrix metalloproteinase inducer expression has an impact on survival in human bladder cancer. *Cancer Epidemiology* 34(4): 478-482.
- (47)** Sykes, A. J., Allan, E., Irwin, C., 1996. Squamous cell carcinoma of the lip: The role of electron treatment. *Clinical Oncology* 8(6): 384-386.
- (48)** Moore, K. L., Dalley, A. F., Clinically Oriented Anatomy, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins 7: 934-991.
- (49)** IARC, International Agency for Research on Cancer, Globocan 2008, Most frequent cancers in World, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900> (último acesso a 09/09/11).
- (50)** IARC, International Agency for Research on Cancer, Globocan 2008, Most frequent cancers in more developed regions, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=901> (último acesso a 09/09/11).
- (51)** IARC, International Agency for Research on Cancer, Globocan 2008, Most frequent cancers in less developed regions, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=902> (último acesso a 09/09/11).
- (52)** IARC, International Agency for Research on Cancer, Globocan 2008, Most frequent cancers in Portugal, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=620> (último acesso a 09/09/11).
- (53)** RORENO, Registo Oncológico Regional do Norte, Publicações RORENO, 2005. http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/roreno_05.pdf (último acesso a 09/09/11).
- (54)** Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 45(4-5): 309-316.
- (55)** Zini, A., Czerninski, R., Sgan-Cohen, H. D., 2010. Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 39(4): 299-305.
- (56)** Van Leeuwen, M. T., Grulich, A. E., McDonald, S. P., McCredie, M. R. E., Amin, J., Stewart, J. H., Webster, A. C., Chapman, J. R., Vajdic, C. M., 2009. Immunosuppression

and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 18(2): 561-569.

(57) De Visscher, J. G. A. M., Van Der Waal, I., 1998. Etiology of cancer of the lip: A review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 27(3): 199-203.

(58) Hasson, O., 2008. Squamous Cell Carcinoma of the Lower Lip. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 66(6): 1259-1262.

(59) Vajdic, C. M., McDonald, S. P., McCredie, M. R. E., Van Leeuwen, M. T., Stewart, J. H., Law, M., Chapman, J. R., Webster, A. C., Kaldor, J. M., Grulich, A. E., 2006. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *Journal of the American Medical Association* 296(23): 2823-2831.

(60) Mäkitie, A. A., Lundberg, M., Salmela, K., Kyllönen, L., Pukkala, E., 2008. Head and neck cancer in renal transplant patients in Finland. *Acta Oto-Laryngologica* 128(11): 1255-1258.

(61) Lindelöf, B., Sigurgeirsson, B., Gäbel, H., Stern, R. S., 2000. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *British Journal of Dermatology* 143(3): 513-519.

(62) Penn, I. 1994. Malignancy. *Surgical Clinics of North America* 74(5): 1247-1257.

(63) King, G. N., Healy, C. M., Glover, M. T., Kwan, J. T. C., Williams, D. M., Leigh, I. M., Worthington, H. V., Thornhill, M. H., 1995. Increased prevalence of dysplastic and malignant lip lesions in renal- transplant recipients. *New England Journal of Medicine* 332(16): 1052-1057.~

(64) Van Zuuren, E. J., De Visscher, J. G. A. M., Bavinck, J. N. B., 1998. Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 38(3): 497-499.

(65) Bagatin, M., Orihovac, Z., Mohammed, A. M., 1995. Perineural invasion by carcinoma of the lower lip. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 23(3): 155-159.

(66) Tan, H., Ye, K., Wang, Z., Tang, H., 2008. CD147 expression as a significant prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma. *Translational Research* 152(3): 143-149.

(67) Granovsky, A. E., Rosner M. R., 2008. Raf kinase inhibitory protein: A signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Research* 18(4): 452-457.

(68) Bernier, I., Jolles P., 1984. Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 790(2): 174-181.

(69) Bernier, I., Tresca, J. P., Jolles, P., 1986. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 871(1): 19-23.

- (70) Shemon, A. N., Heil, G. L., Granovsky, A. E., Clark, M. M., McElheny, D., Chimon, A., Rosner, M. R., Koide, S., 2010. Characterization of the Raf kinase inhibitory protein (RKIP) binding pocket: NMR-based screening identifies small-molecule ligands. *PLoS ONE* 5(5).
- (71) Frayne, J., McMillen, A., Love, S., Hall, L., 1998. Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: Immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides. *Molecular Reproduction and Development* 49(4): 454-460.
- (72) Frayne, J., Ingram, C., Love, S., Hall, L., 1999. Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat. *Cell and Tissue Research* 298(3): 415-423.
- (73) Ruan, L., Wang, G. L., Yi, H., Chen, Y., Tang, C. E., Zhang, P. F., Li, M. Y., Li, C., Peng, F., Li, J. N., Chen, Z. C., Xiao, Z. Q., 2010. Raf kinase inhibitor protein correlates with sensitivity of nasopharyngeal carcinoma to radiotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 110(4): 975-984.
- (74) Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D., Monard, D., 2001. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 276(1): 535-540.
- (75) Klysik, J., Theroux, S. J., Sedivy, J. M., Moffit, J. S., Boekelheide, K., 2008. Signaling crossroads: The function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cellular Signalling* 20(1): 1-9.
- (76) Lin, K., Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Bevelacqua, Y., Bonavida, B., 2010. 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 and Cancer* 1(5): 409-420.
- (77) Dhillon, A. S., Kolch W., 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 404(1): 3-9.
- (78) Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(11): 875-885.
- (79) Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3(1): 11-22.
- (80) O'Neill, E., Kolch W., 2004. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *British Journal of Cancer* 90(2): 283-288.
- (81) Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., Fu, H., 2001. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 7783-7788.

- (82) Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmleri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W. C., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M. R., Futreal, P. A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892): 949-954.
- (83) Garnett, M. J., Marais, R., 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6(4): 313-319.
- (84) Mercer, K. E., Pritchard, C. A., 2003. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1653(1): 25-40.
- (85) Libra, M., E. Torrisi, E., 2009. BRAF and RKIP aberrations in actinic keratosis and non-melanoma skin cancers. *Cell Cycle* 8(9): 1305.
- (86) Libra, M., Malaponte, G., Bevelacqua, V., Siciliano, R., Castrogiovanni, P., Fulvi, A., Micali, G., Ligresti, G., Mazzarino, M. C., Stivala, F., Travali, S., McCubrey, J. A., 2006. Absence of BRAF gene mutation in non-melanoma skin tumors. *Cell Cycle* 5(9): 968-970.
- (87) Zaravinos, A., Bizakis, J., Spandidos, D. A., 2008. RKIP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae. *Cancer Letters* 264(2): 288-298.
- (88) Zebisch, A., Troppmair J., 2006. Back to the roots: The remarkable RAF oncogene story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(11): 1314-1330.
- (89) Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C. J., Marais, R., 2004. V599EB-RAF is an Oncogene in Melanocytes. *Cancer Research* 64(7): 2338-2342.
- (90) Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., Marais, R., 2005. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Research* 65(21): 9719-9726.
- (91) Zebisch, A., Staber, P. B., Delavar, A., Bodner, C., Hiden, K., Fischereder, K., Janakiraman, M., Linkesch, W., Auner, H. W., Emberger, W., Windpassinger, C., Schimek, M. G., Hoefler, G., Troppmair, J., Sill, H., 2006. Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Research* 66(7): 3401-3408.
- (92) Mhaweche-Fauceglia, P., Fischer, G., Beck, A., Cheney, R. T., Herrmann, F. R., 2006. Raf1, Aurora-A/STK15 and E-cadherin biomarkers expression in patients with

pTa/pT1 urothelial bladder carcinoma; a retrospective TMA study of 246 patients with long-term follow-up. *European Journal of Surgical Oncology* 32(4): 439-444. O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., Kolch, W., 2004. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306(5705): 2267-2270.

