



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

**CYNTIA HELENA PEREIRA DE CARVALHO**

**RELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA BMP-2, BMPR-IA E BMPR-II COM O  
PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO  
INFERIOR**

**Natal - RN**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CYNTIA HELENA PEREIRA DE CARVALHO

**RELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA BMP-2, BMPR-IA E BMPR-II COM O  
PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO  
INFERIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia Oral

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

**Natal – RN**

**2010**

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia  
Biblioteca Setorial de Odontologia “Prof<sup>o</sup> Alberto Moreira Campos”.

Carvalho, Cyntia Helena Pereira de Carvalho.

Relação da imunexpressão da bmp-2, bmpr-ia e bmpr-ii com o perfil clínico-patológico em carcinoma epidermóide de lábio inferior/  
Cyntia Helena Pereira de Carvalho. – Natal, RN, 2010.

105 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.

1. Carcinoma epidermóide de lábio inferior – Dissertação. 2. Proteínas morfogénicas do osso – Dissertação. 3. TNM – Dissertação. 4. Gradação Histológica – Dissertação. I. Pinto, Leão Pereira. II. Título.

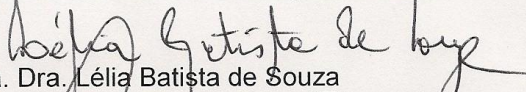
RN/UF/BSO

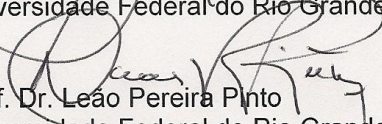
Black D66

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 24 de fevereiro de 2010, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. Cristina Ruan Ferreira de Araújo  
Universidade Federal de Campina Grande

  
Profa. Dra. Lélia Batista de Souza  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

  
Prof. Dr. Leão Pereira Pinto  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

**DEDICATÓRIA**

## DEDICATÓRIA

Primeiramente, a Deus, pois sem ele nada sou e nada consigo.

“Ao Deus Pai, que aos cansados Ele dá novas forças e enche de energia os fracos. No sofrimento eu fui consolada, porque a sua promessa me deu forças. Pois, o Eterno é bom; o seu amor dura para sempre e sua felicidade não tem fim (Is 40.29; Sl 119.50; Sl 100.5).”

À minha família, meus pais e meus irmãos, que sempre foram meu alicerce.

A meu marido, pelo amor, companheirismo e compreensão nas horas mais difíceis.

**AGRADECIMENTOS**



## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu Orientador, **Prof. Dr. Leão Pereira Pinto**, a quem tanto admiro e tenho como exemplo de vida. Agradeço pelos inúmeros ensinamentos, paciência e oportunidade de crescimento que o senhor me proporcionou. Sinto-me honrada por ser sua orientanda.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral**, pela grande contribuição profissional e pessoal. Levarei sempre comigo, os princípios e conceitos ensinados nesta escola.

Aos **meus colegas e amigos de pós-graduação, TODOS**, sem exceção, contribuíram para a minha formação de Mestre. Aprendemos e crescemos juntos, e as lições de incentivo e carinho ficarão guardadas para sempre.

À **Cristina Ruan Ferreira de Araújo**, por ter compartilhado comigo a idéia desta pesquisa e assim, contribuir grandiosamente para a realização deste sonho, ser Mestre.

Ao doutorando **Cassiano Francisco Weege Nonaka**, pela grandiosa ajuda na elaboração desta pesquisa. Obrigada por me estimular a investigar e buscar as respostas. Seus ensinamentos foram de grande importância no despertar do meu espírito investigativo e que certamente será fundamental na construção de uma carreira docente que pretendo seguir. Sem a sua ajuda, este trabalho não seria o mesmo.

Aos funcionários **Andréa, Gracinha, Idelzuíte, Sandrinha, Lurdinha, Canindé e Hévio**, por contribuírem para a realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo auxílio financeiro, sem qual essa pesquisa se tornaria impossível.

Aos meus amigos queridos... Sempre e em qualquer lugar...

**RESUMO**

## RESUMO

Atualmente as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) têm efetiva participação no crescimento de neoplasias malignas. Sabendo que são escassos os trabalhos envolvendo BMPs e o carcinoma epidermóide oral, este trabalho realizou um estudo imunoistoquímico da BMP-2, BMPR IA e BMPR II em carcinomas epidermóides (CE) de lábio inferior relacionando com os aspectos clinico-patológicos desta lesão. A amostra constou de 40 casos de CE de lábio inferior, sendo 20 casos de CE de lábio inferior com metástase linfonodal regional e 20 casos sem metástase. A gradação histológica de malignidade foi realizada no *front* invasivo da lesão. Foi avaliada a intensidade de expressão (escore 1 para marcação ausente/ fraca e escore 2 para marcação forte), bem como foi verificado a porcentagem de células positivas, onde o escore 1 era os casos com 0 a 50% das células positivas; escore 2 com 51 a 75% das células positivas; e escore 3 com mais de 75% das células positivas. A amostra foi composta por 72,5% de homens com a média de idade de 65,8 anos, houve um predomínio do estágio II e 52,5% dos carcinomas foram classificados como de baixo grau, sendo os carcinomas com metástase regional apresentando a maioria dos casos (70%) como carcinomas de alto grau de malignidade ( $p=0,004$ ). O maior número de casos de CE de lábio inferior que estavam nos estágios I/ II (61, 9%) foi classificado em carcinomas de baixo grau de malignidade e os carcinomas nos estágios III/ IV foram classificados em alto grau de malignidade ( $p=0,024$ ). A BMP-2 apresentou intensidade da imunomarcação forte em 82,5%, BMPR-IA observou-se 55% dos casos com intensidade de imunomarcação ausente/ fraca e a BMPR-II revelou 85% dos casos com intensidade de imunomarcação ausente/ fraca. Apenas a proteína BMPR-IA apresentou associação estatisticamente significativa com todos os parâmetros clinico-patológicos estudados, metástase ( $p<0,001$ ), TNM ( $p<0,001$ ) e gradação histológica de malignidade com ( $p=0,028$ ). Quanto à porcentagem de células positivas, todos os marcadores apresentaram o maior número de casos com mais de 75% das células positivas (escore 3) e apenas a BMPR-II apresentou diferença estatística quando relacionada com a presença e ausência de metástase ( $p=0,049$ ). Conclui-se que existe distúrbio na via de sinalização BMP-mediada no CE de lábio inferior e que a alta expressão da BMP-2 associada com a expressão da BMPR-IA e BMPR-II estão relacionadas com a metástase neste carcinoma.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermóide de lábio inferior; Proteínas morfogenéticas ósseas; TNM; Gradação histológica de malignidade.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

Currently, bone morphogenetic proteins (BMPs) have effective participation in the growth of malignancies. Knowing that there are few studies involving BMPs and oral squamous cell carcinoma, this work constitutes an immunohistochemical study of BMP-2, BMPR IA and BMPR II in squamous cell carcinomas (SCC) of the lower lip relating to the clinical and pathological aspects of this lesion. The sample consisted of 40 cases of SCC of the lower lip, being 20 cases of SCC of the lower lip with regional metastasis and 20 cases without metastasis. We evaluated the intensity of expression (score 1 to mark absent / weak, score 2 for high ) and was found the percentage of labeled cells, where the score was 1 cases with 0 to 50% of positive cells, score 2 with 51 to 75% of positive cells, and score 3 more than 75% of positive cells. The sample comprised 72.5% of men with a mean age of 65.8 years, there was a predominance of stage II and 52.5% of the carcinomas were classified as low grade, being carcinoma with metastasis presenting most cases (70%) as carcinomas of high malignancy grade ( $p = 0.004$ ). The largest number of cases of SCC of the lower lip that were in stages I / II (61, 9%) were classified as carcinomas of low grade malignancy and carcinomas in stages III / IV were classified as high-grade tumors ( $p = 0, 024$ ). The BMP-2 showed strong intensity of immunostaining in 82.5%, BMPR-IA showed 55% of cases with an intensity of immunostaining absent / weak and BMPR-II showed 85% of cases with an intensity of immunostaining absent / weak. Only the protein BMPR-IA were significantly associated with all clinic-pathological parameters studied, metastasis ( $p < 0.001$ ), TNM ( $p < 0.001$ ) and histological grade of malignancy with ( $p = 0.028$ ). The percentage of positive cells, all markers showed the highest number of cases with more than 75% of positive cells (score 3) and only BMPR-II showed statistical difference when related to the presence and absence of metastasis ( $p = 0.049$  ). We conclude that there is disturbance in the BMP signaling pathway in EC-mediated lower lip and that high expression of BMP-2 associated with the expression of BMPR-IA and BMPR-II are associated with metastasis in carcinoma.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma of the lower lip; bone morphogenetic proteins; TNM; histological grading of malignancy.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Sinalização via BMP .....	37
<b>Figura 2 -</b>	CE de lábio inferior de baixo grau de malignidade (H/E 200×) .....	67
<b>Figura 3 -</b>	CE de lábio inferior de baixo grau de malignidade (H/E 200×) .....	67
<b>Figura 4 -</b>	Forte expressão da BMP-2 em CE de lábio inferior e mais de 75% das células positivas (LSAB 400×).....	68
<b>Figura 5 -</b>	Fraca expressão da BMPR-IA em CE de lábio inferior e mais de 75% das células positivas (LSAB 400×) .....	68
<b>Figura 6 -</b>	Fraca expressão da BMPR-II em CE de lábio inferior e 0 a 50% das células positivas (LSAB 400×) .....	68
<b>Figura 7-</b>	Forte expressão da BMPR-II em CE de lábio inferior e 51 a 75% das células positivas (LSAB 400×) .....	68

**LISTA DE QUADROS**



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Sistema de estadiamento clínico (TNM) para o CEO .....	48
<b>Quadro 2</b> - Categorias de estadiamento clínico (TNM) para o CEO .....	49
<b>Quadro 3</b> - Sistema de Gradação histológica de malignidade no “ <i>front invasivo</i> ” proposto por Bryne (1998) .....	50
<b>Quadro 4</b> - Clone, especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados .....	53