(93) O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., Kolch, W., 2004. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306(5705): 2267-2270.

(94) Rapp, U. R., Fensterle, J., Albert, S., Götz, R., 2003. Raf kinases in lung tumor development. 43: 183-195.

(95) Schmidt, C. A., Oettle, H., Ludwig, W. D., Serke, S., Pawlaczyk-Peter, B., Wilborn, F., Binder, L. T., Huhn, D., Siegert, W., 1994. Overexpression of the Raf-1 proto-oncogene in human myeloid leukemia. *Leukemia Research* 18(6): 409-413.

(96) Riva, C., Lavieille, J. P., Reyt, E., Brambilla, E., Lunardi, J., Brambilla, C., 1995. Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: Implication in drug and radioresistance. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 31(6): 384-391.

(97) Hwang, Y. H., Choi, J. Y., Kim, S., Chung, E. S., Kim, T., Koh, S. S., Lee, B., Bae, S. H., Kim, J., Park, Y. M., 2004. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research* 29(2): 113-121.

(98) Mukherjee, R., Bartlett, J. M. S., Krishna, N. S., Underwood, M. A., Edwards, J., 2005. Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate* 64(1): 101-107.

(99) Damodar Reddy, C., Marwaha, S., Patti, R., Raghunath, M., Duhaime, A. C., Sutton, L., Phillips, P. C., 2001. Role of MAP kinase pathways in primitive neuroectodermal tumors. *Anticancer Research* 21(4 A): 2733-2738.

(100) Avruch, J., Zhang, X. F., Kyrilakis, J. M., 1994. Raf meets ras: Completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 19(7): 279-283.

(101) Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P., Rapp, U. R., 1991. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 349(6308): 426-428.

(102) Weinstein-Oppenheim, C. R., Blalock, W. L., Steelman, L. S., Chang, F., McCubrey, J. A., 2000. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacology and Therapeutics* 88(3): 229-279.

(103) Lyons, J. F., Wilhelm, S., Hibner, B., Bollag, G., 2001. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine-Related Cancer* 8(3): 219-225.

- (104)** Grana, T. M., Rusyn, E. V., Zhou, H., Sartor, C. I., Cox, A. D., 2002. Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways. *Cancer Research* 62(14): 4142-4150.
- (105)** Kolch, W., Kotwaliwale, A., Vass, K., Janosch, P., 2002. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert reviews in molecular medicine* 4(8): 1-18.
- (106)** McFarlin, D. R., Lindstrom, M. J., Gould, M. N., 2003. Affinity with Raf is sufficient for Ras to efficiently induce rat mammary carcinomas. *Carcinogenesis* 24(1): 99-105.
- (107)** Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, L. E., Bollag, G., Trail, P. A., 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research* 64(19): 7099-7109.
- (108)** McPhillips, F., Mullen, P., MacLeod, K. G., Sewell, J. M., Monia, B. P., Cameron, D. A., Smyth, J. F., Langdon, S. P., 2006. Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 27(4): 729-739.
- (109)** Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J. A., Bastian, B. C., Springer, C., Marais, R., 2006. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Research* 66(19): 9483-9491.
- (110)** Porter, A. C., Vaillancourt, R. R., 1998. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17 (11 REV. ISS. 1): 1343-1352.
- (111)** Herrera, R., Sebolt-Leopold J. S., 2002. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends in Molecular Medicine* 8(4 SUPPL.).
- (112)** Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Project, C. G., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R., 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116(6): 855-867.
- (113)** Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E., Kolch, W., 2006. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Molecular and Cellular Biology* 26(6): 2262-2272.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., Tzivion, G.,

2007. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773(8): 1196-1212.
- (114)** Goel, R., Baldassare, J. J., 2004. Killing two birds with one RKIP. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(3): 91-92.
- (115)** Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M., Rosner, M. R., 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *Journal of Biological Chemistry* 278(15): 13061-13068.
- (116)** Kim, H. S., Kim, G. Y., Lim, S. J., Kim, Y. W., 2010. Raf-1 kinase inhibitory protein expression in thyroid carcinomas. *Endocrine Pathology* 21(4): 253-257.
- (117)** Eves, E. M., Shapiro, P., Naik, K., Klein, UlfR, Trakul, N., Rosner, M., 2006. Raf Kinase Inhibitory Protein Regulates Aurora B Kinase and the Spindle Checkpoint. *Molecular Cell* 23(4): 561-574.
- (118)** Al-Mulla, F., Hagan, S., Al-Ali, W., Jacob, S. P., Behbehani, A. I., Bitar, M. S., Dallah, A., Kolch, W., 2008. Raf kinase inhibitor protein: Mechanism of loss of expression and association with genomic instability. *Journal of Clinical Pathology* 61(4): 524-529.
- (119)** Lee, H. C., Tian, B., Sedivy, J. M., Wands, J. R., Kim, M., 2006. Loss of Raf Kinase Inhibitor Protein Promotes Cell Proliferation and Migration of Human Hepatoma Cells. *Gastroenterology* 131(4): 1208-1217.
- (120)** Park, S., Rath, O., Beach, S., Xiang, X., Kelly, S. M., Luo, Z., Kolch, W., Yeung, K. C., 2006. Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Letters* 580(27): 6405-6412.
- (121)** Schuierer, M. M., Bataille, F., Hagan, S., Kolch, W., Bosserhoff, A. K., 2004. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer Research* 64(15): 5186-5192.
- (122)** Park, S., Yeung, M. L., Beach, S., Shields, J. M., Yeung, K. C., 2005. RKIP down-regulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 24(21): 3535-3540.
- (123)** Chatterjee, D., Bai, Y., Wang, Z., Beach, S., Mott, S., Roy, R., Braastad, C., Sun, Y., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B. B., Darnowski, J., Pantazis, P., Wyche, J., Fu, Z., Kitagawa, Y., Keller, E. T., Sedivy, J. M., Yeung, K. C., 2004. RKIP Sensitizes Prostate and Breast Cancer Cells to Drug-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279(17): 17515-17523.
- (124)** Fu, Z., Kitagawa, Y., Shen, R., Shah, R., Mehra, R., Rhodes, D., Keller, P. J., Mizokami, A., Dunn, R., Chinnaiyan, A. M., Yao, Z., Keller, E. T., 2006. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66(3): 248-256.