**LISTA DE TABELAS**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Distribuição dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, segundo sexo e faixa etária dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	56
<b>Tabela 2 -</b>	Distribuição dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, segundo o estadiamento clínico. Natal-RN, 2010.....	57
<b>Tabela 3 -</b>	Análise morfológica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior sem metástase. Natal-RN, 2010.....	57
<b>Tabela 4 -</b>	Análise morfológica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior com metástase linfonodal regional. Natal-RN, 2010.....	58
<b>Tabela 5 -</b>	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do grau histológico de malignidade do tumor em relação à presença ou ausência de metástase. Natal-RN, 2010.....	59
<b>Tabela 6 -</b>	Distribuição absoluta e relativa do estadiamento em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010.....	59
<b>Tabela 7 -</b>	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do estadiamento clínico em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010.....	60
<b>Tabela 8 -</b>	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010.....	61
<b>Tabela 9 -</b>	Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo a presença e ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010.....	62
<b>Tabela 10 -</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010.....	62
<b>Tabela 11 -</b>	Distribuição absoluta e relativa da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010.....	63

<b>Tabela 12 -</b>	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010...	63
<b>Tabela 13 -</b>	Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo o estadiamento clínico. Natal-RN, 2010.....	64
<b>Tabela 14 -</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010.....	64
<b>Tabela 15 -</b>	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010.....	65
<b>Tabela 16 -</b>	Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo a gradação histológica de malignidade. Natal-RN, 2010.....	66
<b>Tabela 17</b>	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010.....	66

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AKT – São proteínas membros da família proteína quinase e desempenha importante papel na sinalização celular de mamíferos.
- AP-1 – É um fator de transcrição do C-fos e C-jun. Controla processos celulares, incluído diferenciação, proliferação e apoptose.
- BAMBI – Inibido de membrana ligada a activina da proteína morfogenética óssea
- BMP – Do inglês, *Body Morphogenetic Proteins* (Proteína Morfogenética do Osso)
- BMPR - Do inglês, *Body Morphogenetic Proteins Receptor* (Receptor de Proteína Morfogenética do Corpo)
- CD 31 - Do inglês, *Cluster designation* ou *Cluster of differentiation* (Grupo de designação ou Grupo de diferenciação)
- CE – Carcinoma epidermóide
- CEO - Carcinoma epidermóide oral
- C-fos – Do inglês, *Finkel & Osteogenic Sarcoma* (Finkel e sarcoma osteogênico), oncogene fos (c-fos) codifica uma proteína nuclear que está envolvida no controle transcricional relacionado com o crescimento.
- C-jun - jun é a sigla de "JU-Nana", japonês para 17 (vírus do sarcoma aviário 17), oncogene jun (c-jun) codifica uma proteína nuclear que está envolvida no controle transcricional relacionado com o crescimento
- Dan – Do inglês *differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma* (seleção de genes aberrante do neublastoma)
- EGF – Do inglês *Epidermal growth factor* (Fator de crescimento epidérmico)
- ERK – Do inglês *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases* , Sinal celular regulado por quinase.
- FvW- Fator de von Willebrand
- HPV - Do inglês *Human papillomavirus*, Papiloma vírus humano
- Id 1 - Inibidor da ligação do DNA e diferenciação celular. Promove a inibição da diferenciação celular, *in vitro* e *in vivo*
- IL-8 – Interleucina 8.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- MAPK-p38 – Proteína quinase ativada por mitógeno
- MAPKAAPK 2 - Proteína quinase ativada por mitógeno-proteína quinase ativada 2

- MS – Ministério da Saúde
- MMP - Metaloproteinases da matriz extracelular
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- P13K- Do inglês phosphatidylinositol 3-kinase, Fosfatidilinositol 3-quinase. Inibidor com potencial da atividade neoplásica.
- PCR - Do inglês *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- RAS – Oncogene transdutor de sinal extra celular
- RNAm - Do inglês *messenger ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico mensageiro)
- RT-PCR - Do inglês *Reverse transcription polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)
- SMAD - proteínas que modulam a atividade do TGF- $\beta$ , são homólogas a proteínas drosófilas, *mothers against decapentaplegic* (MAD) e *Caenorhabditis elegans* (SMA). O nome é uma combinação dos dois
- SMURF – De ingles *Smad ubiquitination regulatory factors* (Fator regulatório de ubiquinização de Smad)
- TGF - Do inglês *Transforming growth factor* (Fator transformante de crescimento)
- TNM – Do inglês *Tumor-Node-Metastasis* (Tamanho do tumor, envolvimento do linfonodo regional e envolvimento por metástases à distância)
- Tsg – Do inglês *twisted gastrulation* (Gastrulação tocida)
- UICC – União Internacional Contra o Câncer
- VEGF - Do inglês *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)
- Wnt – Do ingles vem a combinação *Wg (wingless) and Int (INT gene)*. Via de sinalização que está envolvida na embriogênese e câncer

## SUMÁRIO



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	27
2.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL - CARCINOMA DE LÁBIO E CONSIDERAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS .....	28
2.2	BMPs: ESTRUTURA E FUNÇÕES .....	33
2.3	A INFLUENCIA DAS BMPs NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER .....	38
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	47
4.2	POPULAÇÃO .....	47
4.3	SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	47
4.3.1	Critérios de inclusão da amostra .....	47
<b>4.3.2</b>	Critérios de exclusão da amostra .....	47
4.4	SISTEMA DE ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM) .....	48
4.5	ESTUDO MORFOLÓGICO .....	49
4.6	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO .....	51
4.6.1	Técnica .....	51
4.6.2	Análise do Perfil Imunoistoquímico .....	53
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
4.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	55
5.1	DADOS CLÍNICOS .....	56
5.2	RESULTADOS MORFOLOGICOS.....	57
5.3	RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS .....	60
5.3.1	Quanto à presença de metástase regional .....	61
5.3.2	Quanto ao estadiamento clínico .....	62
5.3.3	Quanto à gradação histológica de malignidade .....	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84
	<b>APÊNDICE</b> .....	98
	<b>ANEXO</b> .....	104

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma epidermóide (CE) representa mais de 90% de todas as neoplasias malignas que acometem as estruturas orais, correspondendo 2% a 3% de todas as neoplasias do corpo. A incidência do Carcinoma Epidermóide Oral (CEO) difere significativamente entre os países, assim como no Brasil, fato que se deve possivelmente às diferenças locais na exposição dos fatores de risco (HARDISSON, 2003; OLIVEIRA; SILVA; ZUCALOTA, 2006; CHOI et al., 2006; LIANG et al., 2008).

Os sítios anatômicos mais acometidos pelo CEO são o lábio inferior, língua e assoalho da boca, localizações estas, comuns, e com altos índices de morbidade e mortalidade (OLIVEIRA; SILVA; ZUCALOTA, 2006 ; INCA 2010)

O CE de lábio é um dos tumores malignos mais comuns da cavidade oral, constituindo cerca de 25% a 30% de todos os casos de CEO, sendo o lábio inferior o mais acometido (MORSELLI et al., 2007).

Quando o CE de lábio inferior é diagnosticado em estágio inicial o prognóstico é bom, com sobrevida de 5 anos em mais de 90% dos pacientes. Entretanto, metástases em linfonodos cervicais podem ocorrer em 5% a 20% dos casos e, nesses pacientes, o prognóstico é pior, considerando que apenas, 30% a 70% atingem a sobrevida de 5 anos (HASSON, 2008).

As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são citocinas pleiotrópicas pertencentes à superfamília do Fator de Crescimento Transformador  $\beta$  (TGF -  $\beta$ ) (BALEMANS; VAN HUL, 2002). Os papéis das BMPs, no desenvolvimento embrionário e funções celulares no pós-natal e vida adulta, tem sido exaustivamente estudado nos últimos anos. Estas proteínas, na atualidade são consideradas como componentes de um sistema de sinalização capaz de regular o crescimento celular, diferenciação, apoptose, quimiotaxia, angiogênese e produção de matriz no desenvolvimento embrionário e no pós-natal. (WHITMAN, 1998; BOTCHKAREV, 2002; CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004; HARDWICK et al., 2008; CALVO et al., 2009; SHON et al., 2009).

A literatura contemporânea acredita que as BMPs tenham efetiva participação no crescimento de neoplasias malignas. Muitos estudos demonstram alterações nos componentes da via BMP em vários tipos de tumores, como os de próstata, cólon, mama, cérebro e carcinomas epidermóides orais (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; LEVY; HILL, 2006; ARAÚJO, 2009; BLANCO CALVO et al., 2009).

A via BMPs é controlada por receptores, co-receptores e antagonistas. Esses receptores podem ser de dois tipos, o receptor do tipo I e o receptor tipo II. O nível de expressão desses receptores tem papel importante na carcinogênese, pois podem estar superexpressos, porém inativos, devido à interação com antagonistas extracelulares das BMPs, os quais podem se encontrar superexpressas nos estágios mais avançados da progressão tumoral (HSU et al., 2005; BLANCO CALVO et al., 2009).

Sabendo-se que as BMPs e seus receptores BMPR-IA e BMP-II podem influenciar a carcinogênese e progressão tumoral, e dos escassos trabalhos envolvendo BMPs e o CEO, este trabalho teve o objetivo de realizar um estudo imunoistoquímico das proteínas BMP-2, BMPR IA e BMPR II, em CE de lábio inferior, associando-as com os aspectos clinico-patológicos. É importante o conhecimento da relação dessas proteínas no CE de lábio inferior, visto que, trata-se de uma neoplasia maligna de alta prevalência na cavidade oral que necessita de continuados estudos, objetivando a obtenção de um melhor conhecimento sobre a agressividade da lesão e do potencial dessas proteínas na predição do prognóstico tumoral.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL - CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO E CONSIDERAÇÕES CLINICO-PATOLÓGICAS

O CEO, também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, define-se como uma neoplasia maligna com origem no epitélio pavimentoso estratificado (KADEMANI, 2007). O potencial de agressividade da lesão está relacionado com diversos fatores, entre os quais se tem como mais significativos o grau histológico de malignidade, tamanho da lesão, grau de comprometimento dos tecidos vizinhos, presença de metástase no momento do diagnóstico e localização anatômica do tumor (CHOI et al, 2006).

Histologicamente, o CE se apresenta como uma proliferação de células da camada espinhosa, que se dispõe em grupos celulares, formando cordões e ninhos ou, isoladamente, invadindo o tecido conjuntivo. As células neoplásicas exibem hiperchromatismo, pleomorfismo, aumento do número de figuras de mitose, mitoses atípicas, dentre outras anormalidades (NEVILLE et al., 2009).

Estimativas da incidência de câncer para 2010 no Brasil apontaram ser o câncer de boca como o 5º mais freqüente entre homens (com 10.330 novos casos estimados) e o 7º entre mulheres (com 3.790 novos casos estimados). A região Nordeste encontra-se na segunda posição das regiões com o maior número de casos, e as estimativas para o Rio Grande do Norte são de 210 casos (homem – 120 casos/ mulher - 90 casos) para esse ano. (INCA, 2010)

Dados epidemiológicos mostram que os pacientes acima de 40 anos são os mais acometidos pelo CEO, apresentando maior incidência com o decorrer da idade, e nos pacientes do sexo masculino comparativamente aos do sexo feminino (3:1) (NEVILLE et al., 2009). No entanto, a incidência desta neoplasia, em adultos jovens e mulheres, vem crescendo segundo levantamentos feitos na última década. Isto é atribuído principalmente ao aumento da infecção pelo HPV com o desenvolvimento dos países, a prática de sexo oral e ao número de parceiros sexuais. (CURADO; HASHIBE, 2009).

O CEO pode se manifestar clinicamente de várias formas, incluindo as leucoplásicas, eritroplásicas, eritroleucoplásicas e úlceras, nos padrões de crescimento exofítico, endofítico e verrucoso. Sua etiologia é complexa pelo fato de ter caráter multifatorial. Diversos fatores intrínsecos tais como alterações genéticas, deficiências nutricionais e imunossupressão, e fatores extrínsecos como radiação solar, tabaco, álcool e alguns vírus, têm sido apontados dentre os agentes envolvidos na sua etiopatogenia

(CAMPISI et al., 2006; NAGPAL, BIBHU, 2003). Para Scully et al. (2009) não há um fator causador isolado claramente definido, ou aceito, mas tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar em atividade, podendo ser necessário que mais de um fator seja responsável pelo desenvolvimento da referida neoplasia.

O Câncer de boca compreende os cânceres de lábio e de cavidade oral (mucosa jugal, gengivas, palato duro, língua e assoalho de boca) (INCA, 2010). Os sítios mais comuns variam geograficamente, refletindo diferentes fatores de risco. Cidades litorâneas e com grande exposição solar durante a maioria dos dias do ano, têm uma alta taxa de CE de lábio inferior. Como exemplo se tem o Rio Grande do Norte, com grande número de ocorrências de câncer no lábio inferior.

O CE de lábio corresponde a 90 % de todos os tumores nessa região. Países como a Austrália, Canadá, Espanha e Iran têm o carcinoma epidermóide em lábio inferior como sendo a lesão maligna mais comum da boca (SARGERAN et al., 2009). Oliveira, Silva e Zucalota (2006) traçando o perfil da incidência de pacientes com CEO no Brasil, relataram que o lábio inferior foi a segunda localização mais comum do CEO, perdendo apenas para a língua.

O CE de lábio acomete predominantemente os pacientes do sexo masculino, raça branca, entre a sexta e sétima décadas de vida, sendo o lábio inferior mais acometido que o lábio superior (LUNA-ORTIZ et al., 2004).

A localização anatômica é um dos principais fatores relacionados com o comportamento biológico. Os CEs localizados nos lábios são mais facilmente percebidos pelo paciente, favorecendo uma intervenção mais precoce, ao passo que, em áreas mais internas como língua, este é menos visualizado, comprometendo consequentemente o prognóstico (MORSELLI et al., 2008). Tal fato foi considerado por Costa et al. (2002), os quais verificaram que carcinomas localizados em língua e assoalho bucal eram relacionados com estadiamento mais avançado. Miranda (2002) também verificou em sua amostra que a maioria dos CE, situados em língua, eram graduados morfológicamente em alto grau de malignidade, enquanto que os de lábio inferior eram de baixo grau de malignidade.

O CE de lábio inferior se desenvolve lentamente e metastatiza para linfonodos cervicais de 3 a 29% dos casos (SALGARELLI et al., 2009). As lesões labiais menores que 2 cm têm bom prognóstico, apresentam evolução lenta, baixo grau de malignidade e disseminação linfonodal, fazendo exceção ao prognóstico dos demais cânceres orais (ABREU et al., 2004).

Para Hasson et al (2008) o aumento no índice de metástases se mostra proporcional a profundidade de invasão das células neoplásicas. No lábio inferior, o risco de metástase é

considerado nulo nos tumores que mostram uma invasão tumoral com espessura menor que 2mm, baixo nos tumores entre 2mm e 6mm e alto nos tumores acima de 6mm.

As metástases de CE de lábio a distância são raras, com incidência inferior a 2%. Vahtsevanos et al (2007) estudando 186 casos de carcinoma epidermóide de lábio, observaram que apenas quatro pacientes (2,14%) apresentaram metástases ósseas a distância, sendo que, um desses casos, também mostrou comprometimento de um linfonodo axilar. As lesões desses pacientes estavam entre os estágios clínicos II-IV e, as metástases ósseas e de linfonodos axilares, foram atribuídas ao manejo inadequado inicial ou devido ao comportamento clínico agressivo do tumor.

O sistema de estadiamento clínico de tumores (TNM), há muitos anos, tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores, servindo como indicador de agressividade dos CEOs e ajudando a propor a terapia mais adequada e, assim, estimar a sobrevida dos pacientes. O TNM avalia características fundamentais do tumor, como extensão local (T), disseminação regional (N) e metástases à distância (M) (COSTA et al, 2005; CHOI et al, 2006). Segundo relataram Amar et al (2003), a doença em estágio avançado é definida pela presença de tumor primário extenso (> 4cm), presença de metástases regional e/ou à distância, o que configura os estágios clínicos III e IV.

A gradação histológica de malignidade do CEO é um recurso microscópico que visa classificar a lesão de acordo com o grau de diferenciação celular, no intuito de fornecer subsídios que possibilitem a interpretação da agressividade do tumor e assim, explicar lesões com características clínicas semelhantes, mas comportamento biológico discrepante (MARTINS NETO, 1999; LOURENÇO et al., 2007). Assim, Broders, em 1920, fez a primeira gradação histológica de malignidade a ser publicada, baseada na proporção de células diferenciadas, passando por Wahi (1971), Jakobsson et al. (1973), Anneroth, Batsakis e Luna (1987) até a proposta por Bryne et al. (1989) e, por ela, aperfeiçoada em 1998.

Em 1989 Bryne et al. estudando 68 espécimes de CEO, testaram um sistema de gradação histológica de malignidade baseado naquele preconizado por Anneroth, Batsakis e Luna (1987), onde considerava os seguintes parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo celular, número de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão, e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, mas com avaliação apenas da área mais invasiva do tumor, denominada *front* de invasão. Sugeriram excluir o parâmetro estágio de invasão e o escore final passou a ser a somatória dos valores obtidos por cada parâmetro, sendo considerados de baixo escore os valores de 5 a 10, e alto escore de malignidade, os valores superiores a estes. Os autores observaram que o sistema utilizado tem maior valor prognóstico em CEO, do que o método



de Broders (1920). Concluíram que, as características histológicas das áreas mais invasivas dos tumores, são importantes indicadores do seu comportamento clínico.

Bryne (1998) revisando seus estudos sobre o sistema de gradação histológica de malignidade desenvolveu um sistema retirando o parâmetro figuras de mitose, baseando-se na análise do grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão tumoral e infiltrado inflamatório, considerando o *front* de invasão tumoral como alvo da análise. Também foram atribuídos valores numéricos de 1 a 4 para cada um desses parâmetros. Este sistema mostrou ser uma importante ferramenta no diagnóstico bem como para a terapêutica dos tumores, sugerindo que a gradação do “*front*” invasivo é um dado valioso para análise histológica. Segundo a autora, as células presentes no “*front*” invasivo do tumor exibem características moleculares diferentes daquelas situadas na região superficial do tumor, justificando, assim, ser esta área a mais importante para determinação do prognóstico tumoral.

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS, em 2005, baseou-se no grau de diferenciação celular e permitiu a classificação dos CEO nas categorias de carcinoma pouco, moderadamente e bem diferenciados. Os bem diferenciados foram assim denominados quando sua arquitetura tecidual se assemelhou a um padrão normal de epitélio escamoso. Já àqueles que se mostraram pouco diferenciados, caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização. Os CEO moderadamente diferenciados apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização (JOHNSON et al, 2005).

Silveira et al. (2009), estudando CEs de língua e de lábio, adotou o sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto por Bryne (1998). Entretanto, como o parâmetro número de mitoses foi abolido pela autora nesta gradação, sem que nenhuma alteração fosse realizada quanto ao escore final. Então esses autores sugeriram que também a pontuação necessária para a classificação do grau de malignidade da lesão fosse modificada, passando a ser de 4 a 8 pontos para baixo grau e, maior que 8 pontos, para alto grau de malignidade.

Para Costa et al. (2002), no CEO existe uma correlação positiva entre o Sistema TNM e a gradação histológica de malignidade desenvolvida por Whai (1971), preconizada pela OMS. Acrescentam os autores que essa correlação pode ser evidenciada, também, entre o TNM e a localização anatômica da lesão.

Dantas et al. (2003) estudando a correlação entre a classificação TNM e escores histológicos de malignidade preconizado por Anneroth, Batsakis e Luna (1987), e a correlação destes parâmetros com o prognóstico em 16 casos de CE de língua, verificaram

que não houve correlação entre o TNM e escores histológicos de malignidade, entretanto houve associação entre o TNM e o prognóstico, fato não observado entre o prognóstico e escores histológicos de malignidade.

Em 2005, Costa et al. correlacionaram a classificação clínica TNM com as características histopatológicas (grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário) e os escores histológicos de malignidade preconizada por Bryne 1998, em 38 casos de CEO. A classificação clínica TNM teve uma correlação estatisticamente significativa com grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear e infiltrado linfoplasmocitário.

Cantin et al. (2008) estudaram o carcinoma epidermóide de lábio inferior associando o grau de angiogênese e graduação histológica de malignidade no *front* de invasão tumoral. Nos 17 casos de CE de lábio inferior, a maioria (41,18%) apresentou um grau de angiogênese leve, apenas 5,88% dos CE de lábio inferior estudados eram indiferenciados e a gradação variou em sua maioria entre os escores 8 e 9. Entretanto, esses autores não encontraram relação entre a gradação histológica de malignidade e o grau de angiogênese.

O tratamento de escolha para o CE de lábio é o cirúrgico, porém a associação com a radioterapia pós-operatória constitui o tratamento de escolha em casos de estágio avançado. Tal evolução é representada pela presença de metástases regionais ou à distância e, para características que configuram o estágio clínico III e/ou IV. Associado a essas condutas temos o esvaziamento cervical mesmo na ausência de metástases clinicamente identificáveis, pois a taxa de metástases ocultas é superior a 30% (AMAR et al, 2003).

Muitos eventos moleculares cercam o processo de carcinogênese. Baseados nisso pesquisas tentam relacionar os aspectos clínico-patológicos com biomarcadores envolvidos com este complexo processo, para que ao final se possa correlacionar com o prognóstico e, assim, obter uma sobrevida maior para os pacientes acometidos pelo câncer. Dentre estes, se destacam as BMPs.