- (125)** Minoo, P., Zlobec, I., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J. R., Lugli, A., 2007. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 127(5): 820-827.
- (126)** Zlobec, I., Baker, K., Minoo, P., Jass, J. R., Terracciano, L., Lugli, A., 2008. Node-negative colorectal cancer at high risk of distant metastasis identified by combined analysis of lymph node status, vascular invasion, and Raf-1 kinase inhibitor protein expression. *Clinical Cancer Research* 14(1): 143-148.
- (127)** Schuierer, M. M., Bataille, F., Weiss, T. S., Hellerbrand, C., Bosserhoff, A. K., 2006. Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*. 16(3): 451-456.
- (128)** Chen, Y., Ouyang, G. L., Yi, H., Li, M. Y., Zhang, P. F., Li, C., Li, J. L., Liu, Y. F., Chen, Z. C., Xiao, Z. Q., 2008. Identification of RKIP as an invasion suppressor protein in nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* 7(12): 5254-5262.
- (129)** Akaishi, J., Onda, M., Asaka, S., Okamoto, J., Miyamoto, S., Nagahama, M., Ito, K., Kawanami, O., Shimizu, K., 2006. Growth-suppressive function of phosphatidylethanolamine-binding protein in anaplastic thyroid cancer. *Anticancer Research* 26(6 B): 4437-4442.
- (130)** Kim, H. S., Kim, G. Y., Lim, S. J., Kim, Y. W., 2010. Reduced expression of Raf-1 kinase inhibitory protein is a significant prognostic marker in patients with gallbladder carcinoma. *Human Pathology* 41(11): 1609-1616.
- (131)** Zhang, L., Fu, Z., Binkley, C., Giordano, T., Burant, C. F., Logsdon, C. D., Simeone, D. M., 2004. Raf kinase inhibitory protein inhibits β -cell proliferation. *Surgery* 136(3): 708-715.
- (132)** Dangi-Garimella, S., Yun, J., Eves, E. M., Newman, M., Erkeland, S. J., Hammond, S. M., Minn, A. J., Rosner, M. R., 2009. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO Journal* 28(4): 347-358.
- (133)** Hong, Z. L., Gao, Y., Xiu, L. Z., Yi, X. L., Bao, C. S., Yang, J., Yao, Z., 2009. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human breast cancer. *Molecular Cancer Research* 7(6): 832-840.
- (134)** Shevde, L. A., Welch, D. R., 2003. Metastasis suppressor pathways - An evolving paradigm. *Cancer Letters* 198(1): 1-20.
- (135)** Chatterjee, D., Sabo, E., Rosemarie, T., Resnick, M. B., 2008. Inverse association between raf kinase inhibitory protein and signal transducers and activators of transcription 3 expression in gastric adenocarcinoma patients: Implications for clinical outcome. *Clinical Cancer Research* 14(10): 2994-3001.

- (136) Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., Bonavida, B., 2004. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, BCL-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab. *Cancer Research* 64(19): 7117-7126.
- (137) Ojika, K., Appel, S. H., 1984. Neurotrophic effects of hippocampal extracts on medial septal nucleus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(8 I): 2567-2571.
- (138) Nixon, B., MacIntyre, D. A., Mitchell, L. A., Gibbs, G. M., O'Bryan, M., Aitken, R. J., 2006. The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biology of Reproduction* 74(2): 275-287.
- (139) Houben, R., Ortmann, S., Schrama, D., Herold, M. J., Berberich, I., Reichardt, H. M., Becker, J. C., 2007. Activation of the MAP kinase pathway induces apoptosis in the merkel cell carcinoma cell line UI50. *Journal of Investigative Dermatology* 127(9): 2116-2122.
- (140) Goumon, Y., Angelone, T., Schoentgen, F., Chasserot-Golaz, S., Almas, B., Fukami, M. M., Langley, K., Welters, I. D., Tota, B., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H., 2004. The Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide, the N-terminal Fragment of the Secreted Phosphatidylethanolamine-binding Protein, Possesses a New Biological Activity on Cardiac Physiology. *Journal of Biological Chemistry* 279(13): 13054-13064.
- (141) Dacheux, J. L., Belghazi, M., Lanson, Y., Dacheux, F., 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250(1-2): 36-42.
- (142) Beach, S., Tang, H., Park, S., Dhillon, A. S., Keller, E. T., Kolch, W., Yeung, K. C., 2008. Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene* 27(15): 2243-2248.
- (143) Shaw, A. T., Meissner, A., Dowdle, J. A., Crowley, D., Magendantz, M., Ouyang, C., Parisi, T., Rajagopal, J., Blank, L. J., Bronson, R. T., Stone, J. R., Tuveson, D. A., Jaenisch, R., Jacks, T., 2008. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes and Development* 22(2): 277.
- (144) Biswas, C., 1982. Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 109(3): 1026-1034.
- (145) Biswas, C., 1984. Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Letters* 24(2): 201-207.
- (146) Biswas, C. Nugent, M. A., 1987. Membrane association of collagenase stimulatory factor(s) from B-16 melanoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 35(3): 247-258.
- (147) Altruda, F., Cervella, P., Gaeta, M. L., Daniele, A., Giancotti, F., Tarone, G., Stefano, G., Silengo, L., 1989. Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein

(gp42): Shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene* 85(2): 445-451.

(148) Miyauchi, T., Masuzawa, Y., Muramatsu, T., 1991. 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. *Journal of Biochemistry* 110(5): 770-774.

(149) Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., Nabeshima, K., 1995. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Research* 55(2): 434-439.

(150) Muramatsu, T., Miyauchi, T., 2003. Basigin (CD147): A multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histology and Histopathology* 18(3): 981-987.

(151) Hakomori, S. I., 1996. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Research* 56(23): 5309-5318.

(152) Sun, J., Hemler, M. E., 2001. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Research* 61(5): 2276-2281.

(153) Tang, W., Chang, S. B., Hemler, M. E., 2004. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Molecular Biology of the Cell* 15(9): 4043-4050.

(154) Yoshida, S., Shibata, M., Yamamoto, S., Hagihara, M., Asai, N., Takahashi, M., Mizutani, S., Muramatsu, T., Kadomatsu, K., 2000. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *European Journal of Biochemistry* 267(14): 4372-4380.

(155) Tang, Y., Kesavan, P., Nakada, M. T., Yan, L., 2004. Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN. *Molecular Cancer Research* 2(2): 73-80.

(156) Tang, Y., Nakada, M. T., Kesavan, P., McCabe, F., Millar, H., Rafferty, P., Bugelski, P., Yan, L., 2005. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Research* 65(8): 3193-3199.

(157) Koch, C., Staffler, G., Hüttinger, R., Hilgert, I., Prager, E., Černý, J., Steinlein, P., Majdic, O., Hořejší, V., Stockinger, H., 1999. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *International Immunology* 11(5): 777-786.

- (158) DeCastro, R., Zhang, Y., Guo, H., Kataoka, H., Gordon, M. K., Toole, B. P., Biswas, C., 1996. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Journal of Investigative Dermatology* 106(6): 1260-1265.
- (159) Gabison, E. E., Mourah, S., Steinfelds, E., Yan, L., Hoang-Xuan, T., Watsky, M. A., De Wever, B., Calvo, F., Mauviel, A., Menashi, S., 2005. Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: Role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction. *American Journal of Pathology* 166(1): 209-219.
- (160) Kasinrerk, W., Fiebiger, E., Stefanova, I., Baumruker, T., Knapp, W., Stockinger, H., 1992. 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. *Journal of Immunology* 149(3): 847-854.
- (161) Kirsch, A. H., Diaz Jr, L. A., Bonish, B., Antony, P. A., Fox, D. A., 1997. The pattern of expression of CD147/neurothelin during human T-cell, ontogeny as defined by the monoclonal antibody 8D6. *Tissue Antigens* 50(2): 147-152.
- (162) Klein, C. A., Seidl, S., Petat-Dutter, K., Offner, S., Geigl, J. B., Schmidt-Kittler, O., Wendler, N., Passlick, B., Huber, R. M., Schlimok, G., Baeuerle, P. A., Riethmüller, G., 2002. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nature Biotechnology* 20(4): 387-392.
- (163) Si, A. I. C., Huang, L., Xu, J., Kumta, S. M., Wood, D., Zheng, M. H., 2003. Expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in giant cell tumor of bone. *Journal of Cellular Biochemistry* 89(6): 1154-1163.
- (164) Gallagher, S. M., Castorino, J. J., Wang, D., Philp, N. J., 2007. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Research* 67(9): 4182-4189.
- (165) Su, J., Chen, X., Kanekura, T., 2009. A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Letters* 273(1): 140-147.
- (166) Yang, J. M., Xu, Z., Wu, H., Zhu, H., Wu, X., Hait, W. N., 2003. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Molecular Cancer Research* 1(6): 420-427.
- (167) Li, Q. Q., Wang, W. J., Xu, J. D., Cao, X. X., Chen, Q., Yang, J. M., Xu, Z. D., 2007. Involvement of CD147 in regulation of multidrug resistance to P-gp substrate drugs and in vitro invasion in breast cancer cells. *Cancer Science* 98(7): 1064-1069.
- (168) Wang, W. J., Li, Q. Q., Xu, J. D., Cao, X. X., Li, H. X., Tang, F., Chen, Q., Yang, J. M., Xu, Z. D., Liu, X. P., 2008. Interaction between CD147 and P-glycoprotein and their regulation by ubiquitination in breast cancer cells. *Chemotherapy* 54(4): 291-301.

- (169) Kuang, Y. H., Chen, X., Su, J., Wu, L. S., Li, J., Chang, J., Qiu, Y., Chen, Z. S., Kanekura, T., 2008. Proteome analysis of multidrug resistance of human oral squamous carcinoma cells using CD147 silencing. *Journal of Proteome Research* 7(11): 4784-4791.
- (170) Major, T. C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W., Bocan, T. M. A., 2002. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22(7): 1200-1207.
- (171) Siwik, D. A., Kuster, G. M., Brahmabhatt, J. V., Zaidi, Z., Malik, J., Ooi, H., Ghorayeb, G., 2008. EMMPRIN mediates β -adrenergic receptor-stimulated matrix metalloproteinase activity in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44(1): 210-217.
- (172) Stewart, C. J. R., Crook, M. L., 2011. CD147 (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase-2 expression in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Pathology Research and Practice* 207(1): 30-36.
- (173) Naruhashi, K., Kadomatsu, K., Igakura, T., Fan, Q. W., Kuno, N., Muramatsu, H., Miyauchi, T., Hasegawa, T., Itoh, A., Muramatsu, T., Nabeshima, T., 1997. Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236(3): 733-737.
- (174) Zhou, S., Zhou, H., Walian, P. J., Jap, B. K., 2006. The discovery and role of CD147 as a subunit of γ -secretase complex. *Drug News and Perspectives* 19(3): 133-138.
- (175) Schmidt, R., Redecke, V., Breitfeld, Y., Wantia, N., Miethke, T., Massberg, S., Fischel, S., Neuman, F. J., Schömig, A., May, A. E., 2006. EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes. Implications for plaque rupture. *Thrombosis and Haemostasis* 95(1): 151-158.
- (176) Zucker, S., Hymowitz, M., Rollo, E. E., Mann, R., Conner, C. E., Cao, J., Foda, H. D., Tompkins, D. C., Toole, B. P., 2001. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *American Journal of Pathology* 158(6): 1921-1928.
- (177) Li, Q. Q., Wang, W. J., Xu, J. D., Cao, X. X., Chen, Q., Yang, J. M., Xu, Z. D., 2007. Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer Science* 98(11): 1767-1774.
- (178) John, A. Tuszynski, G., 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathology and Oncology Research* 7(1): 14-23.
- (179) Stamenkovic, I., 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 10(6): 415-433.
- (180) Vihinen, P., Kähäri, V. M., 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *International Journal of Cancer* 99(2): 157-166.

- (181)** Yan, L., Zucker, S., Toole, B. P., 2005. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thrombosis and Haemostasis* 93(2): 199-204.
- (182)** Lim, M., Martinez, T., Jablons, D., Cameron, R., Guo, H., Toole, B., Li, J. D., Basbaum, C., 1998. Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Letters* 441(1): 88-92.
- (183)** Noël, A., Jost, M., Maquoi, E., 2008. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19(1): 52-60.
- (184)** Huet, E., Gabison, E. E., Mourah, S., Menashi, S., 2008. Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. *Connective Tissue Research* 49(3-4): 175-179.
- (185)** Schmidt, R., Bültmann, A., Fischel, S., Gillitzer, A., Cullen, P., Walch, A., Jost, P., Ungerer, M., Tolley, N. D., Lindemann, S., Gawaz, M., Schömig, A., May, A. E., 2008. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor κ B-dependent inflammation in monocytes. *Circulation Research* 102(3): 302-309.
- (186)** Kanekura, T., Chen, X., 2010. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *Journal of Dermatological Science* 57(3): 149-154.
- (187)** Cao, Z., Xiang, J., Li, C., 2009. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase-1 in tongue squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 38(8): 880-885.
- (188)** Egeblad, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2(3): 161-174.
- (189)** Noguchi, Y., Sato, T., Hirata, M., Hara, T., Ohama, K., Ito, A., 2003. Identification and Characterization of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer in Human Endometrium during the Menstrual Cycle in Vivo and in Vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(12): 6063-6072.
- (190)** McCawley, L. J., Matrisian, L. M., 2001. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 13(5): 534-540.
- (191)** Erdem, N. F., Carlson, E. R., Gerard, D. A., Ichiki, A. T., 2007. Characterization of 3 Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines With Different Invasion and/or Metastatic Potentials. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 65(9): 1725-1733.
- (192)** Werb, Z., 1997. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* 91(4): 439-442.
- (193)** D'Angelo, M., Sarment, D. P., Billings, P. C., Pacifici, M., 2001. Activation of transforming growth factor β in chondrocytes undergoing endochondral ossification. *Journal of Bone and Mineral Research* 16(12): 2339-2347.