## 2.2 BMPs: ESTRUTURA E FUNÇÕES

As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são proteínas de crescimento multifuncionais pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), foi primeiramente identificada pelo cientista americano e cirurgião ortopédico, Dr. Marshal Urist, em 1965. Entretanto, essas proteínas responsáveis pela indução de osso, permaneceram desconhecidas até a purificação e a seqüência de BMP bovina-3 (osteogenina)

e clonagem das BMP-2 e -4 de humanos no final de 1980 (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004). Cerca de vinte membros de BMPs têm sido identificados em uma ampla variedade de organismos, desde insetos a mamíferos (HSU et al., 2005; KIM;KIM, 2006; STEINERT et al., 2008)

A Família BMP é composta pelas seguintes moléculas: BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8A, BMP-8B, BMP-9 (também chamada de Gdf2), BMP-10, BMP-11 (Gdf11), BMP-12 (Gdf7), BMP-13 (Gdf6), BMP-14 (Gdf5), BMP-15. Apenas a BMP-1, não pertence à família do TGF-  $\beta$ , embora nomeado BMP, não possui a sequência C-terminal que caracteriza a estrutura molecular deste grupo de citocinas, sendo identificada como uma proteinase C pró-colágeno e Chodin, um antagonista da ação das BMPs. (CANALIS; ECONOMIDES; GAZERRO, 2003; GRANJEIRO et al., 2005).

Todos os membros da superfamília TGF- $\beta$  são caracterizados pela presença de sete cisteínas que participam na dobra das estruturas protéicas terciárias e quaternárias. As BMPs podem ser distinguidas do TGF- $\beta$  através da sexta cisteína que constrói um nó de cisteína, e da sétima cisteína que é usada para a dimerização com um segundo monômero sendo essa dimerização considerada pré-requisito para sua ação biológica (NOHE et al., 2004; WAN;CAO, 2005).

As BMPs são glicoproteínas de peso molecular baixo, de estrutura dímera, composta por duas cadeias polipeptídicas, unidas por pontes dissulfeto, podendo ser homodímeras (duas cadeias idênticas) ou moléculas heterodímeras (duas cadeias diferentes) (GRANJEIRO et al, 2005). Ao sofrerem dimerização, suas moléculas são clivadas proteoliticamente na região carboxi-terminal, durante sua secreção. Uma vez secretadas, ligantes diméricos maduros com peso de 21-25 KDa ligam-se a receptores de membrana plasmática em diferentes tipos celulares, com efeitos autócrinos e parácrinos (BALEMANS;VAN HUL, 2002; KIM; KIM, 2006).

Com o avanço das pesquisas, observou-se o relevante potencial biológico das BMPs, participando da morfogênese, desenvolvimento e homeostase de diversos órgãos como o coração, rim, cérebro, olhos, pulmão, pele, dente etc. Diante desses achados, foi proposto que as mesmas não fossem tão somente consideradas proteínas relacionadas com o tecido ósseo mas, sim, denominadas proteínas morfogenéticas do corpo (que no inglês é *Body*, desta forma, não alterando a sigla). Já que se tem demonstrado um amplo espectro de atividades biológicas relativas a essas proteínas, sobre diversos tipos celulares, incluindo monócitos, células epiteliais, células mesenquimais e células neurais (BALEMANS; VAN HUL, 2002; REDDI, 2005).

Estudos demonstram que ratos mutantes para BMP-2 morrem ao apresentarem defeitos no desenvolvimento cardíaco e nos tecidos periembrionários. Mutações na BMP-4 também causam morte por falta de diferenciação mesodérmica. Além disto, ratos com mutações no gene da BMP-7 acarretam a não formação de olhos e falta de desenvolvimento glomerular, o que leva a insuficiência renal e morte logo após o nascimento. Já defeitos na BMP-8 provocam infertilidade devido a defeitos na espermatogênese (VARGA; WRANDA, 2005).

Xio; Xiang e Shao (2007) afirmam que as BMPs são capazes de controlar diferentes medidas de diferenciação e de especificação, de vários tipos de células embrionárias, para originar componentes distintos do sistema nervoso dos vertebrados. Da mesma forma, no desenvolvimento embrionário, as BMPs têm um papel fundamental na apoptose, um processo necessário para remover as células e os tecidos que não são mais úteis.

Estudando a imunolocalização da BMP-2 em embrião humano, Suzuki et al. (2001), observaram a presença dessa proteína nos germes dos dentes, principalmente na lâmina dentária e retículo estrelado, nos osteoblastos ao redor da matriz do osso dos maxilares, nas fibras musculares estriadas imaturas da língua e no epitélio pavimentoso estratificado da boca e esôfago, sugerindo que essa proteína está envolvida na morfogênese dos tecidos maxilofaciais.

Partindo do princípio de que as células da epiderme sofrem, continuamente, um processo de auto renovação, e que suas células têm a capacidade de sair do ciclo celular e sofrerem diferenciação terminal através da adição da BMP-6, foi que Gosselet et al. (2007) realizaram estudos utilizando culturas de células com três tipos de ceratinócitos epidérmicos interfolicular primários e BMP-2 e -6. Verificaram os autores, que o tratamento com essas BMPs resultou numa transição de colônias proliferativas para colônias abortivas, sugerindo que essas proteínas inibem a proliferação do ciclo celular, fazendo com que essas células saiam do ciclo. Concluíram que as BMPs (-2 e -6) inibem a proliferação celular dos ceratinócitos, fazendo com que consecutivamente estes sofram diferenciação terminal.

A sinalização das BMPs é mediada por receptores transmembrana do tipo treonina/serina quinase, onde três tipos de receptores I têm mostrado ligarem-se as BMPs: receptor activina tipo IA (ActRIA ou Alk 2), tipo IA (BMPRI-IA ou Alk3) e IB (BMPRI-IB ou Alk6). E também três tipos de receptores II, consistindo em receptor tipo II BMP (BMPRII), tipo IIA (ActR-IIA) e o tipo IIB (ActR-IIB). Os domínios quinase treonina/serina dos receptores tipo II são constitutivamente ativos e fosforilam os domínios Gly-Ser (GS) nos

receptores tipo I, após a interação com a BMP ligante, resultando assim na ativação das quinases dos receptores tipo I (CALVO et al., 2009).

A especificidade de sinalização da BMP é largamente mediada por receptores tipo I. Estudos *in vitro* têm mostrado que todos os membros das BMPs ligam-se a receptores BMPR-II em combinação com BMPR-IA, embora exista uma combinação preferencial entre ligantes e receptores (HSU et al., 2005; KIM; KIM, 2006).

Respostas distintas da via BMP dependem da natureza do complexo ligante – receptor formado, assim como, a ativação de outras vias. Se o complexo de receptores tipo I e II forem heterodímeros, a via da BMP sinaliza a ativação de mensageiros Smads intracelular (via canônica). Entretanto, se o complexo é homodímero ocorre ativação da via de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK)(WAN;CAO, 2005).

O complexo BMPR-II/BMPR-I se auto fosforila e adquire habilidade para fosforilar proteínas Smads, que constituem uma família de transdutores de sinal da superfamília TGF- $\beta$ . Estas proteínas são classificadas dependendo de suas funções em três distintos grupos: Smads receptor-reguladas (R-Smads), Smads mediadores comuns (Co-Smads) e Smads Inibidores (I-Smads). São identificadas oito proteínas Smads, dentre elas, as Smads 1, 5 e 8 são R-Smads, que são ativadas pelos receptores tipo I. A Co-Smad é representada apenas pela Smad 4 e as Smads 6 e 7 funcionam como I-Smads. As Smads 2 e 3 somente transmitem sinais para o TGF-  $\beta$ , Nodal ou ligantes de Activina ( smads reguladores de Activina ou RA-Smads). As Smads têm um amplo espectro de atuação e regulam desde a ativação de receptores, bem como a exportação e a importação nuclear de Smads até a atividade transcricional (ROSS; HIL, 2008).

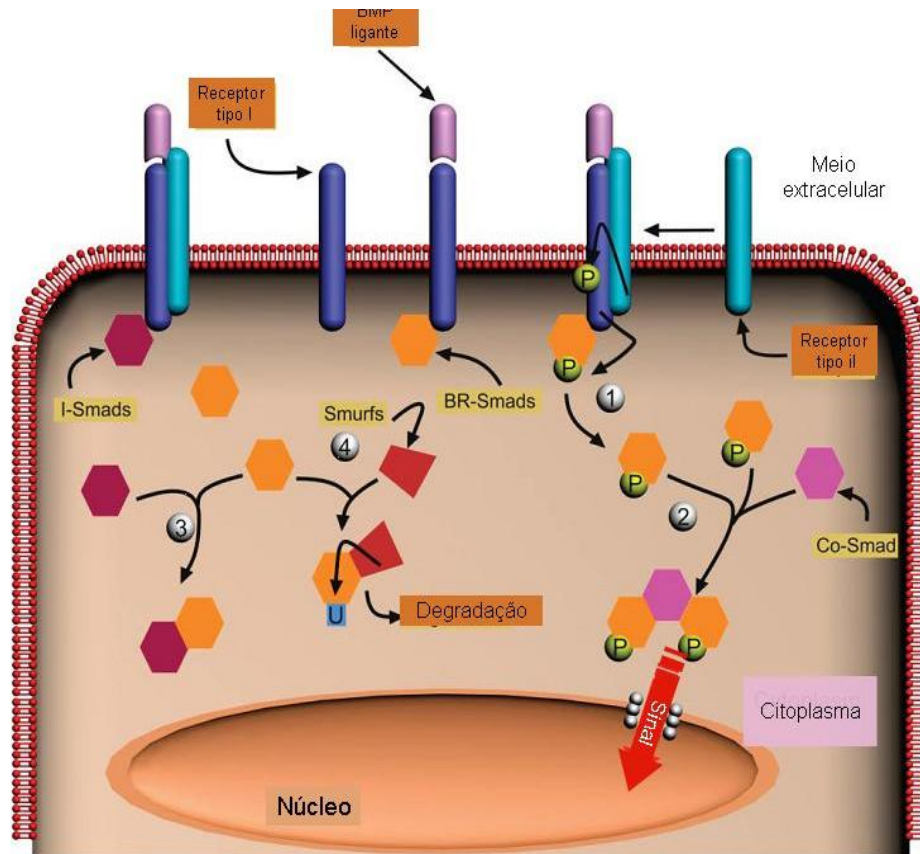
A sinalização via BMP é bem específica e controlada pelos receptores tipo I, por exemplo, as BMPs – 2 e 4 ligam-se a ambos os receptores Alk3 e Alk6, os quais sinalizam através das três conhecidas R-Smads. A BMP-7 tem elevada afinidade pelo Alk2, mas pode se ligar tanto ao Alk3 como ao Alk6. A BMP-6 liga-se exclusivamente ao Alk-2 e sinaliza através das Smads 1 e 5 (VON BUBNOFF; CHO, 2001).

Uma vez ativados os receptores tipo I fosforilam as R-Smads e estas por sua vez, formam complexos com Co-Smads, que se translocam para o núcleo e regulam a transcrição de vários genes alvos, através da interação com fatores de transcrição ou com co-ativadores ou co-repressores transcricionais (MIYAZONO; MAEDA; IMAMURA, 2005). Para Wan e Cao (2005), esta via de sinalização tem como produto final o estímulo da expressão gênica no núcleo, alterando, então, a atividade celular, incluindo crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (Figura 1).

Outra via de sinalização que vem sendo discutida na literatura é a MAPK-p38, que pode ser Smad-independente e é induzida pela oligomerização dos receptores através da BMP-2. A BMP-2 pode inicialmente mediar a homodimerização do receptor I e posteriormente recrutar o receptor II (que não está na forma homodímera). Esta ativação deste complexo resulta na indução da via MAPK-p38. Cada diferente receptor oligômero pode estar associado a diferentes proteínas citoplasmáticas, que podem regular vias de sinalização distintas (NOHE et al., 2002).

A cascata de sinalização via BMPs é controlada em diversos níveis por fatores intracelulares e extracelulares, incluindo inibição da interação do receptor BMPR-BMP por proteínas extracelulares que se ligam à BMP; presença de pseudoreceptores de membrana; bloqueio da sinalização da BMP pela ligação intracelular das Smads; ubiquitinação e degradação proteossomal das moléculas de sinalização das BMPs (BALEMANS; VAN HUL, 2002; GAZZERRO; CANALIS, 2006).

Em nível extracelular, o controle é feito por proteínas que se ligam seletivamente às BMPs, impedindo a interação destas com os seus receptores treonina/serina quinase afins. Estes antagonistas possuem em sua estrutura grupamentos cisteína, assim como os membros do TGF- $\beta$ , inclusive as BMPs, e são classificados em três subfamílias, baseando-se no tamanho dos grupos cisteína: a família DAN, a Tsg (Twisted gastrulation) e a Chordin e Noggin (HARRISON et al., 2004; YANAGITA, 2005). Esses antagonistas ligam-se às BMPs com a mesma afinidade de seus receptores específicos, bloqueando a transdução de sinal e diminuindo, então, a sua atividade biológica, que pode ser, por exemplo, a formação de osso. Quando há superexpressão das BMPs em condições patológicas, como a formação excessiva de osso, estes antagonistas podem representar uma proposta terapêutica bastante eficaz (GROPPE et al., 2002).



Fonte: Adaptado de Blanco Calvo et al. (2009)

Figura 1 - Sinalização da via BMP: (1) Fosforilação da R-Smad; (2) Ligação com a Co-Smad transporte do sinal para núcleo; (3) e (4) inibição da via por fatores intracelulares( I-Smads e Smufs).

Na superfície celular existe outro nível de regulação, o pseudo-receptor de BMP (BAMBI - *BMP and Activin membrane-bound inhibitor*), que é uma glicoproteína transmembrana com domínio extracelular semelhante aos receptores da BMP. Este pseudo-receptor neutraliza os receptores tipos II, sem contato direto com as BMPs (NOHE et al, 2004).

No citoplasma a I-Smads é responsável pela regulação da via de sinalização da BMP. Estas Smads (6 e 7) se ligam a receptores tipo I, interferindo com a fosforilação da Smad 1, 5 e 8 e heterodimerização com Smad 4. Adicionalmente I-Smad impede a formação do complexo R-Smad/Co-Smad. A expressão das Smads 6 e 7 é induzida por múltiplos estímulos, incluindo BMP-7 e EGF, além de condições patológicas. Pode-se ainda encontrar dois fatores de ubiquinização de Smads, isto é, Smuf 1 e 2, que são mediadores da etapa final de ubiquinização das proteínas alvo. Essas Smufs contem domínio catalítico HECT, que modula a sinalização do TGF- $\beta$  por selecionar, como alvo, o receptor tipo I e as proteínas Smads (BALEMANS; VAN HUL, 2002; GAZERRO; CANLIS, 2006).

HSU et al. (2005) realizando pesquisas nas áreas de embriologia, genética e carcinogênese evidenciaram que, alterações na via de sinalização das BMPs, contribuem para o desenvolvimento de neoplasias, sendo que os primeiros indícios surgiram a partir de estudos genéticos de síndromes de câncer familiar, como a Polipose Juvenil Familiar, onde mutações do Smad 4 e do BMPR-IA estão implicadas na origem da doença. Mutações no BMPR-IA foram identificadas em portadores da Síndrome de Cowden, que é uma síndrome de câncer de mama hereditário. Adicionalmente, a via de sinalização das BMPs encontra-se alterada em cânceres humanos esporádicos (próstata, cólon, mama, cérebro, rim, bexiga, pulmão) e a atuação destas proteínas em carcinogênese é complexa, pois envolve tanto efeitos pró-tumorais, como anti-tumorais.

### 2.3 A INFLUÊNCIA DAS BMPs NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

As BMPs são proteínas envolvidas na manutenção de um estado de quiescência de células-tronco em seus nichos e, mais tarde, na sua diferenciação em células maduras nos tecidos normais. Deste modo, alteração nos componentes da via de sinalização da BMP pode levar a atividade proliferativa descontrolada das células-tronco normais, quebrando o equilíbrio. Sendo o câncer um processo multifásico resultante da proliferação clonal de células alteradas que escapam dos mecanismos de controle, é evidente que as alterações na via da BMP podem ser um importante marco na genética e nos eventos moleculares que conduzem ao desenvolvimento câncer (CALVO et al., 2009).

Hatakeyama et al.(1997) estudaram a expressão do RNAm das BMPs (-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7) em células epiteliais neoplásicas originárias do estômago, reto, bexiga, tireóide, glândula salivar, língua e gengiva. Verificaram que todas as linhagens celulares expressaram, em vários graus, os subtipos de BMPs. As células do carcinoma epidermóide de língua, gengiva e gástrico expressaram apenas as BMP-1 e BMP-2. O adenocarcinoma salivar expressou fracamente as BMPs (-1, -2, -6, -3 e -7), e a marcação imunistoquímica da BMP-2 no citoplasma das células do carcinoma de língua, confirmou sua presença nessa neoplasia, sugerindo, assim, que as células epiteliais neoplásicas possuem um alto potencial para expressar o RNAm das BMPs.

As BMPs podem atuar tanto como oncogene como supressor tumoral, a depender do estágio da doença e da sua concentração na matriz tumoral. Além disso, como os efeitos das BMPs são célula-específico e, por isso, podem variar entre os diversos tipos tumorais,



inclusive naqueles de mesma origem celular (HSU et al., 2005). Langenfeld et al. (2005) ainda mencionam que as condições de cultura, em estudos *in vitro*, bem como a concentração de antagonistas intra e extracelular interferem na atividade biológica das BMPs.

Segundo Kim e Kim (2006) o efeito preciso das BMPs em células malignas deve ser interpretado no contexto do tipo celular e condições experimentais. Esse autores ao realizarem uma revisão da atuação dessas proteínas em diversos tipos de câncer, observaram que dependendo do tipo de câncer estudado, elas poderiam estar super ou subexpressas, como por exemplo, no carcinoma de células transicionais da bexiga, no qual verificaram uma subexpressão, enquanto que no câncer colorretal e de mama uma superexpressão.

Pouliot, Blais e Labrie (2003) tentaram elucidar o papel da sinalização da BMP em células de câncer de mama humano, usando uma estratégia de domínio negativo que não contém um domínio quinase, utilizando um receptor de BMP tipo II truncado (DN-BMPRII). Verificaram que a superexpressão estável ou transitória desse receptor bloqueia a ativação da Smad1 pela BMP-2, inibindo o crescimento dessas células (T-47D), sugerindo, assim, que as BMPs interagem com os BMPR-II contribuindo para proliferação e sobrevivência das células no câncer de mama.

Rothammer et al. (2005) analisaram a expressão da BMP-2, BMP-4 e BMP-7 em melanoma humano através da RT-PCR. Primeiramente observaram a expressão dessas proteínas em linhagem de células de melanoma através da RT-PCR. A expressão de BMP-2 só foi detectada em duas das linhas de células analisadas, SK Mel 28 e Ei Mel, enquanto que a BMP-4 foi expressa em todas as linhagens celulares e a BMP-7 em quase todas, menos em uma (HTZ19D) na qual não foi detectada. Estes resultados confirmaram uma expressão forte de BMP-4 e uma expressão moderada de BMP-7, nas linhas de células de melanoma. Além disto, foi feita a marcação imunoistoquímica dessas lesões, utilizando o nevus como controle negativo. A marcação continuou forte para BMP-4 e BMP-9, tanto em tumor primário como em metástases, e negativa para o nevus. Sugeriram assim, que as BMPs têm uma importante participação em melanomas humanos, facilitando a invasão celular e a sua migração.

Hsu et al. (2005), em uma revisão de literatura sobre BMPs e melanomas, afirmaram que a BMP-7 pode ter uma função anti-tumoral e pró-tumoral. A superexpressão da BMP-7 ocorre durante a transformação melanocítica, que atua de forma autócrina inibindo o crescimento no estágio inicial de desenvolvimento do melanoma. Como o tumor tende a progredir em direção a um fenótipo mais agressivo, as células do melanoma produzem constantemente altos níveis de BMP-7 e, por conseguinte, duas situações podem ocorrer, uma no desenvolvimento de resistência ao efeito antitumoral da mesma, através da concorrente

superexpressão dos inibidores das BMPs, como o noggin e, a outra, é que, altos níveis de BMP-7, nos estágios mais avançados da doença, promove metástase, estimulando a angiogênese e a remodelação da matriz tumoral (efeito pró-tumoral). Este efeito duplo também se aplica às demais BMPs e a toda superfamília TGF- $\beta$ .