- (194) Karsdal, M. A., Larsen, L., Engsig, M. T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaissé, J. M., Foged, N. T., 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor- β controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 277(46): 44061-44067.
- (195) Ziober, B. L., Turner, M. A., Palefsky, J. M., Banda, M. J., Kramer, R. H., 2000. Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 36(4): 365-372.
- (196) Howe, J. R., Roth, S., Ringold, J. C., Summers, R. W., Järvinen, H. J., Sistonen, P., Tomlinson, I. P. M., Houlston, R. S., Bevan, S., Mitros, F. A., Stone, E. M., Aaltonen, L. A., 1998. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280(5366): 1086-1088.
- (197) Hsieh, C. J., Klump, B., Holzmann, K., Borchard, F., Gregor, M., Porschen, R., 1998. Hypermethylation of the p16(INK4a) promoter in colectomy specimens of patients with long-standing and extensive ulcerative colitis. *Cancer Research* 58(17): 3942-3945.
- (198) Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B. P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., Koono, M., Wakisaka, S., 2000. Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Letters* 157(2): 177-184.
- (199) Ishikawa, S., Takenaka, K., Yanagihara, K., Miyahara, R., Kawano, Y., Otake, Y., Hasegawa, S., Wada, H., Tanaka, F., 2004. Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 10(19): 6579-6585.
- (200) Pasieka, Z., Stepień, H., Czyż, W., Pomorski, L., Kuzdak, K., 2004. Concentration of metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in the serum of patients with benign and malignant thyroid tumours treated surgically. *Endocrine Regulations* 38(2): 57-63.
- (201) Morgia, G., Falsaperla, M., Malaponte, G., Madonia, M., Indelicato, M., Travali, S., Mazzarino, M. C., 2005. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urological Research* 33(1): 44-50.
- (202) Redondo, P., Lloret, P., Idoate, M., Inogest, S., 2005. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clinical and Experimental Dermatology* 30(5): 541-545.
- (203) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M., 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370(6484): 61-65.

- (204)** Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T., 2003. Regulation of matrix metalloproteinases. An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253(1-2): 269-285.
- (205)** Mira, E., Lacalle, R. A., Buesa, J. M., González de Buitrago, G., Jiménez-Baranda, S., Gómez-Moutón, C., Martínez-A, C., Mañes, S., 2004. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *Journal of Cell Science* 117(9): 1847-1856.
- (206)** Davies, B., Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D., Balkwill, F. R., 1993. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *British Journal of Cancer* 67(5): 1126-1131.
- (207)** Miyajima, Y., Nakano, R., Morimatsu, M., 1995. Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 104(9 I): 678-684.
- (208)** Väisänen, A., Tuominen, H., Kallioinen, M., Turpeenniemi-Hujanen, T., 1996). Matrix metalloproteinase-2 (72 kd type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *Journal of Pathology* 180(3): 283-289.
- (209)** Ishibashi, Y., Matsumoto, T., Niwa, M., Suzuki, Y., Omura, N., Hanyu, N., Nakada, K., Yanaga, K., Yamada, K., Ohkawa, K., Kawakami, M., Urashima, M., 2004. CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 101(9): 1994-2000.
- (210)** Iurlaro, M., Loverro, G., Vacca, A., Cormio, G., Ribatti, O., Minischetti, M., Ria, R., Bruno, M., Selvaggi, L., 1999. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *European Journal of Clinical Investigation* 29(9): 793-801.
- (211)** Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G., Moses, M. A., 2000. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(8): 3884-3889.
- (212)** Charous, S. J., Stricklin, G. P., Netterville, J. L., Nanney, L. B., Burkey, B. B., 1997. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 106(4): 271-278.
- (213)** Oda, N., Abe, M., Sato, Y., 1999. ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin $\beta 3$. *Journal of Cellular Physiology* 178(2): 121-132.

- (214)** Davidson, B., Givant-Horwitz, V., Lazarovici, P., Risberg, B., Nesland, J. M., Trope, C. G., Schaefer, E., Reich, R., 2003. Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): Co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 20(7): 621-631.
- (215)** Jin, J. S., Hsieh, D. S., Lin, Y. F., Wang, J. Y., Sheu, L. F., Lee, W. H., 2006. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: Tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *International Journal of Urology* 13(5): 573-580.
- (216)** Adams, J. C., 2004. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Current Opinion in Cell Biology* 16(5): 590-596.
- (217)** Gatenby, R. A., Gillies, R. J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4(11): 891-899.
- (218)** Gatenby, R. A., Gillies, R. J., 2007. Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(7-8): 1358-1366.
- (219)** Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B., Gillies, R. J., 2006. Acid-mediated tumor invasion: A multidisciplinary study. *Cancer Research* 66(10): 5216-5223.
- (220)** Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K., Galappathi, K., 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Research* 66(13): 6699-6707.
- (221)** Fantin, V. R., St-Pierre, J., Leder, P., 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9(6): 425-434.
- (222)** Beckner, M. E., Stracke, M. L., Liotta, L. A., Schiffmann, E., 1990. Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis. *Journal of the National Cancer Institute* 82(23): 1836-1840.
- (223)** Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., Jain, R. K., 2001. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Research* 61(16): 6020-6024.
- (224)** Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Ise, T., Murakami, T., Yoshida, T., Nomoto, M., Kohno, K., 2003. Cellular pH regulators: Potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 29(6): 541-549.
- (225)** Halestrap, A. P., Price, N. T., 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: Structure, function and regulation. *Biochemical Journal* 343(2): 281-299.

- (226) Kirk, P., Wilson, M. C., Heddle, C., Brown, M. H., Barclay, A. N., Halestrap, A. P., 2000. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO Journal* 19(15): 3896-3904.
- (227) Mathupala, S. P., Parajuli, P., Sloan, A. E., 2004. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: An in vitro study." *Neurosurgery* 55(6): 1410-1419.
- (228) Baba, M., Inoue, M., Itoh, K., Nishizawa, Y., 2008. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374(1): 111-116.
- (229) Wahl, M. L., Owen, J. A., Burd, R., Herlands, R. A., Nogami, S. S., Rodeck, U., Berd, D., Leeper, D. B., Owen, C. S., 2002. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics* 1(8): 617-628.
- (230) Coss, R. A., Storck, C. W., Daskalakis, C., Berd, D., Wahl, M. L., 2003. Intracellular acidification abrogates the heat shock response and compromises survival of human melanoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 2(4): 383-388.
- (231) Fang, J., Quinones, Q. J., Holman, T. L., Morowitz, M. J., Wang, Q., Zhao, H., Sivo, F., Maris, J. M., Wahl, M. L., 2006. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): A potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma." *Molecular Pharmacology* 70(6): 2108-2115.
- (232) Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Scapulatempo, C., Ferreira, L., Martins, S., Pellerin, L., Rodrigues, M., Alves, V. A. F., Schmitt, F., Baltazar, F., 2008. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv* 452(2): 139-146.
- (233) Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L., Sivridis, E., 2006. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: A metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Research* 66(2): 632-637.
- (234) Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Bougioukas, G., Sivridis, E., 2007. Lung cancer: A comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. *Cancer Biology and Therapy* 6(9): 1476-1479.
- (235) Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Simões, K., Jacob, C. E., Bresciani, C. J. C., Zilberstein, B., Cecconello, I., Alves, V. A. F., Schmitt, F., Baltazar, F., 2009. The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *European Journal of Cancer* 45(13): 2418-2424.
- (236) Fisher, G., Gilbertson-Beadling, S., Powers, E. A., Petzold, G., Poorman, R., Mitchell, M. A., 1994. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Developmental Biology* 162(2): 499-510.