Metástases ósseas é uma fonte significativa de morbidade e mortalidade entre pacientes com câncer de próstata. Feeley et al. (2005) tentaram determinar o papel das BMPs na formação de lesões metastáticas osteoblástica no câncer de próstata. Aplicaram BMP-2, -4 e -7 exógena em linhagem de células de câncer de próstata LAPC-4 e LAPC-9, e utilizaram Western blot e RT-PCR para avaliar os efeitos dessas proteínas na migração, invasão e proliferação celular. Observaram que todas as BMPs foram expressas nas linhagens de células e que as BMP-2 e -7 estimularam a migração celular e invasão de células do câncer de próstata em uma forma dose dependente, mas a BMP-4 não teve efeito. Concluíram, dessa forma, que as BMPs são fundamentais na formação das lesões metastáticas associadas ao câncer de próstata, evidenciando, assim, que estratégias de tratamento futuro, inibindo a atividade da BMP local, podem reduzir a formação e progressão dessas lesões.

A fim de esclarecer o mecanismo de ossificação em metástase, Komai et al. (2006), estudaram a imunoexpressão da BMP-2 e o receptor BMPR-IB em carcinoma urotelial de bexiga e em sua metástase no músculo psoas maior esquerdo. Foi observada uma imunorreatividade no citoplasma para BMP-2, em ambas as localizações, enquanto que o BMPR-IB foi evidenciado nas células semelhantes a osteoblastos na formação de osso adjacente, localizado na metástase do músculo psoas. Não foi encontrado no local primário, indicando assim, que a diferença das células estromais pode ter um mecanismo essencial na ossificação heterotópica, ocorrendo em lesões metastáticas e não na primária, representando tal achado uma maior agressividade do tumor.

Estudando o papel das BMPs -2, -4 e -7, receptores de BMPs – IA, IB e II e o antagonista noggin, em uma linhagem de células de adenocarcinoma de próstata metastático, Feeley et al.(2006), observaram que a BMP-2 e, em menor extensão a BMP-4, estimularam a proliferação, migração celular, sendo que a invasão celular foi estimulada apenas pela BMP-2, enquanto que a BMP-7, não apresentou nenhum destes efeitos. Os três receptores foram encontrados nessas células, sugerindo a participação dos mesmos nos efeitos exercidos pelas BMPs. A superexpressão do noggin inibiu todos esses efeitos supracitados *in vitro*, como também exerceu sua função inibitória sobre o crescimento e osteólise tumoral *in vivo*, sugerindo que a inibição local das atividades das BMPs no câncer de próstata pode permitir

novas modalidades terapêuticas, diminuindo, assim, a mortalidade e morbidade associada à doença metastática.

Langenfeld e Langenfeld (2004), estudando o papel da BMP-2 na angiogênese, verificaram que a mesma aumenta a neovascularização no desenvolvimento de tumores, fato este confirmado pela utilização de uma BMP-2 recombinante que estimulou a formação de vasos sanguíneos numa linhagem celular (A549) de câncer pulmonar. Sua propriedade em ativar as células endoteliais foi demonstrada pela habilidade de fosforilar a Smad 1, 5 e 8 e ERK-1/2 e, aumentar a expressão do gene *id1*, com conseqüente proliferação e formação do tubo. Concluíram assim que a expressão da BMP-2, em tumores de pulmão, tem um importante papel no processo da tumorigênese.

Raida e et al. (2005) investigaram o possível papel da BMP-2 sobre células endoteliais da microcirculação da derme humana (CEMDH) e uma possível atividade angiogênica, através da implantação subcutânea de uma esponja estéril no dorso de ratos, sendo inoculada com rhBMP-2 (recombinante) ou rhVEGF (recombinante), ou combinação de ambos, diariamente, durante 7 dias (prova da esponja). Além disso, implantaram em ratos, células de câncer de mama da linhagem MCF-7 transfectadas com BMP-2, para avaliar o efeito da superexpressão desta citocina sobre a vascularização tumoral. Após a prova, as esponjas removidas foram imunomarcadas com anticorpos anti-FvW e anti-CD31, revelando aumento da atividade angiogênica com significativo incremento da vascularização no grupo de tratamento combinado. Nos ratos transfectados com MCF-7/BMP-2, observaram o desenvolvimento de tumores com diâmetro de 1-1,5 cm<sup>2</sup>, já aqueles transfectados com MCF-7 sem BMP-2 não desenvolveram tumores. Concluíram que a BMP-2, em câncer de mama, estimula a angiogênese, sugerindo que a inibição desta via de sinalização pode ter importante valor terapêutico.

Bieniasz et al. (2009) tentando esclarecer o papel da BMP no desenvolvimento do câncer de pulmão e estabelecer uma provável relação entre essa proteína e fatores de crescimento vasculares na promoção da angiogênese tumoral, estudaram a relação entre a BMP-2 e o VEGF em carcinomas de pulmão. Observaram através da PCR em tempo real uma correlação positiva entre a expressão do RNAm do VEGF e BMP-2 nos tecidos com câncer de pulmão, quando comparados com tecidos de pulmão normal. Concluíram que a BMP-2 pode colaborar com VEGF na promoção do crescimento do tumor ou invasão, estimulando a angiogênese.

Partindo do princípio de que a BMP-2 é uma proteína com várias funções que influencia na diferenciação de muitos tipos celulares, e embora seu efeito esteja limitado ao

tempo de exposição e à concentração, está claro seu envolvimento no desenvolvimento das glândulas mamárias e em eventos da tumorigênese como angiogênese, apoptose, crescimento e migração, foi que Steinert et al.(2008) investigaram a influência da BMP-2 em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), expostas a uma única aplicação de BMP-2 recombinante, comparando com contínuas aplicações de altos níveis dessa mesma BMP-2. Os dados mais relevantes encontrados foram que, em um curto período de exposição constataram que 15 genes associados à apoptose estavam alterados, enquanto que, em período mais prolongado só foram detectados oito genes. Observaram também que houve participação da BMP-2 no processo de migração das células tumorais, independente do tempo de exposição, através de teste de migração celular com Matrigel.

Kim et al. (2004) investigaram o papel dos receptores de BMPs tipo IA, IB e II em 30 espécimes de Carcinoma de Células Intermediárias (CCI) da bexiga urinária. Verificaram que a expressão destes receptores está preferencialmente localizada no epitélio de transição com significativa associação entre a perda de expressão do BMPR-II e o grau de diferenciação do tumor. Seqüencialmente, foi analisada a sensibilidade a BMP-4 e a expressão dos referidos receptores em três linhagens celulares de câncer de bexiga humana (TCC-Sup, RT4 e TSU-Pr1). Demonstraram que esta última (TSU-Pr1), exibiu uma diminuição nos níveis de expressão do BMPR-II, resistente ao efeito inibitório do crescimento pela BMP-4. Esta foi transfectada com um vetor contendo o BMPR-II e, a restituição do mesmo, não só restaurou a responsividade à BMP-4, como reduziu a tumorigenicidade *in vitro*. Portanto, os autores concluíram que a superexpressão do BMPR-II conduz a uma restauração da sinalização da BMP por ser um potente supressor de crescimento tumoral, na linhagem celular, TSU-Pr1, de CCI de bexiga humana.

O papel das BMPs no desenvolvimento de tumores epiteliais ainda é incerto e, por isto, vários estudos têm sido realizados para elucidar os seus mecanismos de atuação nos diversos tecidos do organismo humano. Na cavidade oral, lesões reativas e neoplásicas podem originar-se do epitélio de revestimento, entre estas, destaca-se o CEO (ARAÚJO, 2009).

Jin et al. (2001), procurando estabelecer uma correlação entre a expressão imunistoquímica das BMPs-2/4 e -5 e seu receptor BMPR-IA e, a carcinogênese do epitélio oral, observaram que a intensidade e proporção de células marcadas positivamente estavam aumentadas nos casos de CEO, quando comparadas às do grupo controle (lesões benignas). Porém, no grupo do epitélio adjacente ao carcinoma, estes indicadores apresentaram índices similares aos dos casos de CEO. Analisando a marcação das células metastáticas nos nódulos linfáticos, observaram uma intensidade maior em relação às do tumor primário, fato não

constatado para BMPR-IA. Concluindo assim que, as BMPs-2/4 e -5, podem estar implicadas na metástase do CEO, mas não o seu receptor.

Analisando a expressão da BMP2/4 e de seu receptor BMPR-IA, em 23 espécimes de CEO e 10 espécimes de hiperplasia fibro-epitelial da mucosa oral, utilizados como grupo controle, Soares et al. (2009) observaram uma fraca expressão de ambos os marcadores em células normais, uma forte marcação da BMP2/4 e fraca marcação da BMPR-IA na maioria dos casos do grupo experimental com metástase, podendo, assim, esses resultados ter implicações prognósticas.

Araújo (2009) estudando a marcação imunoistoquímica da BMP-2, seus receptores BMPR-IA e BMPR-II e endoglina em CE de língua, verificou a superexpressão da BMP-2 nos grupos experimentais com metástase e sem metástase, contrastando com a marcação ausente no grupo controle de hiperplasia fibrosa. Este resultado demonstrou a participação desta proteína no carcinoma estudado. Além disto, observou a associação da BMP-2 e o receptor BMPR-IA com o índice angiogênico, mostrando que neste tipo de neoplasia a BMP-2 se apresenta como pró-angiogênico no processo metastático.

**PROPOSIÇÃO**

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este estudo se propõe investigar a expressão imunohistoquímica da BMP-2 e seus receptores BMPR-IA e BMPR-II em carcinomas epidermóides de lábio inferior, objetivando relacionar a intensidade de expressão e a porcentagem de células positivas com aspectos clínico-patológicos (presença e ausência de metástase de linfonodos regionais, TNM e a gradação histológica de malignidade). Com essa avaliação, visa obter informações sobre o comportamento biológico da lesão, na tentativa de conhecer melhor biomarcadores que indiquem o potencial de agressividade possibilitando, assim, melhor vislumbrar o prognóstico da doença, na complexidade que a investigação requer.

**MATERIAIS E MÉTODOS**



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

Esta pesquisa constituiu um estudo imunoistoquímico para análise quantitativa e qualitativa da expressão de BMP-2 e seus receptores BMPR-IA e BMPR-II em uma amostra de casos de CE de lábio inferior, relacionando com aspectos clinico-patológicos.

### **4.2 POPULAÇÃO**

Para o estudo a população foi representada por casos de CE de lábio inferior, registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, Natal-RN, no período de 2004-2007.

### **4.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

A amostra foi constituída de 40 espécimes de CE de lábio inferior, dos quais 20 apresentando metástase linfonodal, confirmados pela histopatologia e 20 isentos de metástase. Os prontuários médicos permaneceram no referido Serviço, assim como, o material biológico resultante da terapêutica cirúrgica instituída. As informações inerentes à idade, sexo, localização anatômica da lesão e TNM foram obtidas dos prontuários.