- (237) Moscatelli, D., Rifkin, D. B., 1988. Membrane and matrix localization of proteinases: A common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 948(1): 67-85.
- (238) Jia, L., Cao, J., Wei, W., Wang, S., Zuo, Y., Zhang, J., 2007. CD147 depletion down-regulates matrix metalloproteinase-11, vascular endothelial growth factor-A expression and the lymphatic metastasis potential of murine hepatocarcinoma Hca-F cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(11): 2135-2142.
- (239) Zhou, Q., Zhu, Y., Deng, Z., Long, H., Zhang, S., Chen, X., 2011. VEGF and EMMPRIN expression correlates with survival of patients with osteosarcoma. *Surgical Oncology* 20(1): 13-19.
- (240) Rini, B. I., Rathmell, W. K., 2007. Biological aspects and binding strategies of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 13(2 II).
- (241) Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 9(SUPPL. 1): 2-10.
- (242) Willett, C. G., Boucher, Y., Di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., Mino, M., Cohen, K. S., Scadden, D. T., Hartford, A. C., Fischman, A. J., Clark, J. W., Ryan, D. P., Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Chen, H. X., Shellito, P. C., Lauwers, G. Y., Jain, R. K., 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine* 10(2): 145-147.
- (243) Robert Newman, J., Helman, E. E., Safavy, S., Zhang, W., Rosenthal, E. L., 2009. EMMPRIN expression is required for response to bevacizumab therapy in HNSCC xenografts. *Cancer Letters* 274(2): 313-318.
- (244) Voigt, H., Vetter-Kauczok, C. S., Schrama, D., Hofmann, U. B., Becker, J. C., Houben, R., 2009. CD147 impacts angiogenesis and metastasis formation. *Cancer Investigation* 27(3): 329-333.
- (245) Marieb, E. A., Zoltan-Jones, A., Li, R., Misra, S., Ghatak, S., Cao, J., Zucker, S., Toole, B. P., 2004. Emmprin Promotes Anchorage-Independent Growth in Human Mammary Carcinoma Cells by Stimulating Hyaluronan Production. *Cancer Research* 64(4): 1229-1232.
- (246) Misra, S., Ghatak, S., Toole, B. P., 2005. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *Journal of Biological Chemistry* 280(21): 20310-20315.
- (247) Yuan, W., Ge, H., He, B., 2010. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis* 213(2): 415-421.

- (248) Curtin, K. D., Meinertzhagen, I. A., Wyman, R. J., 2005. Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *Journal of Cell Science* 118(12): 2649-2660.
- (249) Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W. W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H. C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., Bukrinsky, M., 2002. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *Journal of Biological Chemistry* 277(25): 22959-22965.
- (250) Yang, H., Li, M., Chai, H., Yan, S., Lin, P., Lumsden, A. B., Yao, Q., Chen, C., 2005. Effects of cyclophilin A on cell proliferation and gene expressions in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Journal of Surgical Research* 123(2): 312-319.
- (251) Jin, Z. G., Melaragno, M. G., Liao, D. F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y. A., Lambeth, J. D., Berk, B. C., 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circulation Research* 87(9): 789-796.
- (252) Seko, Y., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., Nagai, R., 2004. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317(1): 162-168.
- (253) Doyle, V., Virji, S., Crompton, M., 1999. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochemical Journal* 341(1): 127-132.
- (254) Hong, F., Lee, J., Song, J. W., Lee, S. J., Ahn, H., Cho, J. J., Ha, J., Kim, S. S., 2002. Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(12): 1633-1635.
- (255) Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., Lisanti, M. P., 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing 'preassembled signaling complexes' at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 273(10): 5419-5422.
- (256) Anderson, R. G. W., 1998. The caveolae membrane system. 67: 199-225.
- (257) Tang, W., Hemler, M. E., 2004. "Caveolin-1 Regulates Matrix Metalloproteinases-1 Induction and CD147/EMMPRIN Cell Surface Clustering." *Journal of Biological Chemistry* 279(12): 11112-11118.
- (258) Engelman, J. A., Zhang, X. L., Lisanti, M. P., 1998. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Letters* 436(3): 403-410.
- (259) Han, S. E., Park, K. H., Lee, G., Huh, Y. J., Min, B. M., 2004. Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines. *International journal of oncology* 24(2): 435-440.

- (260)** Wiechen, K., Diatchenko, L., AgoulNIK, A., Scharff, K. M., Schober, H., Arlt, K., Zhumabayeva, B., Siebert, P. D., Dietel, M., Schäfer, R., Sers, C., 2001. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *American Journal of Pathology* 159(5): 1635-1643.
- (261)** Williams, T. M., Medina, F., Badano, I., Hazan, R. B., Hutchinson, J., Muller, W. J., Chopra, N. G., Scherer, P. E., Pestell, R. G., Lisanti, M. P., 2004. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo: Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 51630-51646.
- (262)** Sunaga, N., Miyajima, K., Suzuki, M., Sato, M., White, M. A., Ramirez, R. D., Shay, J. W., Gazdar, A. F., Minna, J. D., 2004. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Research* 64(12): 4277-4285.
- (263)** Sanchez-Carbayo, M., Socci, N. D., Charytonowicz, E., Lu, M., Prystowsky, M., Childs, G., Cordon-Cardo, C., 2002. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: Defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Research* 62(23): 6973-6980.
- (264)** Li, L., Yang, G., Ebara, S., Satoh, T., Nasu, Y., Timme, T. L., Ren, C., Wang, J., Tahir, S. A., Thompson, T. C., 2001. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Research* 61(11): 4386-4392.
- (265)** Kato, K., Hida, Y., Miyamoto, M., Hashida, H., Shinohara, T., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S., Katoh, H., 2002. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 94(4): 929-933.
- (266)** Du, Z. M., Hu, C. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Kou, C. W., Zhu, X. F., Zeng, Y. X., Shao, J. Y., 2009. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *International Journal of Cancer* 125(8): 1832-1841.
- (267)** Ellis, S. M., Nabeshima, K., Biswas, C., 1989. Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Research* 49(12): 3385-3391.
- (268)** Jiang, J. L., Zhou, Q., Yu, M. K., Ho, L. S., Chen, Z. N., Chan, H. C., 2001. The Involvement of HAb18G/CD147 in Regulation of Store-operated Calcium Entry and Metastasis of Human Hepatoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276(50): 46870-46877.

- (269) Muraoka, K., Nabeshima, K., Murayama, T., Biswas, C., Kono, M., 1993. Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: Its usefulness as a tumor marker for bladder cancer. *International Journal of Cancer* 55(1): 19-26.
- (270) Cheng, M. F., Tzao, C., Tsai, W. C., Lee, W. H., Chen, A., Chiang, H., Sheu, L. F., Jin, J. S., 2006. Expression of EMMPRIN and matrilysin in esophageal squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological parameters. *Diseases of the Esophagus* 19(6): 482-486.
- (271) Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Kristensen, G. B., Reich, R., 2003. EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 20(2): 161-169.
- (272) Li, W., Alfaidy, N., Challis, J. R. G., 2004. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(6): 2897-2904.
- (273) Nabeshima, K., Iwasaki, H., Nishio, J., Koga, K., Shishime, M., Kikuchi, M., 2006. Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: Emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential. *Anticancer Research* 26(2 B): 1359-1367.
- (274) Reimers, N., Zafrakas, K., Assmann, V., Egen, C., Riethdorf, L., Riethdorf, S., Berger, J., Ebel, S., Jänicke, F., Sauter, G., Pantel, K., 2004. Expression of extracellular matrix metalloproteinases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clinical Cancer Research* 10(10): 3422-3428.
- (275) Riethdorf, S., Reimers, N., Assmann, V., Kornfeld, J. W., Terracciano, L., Sauter, G., Pantel, K., 2006. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *International Journal of Cancer* 119(8): 1800-1810.
- (276) Zhang, Q., Chen, X., Zhou, J., Zhang, L., Zhao, Q., Chen, G., Xu, J., Qian, F., Chen, Z. N., 2006. CD147, MMP-2, MMP-9 and MVD-CD34 are significant predictors of recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Biology and Therapy* 5(7): 808-814.
- (277) Zheng, H. C., Takahashi, H., Murai, Y., Cui, Z. G., Nomoto, K., Miwa, S., Tsuneyama, K., Takano, Y., 2006. Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: A good marker for local invasion and prognosis. *British Journal of Cancer* 95(10): 1371-1378.
- (278) Dalberg, K., Eriksson, E., Enberg, U., Kjellman, M., Bäckdahl, M., 2000. Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: Correlation with invasive growth of breast cancer. *World Journal of Surgery* 24(3): 334-340.

- (279)** Mi, Z., Oliver, T., Guo, H., Gao, C., Kuo, P. C., 2007. Thrombin-cleaved COOH-terminal osteopontin peptide binds with cyclophilin C to CD147 in murine breast cancer cells. *Cancer Research* 67(9): 4088-4097.
- (280)** Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., Kikuchi, M., 2004. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. *Journal of Pathology* 202(3): 341-351.
- (281)** Ostwald, C., Gogacz, P., Hillmann, T., Schweder, J., Gundlach, K., Kundt, G., Barten, M., 2000. Expression of EMMPRIN (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *International Journal of Cancer* 88(1): 21-27.
- (282)** Xue, Y. J., Lu, Q., Sun, Z. X., 2010. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Medical Oncology*: 1-10.
- (283)** Dean, N. R., Newman, J. R., Helman, E. E., Zhang, W., Safavy, S., Weeks, D. M., Cunningham, M., Snyder, L. A., Tang, Y., Yan, L., McNally, L. R., Buchsbaum, D. J., Rosenthal, E. L., 2009. Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* 15(12): 4058-4065.
- (284)** Yang, J. M., O'Neill, P., Jin, W., Foty, R., Medina, D. J., Xu, Z., Lomas, M., Arndt, G. M., Tang, Y., Nakada, M., Yan, L., Hait, W. N., (2006). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) confers resistance of breast cancer cells to anoikis through inhibition of bim." *Journal of Biological Chemistry* 281(14): 9719-9727.
- (285)** Mohamed, A., Eric, H., Jean, D., Dominique, L., Suzanne, M., Isabelle, M., 2011. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) as a novel regulator of myogenic cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 226(1): 141-149.
- (286)** Chen, X., Kanekura, T., Kanzaki, T., 2001. Expression of Basigin in human fetal, infantile and adult skin and in basal cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 28(4): 184-190.
- (287)** Chen, X., Kanekura, T., Tsuyama, S., Murata, F., Kanzaki, T., 2001. Ultrastructural localization of basigin in normal human epidermis. *Histochemistry and Cell Biology* 115(6): 465-470.
- (288)** Kuno, N., Kadomatsu, K., Fan, Q. W., Hagihara, M., Senda, T., Mizutani, S., Muramatsu, T., 1998. Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Letters* 425(2): 191-194.
- (289)** Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B. P., Inoue, T., Yokogami, K., Nakano, S., Ohi, T., Wakisaka, S., 2003. Correlation of emmprin expression in vascular endothelial cells with blood-brain-barrier function: A study using magnetic resonance imaging en

hanced by Gd-DTPA and immunohistochemistry in brain tumors. *Virchows Archiv* 442(6): 577-584.

(290) Coste, I., Gauchat, J. F., Wilson, A., Izui, S., Jeannin, P., Delneste, Y., Robson MacDonald, H., Bonnefoy, J. Y., Renno, T., 2001. Unavailability of CD147 leads to selective erythrocyte trapping in the spleen. *Blood* 97(12): 3984-3988.

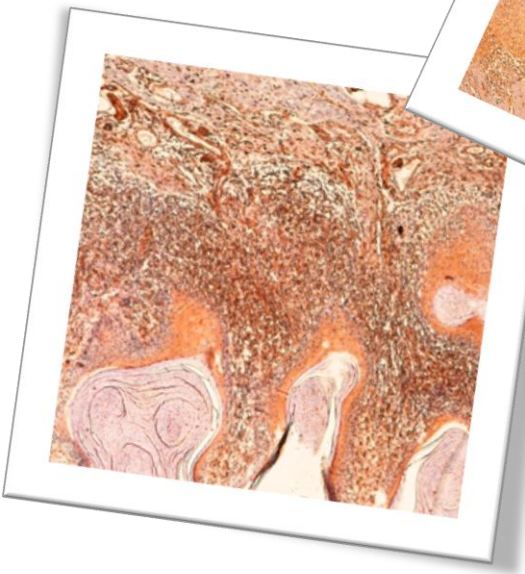
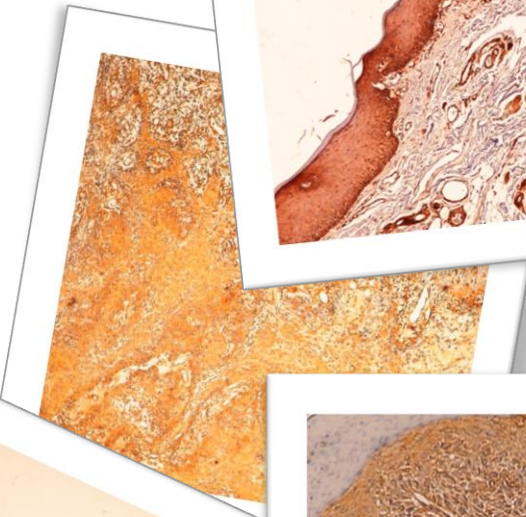
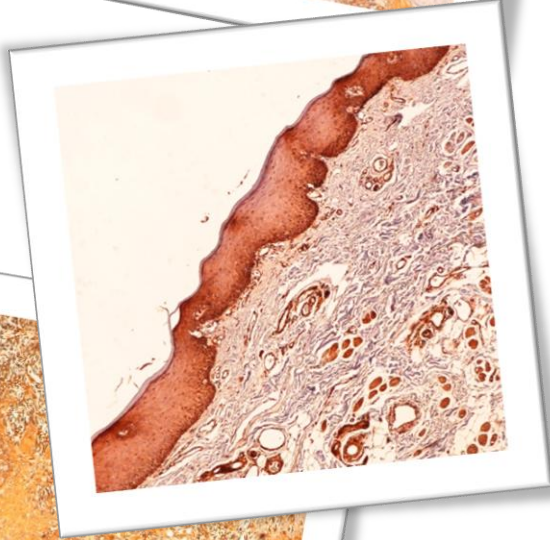
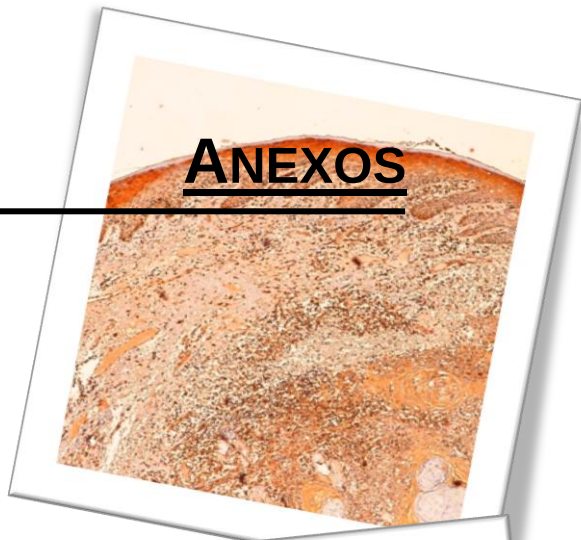
(291) De Visscher, J. G. A. M., Bouwes Bavinck, J. N., Van Der Waal, I., 1997. Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients: Report of six cases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 26(2): 120-123.

(292) Yang, L. X., Liu, H., Guo, R. W., Ye, J., Wang, X. M., Qi, F., Guo, C. M., Liang, X., 2010. Angiotensin II induces EMMPRIN expression in THP-1 macrophages via the NF- κ B pathway. *Regulatory Peptides* 163(1-3): 88-95.

(293) Greene, F.L., Page, D.L., Fleming, I.D., Fritz, A.G., Balch, C.M., Haller, D.G., Morrow, M., 2002. *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer Verlag.

(294) Pazdur, R., Coia, L. R., Hoskins, W. J., Wagman, L. D., *Cancer Management: A multidisciplinary approach; Medical, Surgical & Radiation Oncology*, 10th Edition, *Oncology* 4: 66-67.

ANEXOS



1. ESTADIAMENTO DO CARCINOMA DO LÁBIO

Tabela 12: Sistema de estadiamento TNM para o carcinoma do lábio (Adaptado de 295)

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser verificado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com ≤ 2 cm
T2	Tumor entre]2;4[cm
T3	Tumor com ≥ 4 cm
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Nódulos linfáticos regionais (N)	
Nx	Nódulos regionais não podem ser verificados
N0	Não existem metástases nodulares
N1	Metástase em apenas um nódulo ipsilateral com tamanho ≤ 3 cm
N2a	Metástase em apenas um nódulo ipsilateral com tamanho entre]3;6[cm
N2b	Metástases em múltiplos nódulos ipsilaterais, nenhum deles com tamanho superior a 6 cm
N2c	Metástases em nódulos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com tamanho superior a 6 cm
N3	Metástases em nódulos linfáticos com tamanho superior a 6 cm
Metástases à distância (M)	
Mx	Metástases à distância não podem ser verificadas
M0	Não existem metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Tabela 13: Agrupamento dos diferentes estádios do carcinoma do lábio (Adaptado de 295)

Estadiamento			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Estadio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estadio IV	T4	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

2. MATERIAIS

Encontram-se a baixo apresentadas listagens de todo o material utilizado durante o trabalho experimental realizado.

Lista 1. Lista dos aparelhos utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Aparelhos

Banho térmico	GFL
Desionizador	Landilab
Hotte	Mc6
Microondas	Taurus
Micropipetas (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Socorex
Microscópio Óptico	Nikon eclipse 50i
Máquina fotográfica incorporada	Nikon

Lista 2. Lista dos reagentes químicos utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Reagentes químicos

Álcool	Ága
BSA	Calbiochem
$C_6H_5Na_2O_7 \cdot 2H_2O$	Scharlau
Hematoxilína de Harris	Merck
HCl	Sigma
H_2O_2	Fluka
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
Metanol	Panreac
NaCl	Merck
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Merck
PBS	Sigma
Tween	Sigma
Xilol	Panreac

Lista 3. Lista dos anticorpos utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Anticorpos

Anticorpo anti-RKIP	Upstate
Anticorpo anti-CD147	Acris

Lista 4. Lista do material de suporte e armazenamento de tecidos e/ou lâminas utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Material de suporte e armazenamento

Câmara húmida	StainTray
Conjunto de tinas para coloração	EZ - Quick
Caixa de armazenamento de lâminas prontas	Simport
Lâminas	Marienfeld
Lamelas	Marienfeld

Lista 5. Lista dos kits utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Kits

Kit DAB (DAB+diluyente)	ScyTek Laboratories
Kit Streptavidina peróxidase (UV Block + Anticorpo 2º + Streptavidina peroxidase)	Thermo scientific

Lista 6. Lista do material de plástico durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Material de Plástico

Pipetas de Pasteur	VWR
Pontas (10 µL, 200 µL e 1000 µL)	VWR
Gobelés (1L)	VWR
Proveta (1L)	VWR

Lista 7. Lista de outros materiais utilizados durante a realização do trabalho experimental bem como da respectiva marca.

Outros materiais

Caneta hidrofóbica	Dako
Entellan	Merck
Óleo de emersão	Sigma

3. SOLUÇÕES TAMPÃO

Encontra-se abaixo apresentado o protocolo experimental para a preparação das soluções tampão usadas neste trabalho.

PBS 10x (1L)

Pesar os seguintes reagentes: 80g NaCl + 2g KCl + 2g KH_2PO_4 + 11,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Adicionar H_2O desionizada até perfazer o volume de 1L

pH = [7,2 ; 7,4]

Autoclavar a solução

PBS 1x + Tween

Diluir 1:10 a solução PBS 10x (100 ml de PBS 10x + 900 ml H_2O desionizada)

Adicionar 500 μL de Tween

Tampão citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Pesar 2,94g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Diluir o sólido em 800 ml de H_2O desionizada

Ajustar o pH = 6 com HCl

Perfazer 1L adicionando H_2O desionizada