#### **4.3.1 Critérios de Inclusão da Amostra**

Foram incluídas, ao estudo, as amostras de CE de lábio inferior tratadas primariamente por excisão cirúrgica e, quando com ocorrência de metástase linfonodal regional, estas tenham sido comprovadas histopatologicamente. Só foram considerados os prontuários médicos que continham todos os dados clínicos necessários ao estudo. Para esta pesquisa foram considerados os espécimes que tinham quantidades suficientes de material biológico para análise da gradação histológica de malignidade e estudo imunoistoquímico.

#### **4.3.2 Critérios de Exclusão da Amostra**

Os casos que não se ajustaram às exigências dos critérios de inclusão, foram excluídos da amostra.

#### 4.4 SISTEMA DE ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM)

O Sistema TNM utilizado para classificação dos tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix (França), entre os anos de 1943 e 1952. A partir de 1950, a UICC, juntamente com a OMS, nomearam comitês que aprimoraram este Sistema, o qual se encontra atualmente na sexta edição (MS, 2004).

<b>TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)</b>	
<b>TX</b>	Nenhuma informação disponível sobre o tumor primário
<b>T0</b>	Nenhuma evidência de tumor primário
<b>T1S</b>	Apenas carcinoma <i>in situ</i> em estágio primário
<b>T1</b>	Tumor com menos de 2 cm em seu diâmetro maior
<b>T2</b>	Tumor com cerca de 2 a 4 cm em seu diâmetro maior
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em seu diâmetro maior
<b>T4</b>	Massa tumoral com mais de 4 cm de diâmetro com envolvimento do antro, músculos pterogóides, base da língua ou pele
<b>ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N)</b>	
<b>NX</b>	Nodos não puderam ser ou não foram identificados
<b>N0</b>	Nenhum nodo clinicamente positivo
<b>N1</b>	Um único nodo homolateral clinicamente positivo com menos de 3 cm de diâmetro
<b>N2</b>	N2a – Um único nodo homolateral clinicamente positivo com 3 a 6 cm de diâmetro N2b – Múltiplos nodos homolaterais clinicamente positivos, nenhum com mais de 6 cm de diâmetro.
<b>N3</b>	N3a – Nodo(s) homolateral(is) clinicamente positivo(s), um deles com mais de 6 cm de diâmetro N3b – Nodos bilaterais clinicamente positivos N3c – Nodo(s) contralateral(is) clinicamente positivo(s)
<b>ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES (M)</b>	
<b>MX</b>	Metástases distantes não foram identificadas
<b>M0</b>	Nenhuma evidência de metástase distante
<b>M1</b>	Metástase distante está presente

**Quadro 1.** Sistema de estadiamento clínico do (TNM) para o CEO. **Fonte:** Adaptado do MS, (2004).

<b>ESTÁGIO</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO TNM</b>	<b>TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE 5 ANOS</b>
0	Tis N0 M0	“Não relatado”
I	T1 N0 M0	85%
II	T2 N0 M0	66%
III	T3 N0 M0 ou T1, T2 ou T3, N1 M0	41%
IV	<b>IVA</b> - T1, T2, T3 N2 M0 ou T4a N0, N1, N2 M0 <b>IVB</b> – Qualquer T N3 M0 ou T4b com qualquer N M0 <b>IVC</b> - Qualquer T com qualquer N M1	9%

**Quadro 2.** Categorias de Estadiamento clínico (TNM) para o CEO. **Fonte:** Adaptado do Neville, 2004; Adaptado do MS (2004).

Os dados inerentes ao TNM foram coletados nas fichas clínicas dos pacientes tratados no Hospital Dr. Luiz Antônio, em Natal-RN.

#### 4.5 ESTUDO MORFOLÓGICO

O estudo morfológico utilizou lâminas com cortes de 5µm de espessura do material fixados em formal e incluídos em parafina, corados pela técnica de rotina da Hematoxilina/Eosina. Os espécimes de carcinomas epidermóides de lábio inferior foram examinados à microscopia de luz, com aumentos de 100x e 400x (Microscópio Olympus CH30) para análise da gradação histológica de malignidade, tendo-se como base o sistema de gradação histológica proposto por Bryne (1998) (Quadro 3).

Aspectos Morfológicos	Escore de Malignidade			
	1	2	3	4
<b>Grau de Ceratinização</b>	Altamente ceratinizado (mais de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	Pouco pleomorfismo nuclear (mais de 75% das células maduras)	Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo (25 a 50% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0 a 25% das células maduras)
<b>Padrão de Invasão</b>	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (N>15)	Dissociação celular difusa e pronunciada, em pequenos grupos e/ou células individuais (N<15)
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

**Quadro 3.** Sistema de Gradação Histológica de malignidade no “*front de invasão*” proposto por Bryne (1998).

Com o intuito de categorizar os casos de CEs de lábio inferior em baixo e alto grau de malignidade, os escores obtidos em cada parâmetro morfológico avaliado, foram somados, obtendo-se o escore final para o espécime em questão. Diferentemente do proposto por Bryne (1998), foi utilizada a adaptação realizada Miranda (2002) e citado por Silveira et al. (2009), classificando como tumores de baixo grau de malignidade aqueles que obtiveram escore igual ou menor que 8, e como tumores de alto grau de malignidade, àqueles que demonstraram escore igual ou maior que 9.

## 4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

### 4.6.1 Técnica

A amostra para o estudo, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes de 3µm de espessura e estendida em lâmina de vidro, devidamente preparada com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, *Sigma Chemical CO, USA*). Posteriormente, os espécimes foram submetidos a técnica da estreptoavidina-biotina (*SABC, streptoavidin-biotin complex*) utilizando anticorpos policlonais anti-BMP2, anti-BMPR-IA e anti-BMPR-II.

A técnica utilizada obedeceu os passos que se seguem:

- ⇒ Desparafinização – realizada com 2 banhos em xilol, sendo o primeiro banho à temperatura de 60°C, durante 30 minutos e, o segundo, à temperatura ambiente, por 20 minutos;
- ⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos),
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos),
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos),
  - Álcool etílico absoluto IV (5 minutos),
  - Álcool etílico 95°GL (5 minutos),
  - Álcool etílico 80°GL (5 minutos),
- ⇒ Imersão em solução de Hidróxido de Amônia a 10 % durante 10 minutos, à temperatura ambiente, para remoção do pigmento formólico;
- ⇒ Lavagem do material em água corrente por 10 minutos e duas passagens por água destilada deionizada;
- ⇒ Recuperação antigênica (Quadro 4);
- ⇒ Passagem em água corrente durante 10 minutos;
- ⇒ Imersão em água destilada 2 vezes, com tempo de 5 minutos cada;
- ⇒ Duas incubações dos cortes, pelo período de 15 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, em uma proporção de 1/ 1 para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- ⇒ Lavagem em água corrente durante 10 minutos;
- ⇒ Imersão em água destilada 2 vezes, com tempo de 5 minutos cada;

- ⇒ Duas imersões em solução de Tween 20 a 1 % em TRIS-HCL pH 7.4, durante 5 minutos cada;
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpos primários diluídos em solução BSA a 1 %, em TRIS-HCL pH 7.4;
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1 % em TRIS-HCl pH 7.4, por 5 minutos cada;
- ⇒ Incubação com o anticorpo secundário (*Biotintylated link universal – DAKO*);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1 % em TRIS-HCl pH 7.4, por 5 minutos cada;
- ⇒ Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina (*DAKO, A/S, Glostrup, Denmark*) na diluição de 1/ 100, durante 30 minutos à temperatura ambiente;
- ⇒ Duas incubações em TRIS-HCl, durante 5 minutos cada;
- ⇒ Aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB), durante 3 minutos, diluído em TRIS-HCL (pH 7.4) e ativado pelo peróxido de hidrogênio 10 volumes a 0,3 %;
- ⇒ Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- ⇒ Contra-coloração utilizando hematoxilina de Mayer, durante 10 minutos;
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
  - Álcool etílico 80°GL (3 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (3 minutos);
  - Álcool etílico absoluto I (3 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (3 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (3 minutos);
- ⇒ Imersão em Xilol I (5 minutos);
- ⇒ Imersão em Xilol II (5 minutos);
- ⇒ Montagem da lamínula contra a lâmina com resina *Permound® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)* para observação ao microscópio de luz.

Clone	Especificidade	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
N-14	BMP-2*	1:50	Citrato, pH 6.0 panela pascal, 10 min	<i>Overnight</i> (18h) a 4°C
AF 346	BMPR-IA**	1:50	Tripsina 0,1% e CaCl <sub>2</sub> 0,1% em TRIS, 30' a 37°C	<i>Overnight</i> (18h) a 4°C
AF 811	BMPR-II**	1:100	Tris-EDTA, panela pascal, 10 min	<i>Overnight</i> (18h) a 4°C

**Quadro 4.** Clone, especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados. \* *Santa Cruz Biothecnology, Inc.* \*\* *R&D Systems, Inc., USA* \*\*\**Alpha Diagnostic Int. Inc.*

#### 4.6.2. Análise do Perfil Imunoistoquímico

A imunorreatividade das proteínas BMP-2, BMPR-IA e BMP-II foi analisada em estudo duplo-cego de forma qualitativa e semi-quantitativa, por dois avaliadores, apenas no componente epitelial de todo *front* invasivo dos espécimes selecionados. Estes foram distendidos em lâminas histológicas e observados com auxílio de microscópio de luz.

Os aspectos analisados nas referidas lesões foram:

- Intensidade da expressão de acordo com os seguintes escores: (Adaptado de Soares et al., 2009)

**Escores: 1 - Ausente/ Fraca**

**2 - Forte**

- Porcentagem de células positivas: (Adaptado de Lopes et al., 2009)

**Escores: 1 - 0 – 50% de células positivas**

**2 - 51 - 75% de células positivas**

**3 - mais de 75% de células positivas**

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise estatística com o objetivo de testar as hipóteses levantadas. Utilizou-se, para este fim, o software SPSS (*Statistical for Social Science version 17.0 for Windows® XP*, Chicago Illinois USA).

A análise dos aspectos clínicos e morfológicos, bem como o padrão de intensidade das proteínas estudadas, foi feito através do teste não paramétrico Qui-quadrado, com nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ).

Para análise da porcentagem de células positivas em relação aos aspectos clinicopatológicos, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ).

#### 4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte Rio-grandense Contra o Câncer (LNRCC), onde obteve parecer de número 001/001/2008 (ANEXO) favorável a sua execução. Os sujeitos desta pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido dando ciência de sua participação no estudo (APÊNDICE).



**RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas obtidas dos 40 prontuários pesquisados mostraram que os pacientes, no momento do diagnóstico, tinham idades situados entre 29 e 97 anos, com uma média de 65,8 anos. A maioria dos casos foi identificada em pacientes do sexo masculino (72,5%) (Tabela 1), estabelecendo-se uma proporção homem: mulher de 2,63:1.

No grupo dos carcinomas de lábio inferior sem metástase, os pacientes apresentaram idades entre 29 a 84 anos, com uma média de 62,4 anos. A faixa etária mais prevalente foi entre 70 e 79 anos (30%) e o sexo masculino foi o mais acometido, com 15 casos (75%). Já no grupo dos carcinomas com metástase regional, a idade dos pacientes variou de 42 a 97 anos, com uma média de 69,2 anos. A faixa etária mais prevalente foi entre 80 e 89 anos (30%). De forma similar ao observado para o grupo de carcinomas sem metástase, a maioria dos casos pertencentes ao grupo dos carcinomas com metástase foi diagnosticada em pacientes do sexo masculino (70%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, segundo sexo e faixa etária dos pacientes. Natal-RN, 2010.

Dados Clínicos	Carcinoma sem metástase		Carcinoma com metástase		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Sexo</b>						
Feminino	5	25	6	30	11	27,5
Masculino	15	75	14	70	29	72,5
Total	20	100	20	100	40	100
<b>Faixa etária</b>						
20 – 29 anos	1	5	0	0	1	2,5
30 – 39 anos	1	5	0	0	1	2,5
40 – 49 anos	2	10	3	15	5	12,5
50 – 59 anos	3	15	4	20	7	17,5
60 – 69 anos	5	25	1	5	6	15
70 – 79 anos	6	30	5	25	11	27,5
80 – 89 anos	2	10	6	30	8	20
90 – 99 anos	0	0	1	5	1	2,5
Total	20	100	20	100	40	100

Em relação ao estadiamento clínico, considerando todos os 40 casos avaliados, foi possível observar um discreto predomínio de casos no estágio II (30%), seguido dos estágios III (27,5%) e IV (27,5%). A análise isolada do grupo de carcinomas sem metástase

demonstrou um predomínio do estágio II (60%). Por sua vez, para o grupo de carcinomas com metástase, foi possível observar um discreto predomínio do estágio IV (55%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, segundo o estadiamento clínico. Natal-RN, 2010

Estadiamento Clínico	Carcinoma sem metástase		Carcinoma com metástase		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Estágio I</b>	6	30	0	0	6	15
<b>Estágio II</b>	12	60	0	0	12	30
<b>Estágio III</b>	2	10	9	45	11	27,5
<b>Estágio IV</b>	0	0	11	55	11	27,5
<b>Total</b>	20	100	20	100	40	100

## 5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Os aspectos morfológicos dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior pesquisados exibiram características inerentes ao CEO, tais como invasão do tecido conjuntivo em ninhos ou pequenos grupamentos de células epiteliais malignas que exibiam alteração da relação núcleo/citoplasma, mitoses típicas e atípicas, hiperchromatismo nuclear, nucléolos proeminentes e pleomorfismo nuclear e celular. Os escores dos parâmetros morfológicos utilizados para a gradação histológica de malignidade, o escore total e a gradação final de cada caso estão demonstrados na tabela 3 e 4.

**Tabela 3.** Análise morfológica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior sem metástase. Natal-RN, 2010.

Caso	Aspectos Morfológicos				Escore total	Gradação
	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório		
01	3	3	2	1	9	Alto grau
02	2	3	2	1	8	Baixo grau
03	1	2	2	1	6	Baixo grau
04	3	2	3	2	10	Alto grau
05	2	3	1	2	8	Baixo grau
06	3	2	3	2	10	Alto grau
07	2	2	3	1	8	Baixo grau
08	1	2	2	1	6	Baixo grau
09	1	2	2	1	6	Baixo grau
10	3	2	2	1	8	Baixo grau
11	2	1	3	2	8	Baixo grau
12	4	3	4	2	13	Alto grau
13	1	2	2	1	6	Baixo grau

**Tabela 3.** Análise morfológica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior sem metástase. Natal-RN, 2010. (Continuação)

Caso	Aspectos Morfológicos				Escore total	Gradação
	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório		
14	1	3	2	1	7	Baixo grau
15	3	3	1	1	8	Baixo grau
16	1	2	2	1	6	Baixo grau
17	1	2	2	1	6	Baixo grau
18	4	2	3	1	10	Alto grau
19	2	2	2	2	8	Baixo grau
20	2	2	1	2	7	Baixo grau

**Tabela 4.** Análise morfológica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior com metástase linfonodal regional. Natal-RN, 2010.

Caso	Aspectos Morfológicos				Escore total	Gradação
	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório		
21	4	3	3	3	13	Alto grau
22	2	4	3	1	10	Alto grau
23	4	2	2	2	10	Alto grau
24	2	3	3	1	9	Alto grau
25	3	3	2	1	9	Alto grau
26	4	3	2	1	10	Alto grau
27	2	1	2	1	6	Baixo grau
28	2	1	2	2	7	Baixo grau
29	2	2	2	1	7	Baixo grau
30	3	2	3	2	10	Alto grau
31	4	1	3	2	9	Alto grau
32	4	3	2	1	10	Alto grau
33	4	3	4	1	12	Alto grau
34	4	2	1	2	9	Alto grau
35	3	2	2	1	8	Baixo grau
36	1	3	2	1	7	Baixo grau
37	3	3	3	2	11	Alto grau
38	4	3	4	1	12	Alto grau
39	2	2	2	1	7	Baixo grau
40	4	3	4	1	12	Alto grau

Pode-se verificar, quanto à gradação histológica de malignidade, que dos 40 casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior estudados, 21 casos (52,5 %) foram classificados como de baixo grau de malignidade (Figura 2) e 19 (47,5%) como de alto grau de malignidade (Figura 3).

A análise isolada do grupo dos carcinomas com metástase revelou uma maior proporção (70%) de lesões com alto grau histológico de malignidade. Por sua vez, a maioria dos casos (75%) pertencentes ao grupo de carcinomas sem metástase exibiu baixo grau histológico de malignidade. O teste não-paramétrico do Qui-quadrado revelou associação estatisticamente significativa entre o alto grau histológico de malignidade das lesões e a presença de metástase ( $p=0,004$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do grau histológico de malignidade do tumor em relação à presença ou ausência de metástase. Natal-RN, 2010

Metástase	Grau histológico		Total n (%)	$\chi^2$	P
	Baixo n (%)	Alto n (%)			
<b>Ausência</b>	15 (75,0)	5 (25,0)	20 (100,0)	8,120	0,004
<b>Presença</b>	6 (30,0)	14 (70,0)	20 (100,0)		

Quando relacionado o estadiamento clínico e a gradação histológica de malignidade das lesões, observou-se que 5 casos (83%) de carcinomas se enquadravam no estágio I, foram classificados em carcinoma de baixo grau; no estágio II, foram 8 casos (66,7%) também de baixo grau. Os casos de carcinoma no estágio III, 8 casos (72,7%) foram de alto grau e no estágio IV, 6 casos (54,5%) de alto grau (Tabela 6).

**Tabela 6.** Distribuição absoluta e relativa do estadiamento clínico em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010

Estadiamento	Grau histológico		Total n (%)
	Baixo n (%)	Alto n (%)	
<b>Estágio I</b>	5 (83)	1 (17)	6 (100)
<b>Estágio II</b>	8 (66,7)	4 (33,3)	12 (100)
<b>Estágio III</b>	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100)
<b>Estágio IV</b>	5 (45,5)	6 (54,5)	11 (100)

Com intuito de verificar possíveis diferenças na gradação histológica de malignidade das lesões em relação ao estadiamento clínico, os casos pertencentes aos estágios I e II foram reunidos em um único grupo. De forma similar, os casos que pertenciam aos estágios III e IV, foram agrupados em uma única categoria. Após esta recategorização, observou-se uma maior proporção de lesões com baixo grau histológico de malignidade (61,9%) no grupo constituído pelos estágios I e II. Por sua vez, a maioria dos casos com alto grau histológico de malignidade (73,7%) foi identificada no grupo correspondente aos estágios III e IV. O teste não-paramétrico do Qui-quadrado demonstrou associação estatisticamente significativa do

alto grau histológico de malignidade das lesões com estágios clínicos mais avançados ( $p=0,024$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do estadiamento clínico em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal- RN,2010

Grau histológico	Estadiamento clínico		Total n (%)	$\chi^2$	P
	Estágio I/ II n (%)	Estágio III/ IV n (%)			
Baixo	13 (61,9)	8 (38,1)	21 (100,0)	5,105	0,024
Alto	5 (26,3)	14 (73,7)	19 (100,0)		

### 5.3 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

As características da expressão das proteínas BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II estão descritas abaixo e correspondem àquelas observadas no *front* de invasão tumoral dos 40 casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior estudados, conforme citado previamente na metodologia.

Em relação à BMP-2, a análise da intensidade da imunomarcacão revelou um padrão forte em 33 casos (82,5%) (Figura 4) e ausente/ fraca em 7 casos (17,5%). Na análise semi-quantitativa, 31 casos (77,5%) exibiram mais de 75% das células positivas (escore 3), 8 casos (20%) revelaram entre 51-75% das células positivas (escore 2) e apenas 1 caso (2,5%) apresentou entre 0-50% das células positivas (escore 1).

Para a BMPR-IA, 22 casos (55%) apresentaram intensidade de imunomarcacão ausente/ fraca (Figura 6) e 18 casos (45%) demonstraram forte marcação. Em relação à análise semi-quantitativa, de forma similar ao observado para a BMP-2, 31 casos (77,5%) exibiram mais de 75% das células positivas (escore 3), 8 casos (20%) apresentaram entre 51-75% das células positivas (escore 2) (Figura 5) e apenas 1 caso (2,5%) apresentou entre 0-50% das células positivas (escore 1).

Por sua vez, a avaliação da intensidade de imunomarcacão para a BMPR-II revelou 32 casos (80%) com intensidade ausente/ fraca e 8 casos (20%) com intensidade forte. Em relação ao percentual de células positivas, 31 casos (77,5%) apresentaram mais de 75% das células positivas (escore 3), 6 casos (15%) demonstraram entre 51-75% das células positivas (escore 2) e 3 casos (7,5%) revelaram entre 0-50% das células positivas (escore 1) (Figura 6).

A análise da intensidade da expressão imunoistoquímica, bem como o percentual de células positivas para as proteínas BMP-2, BMPR-IA, BMPR-II foi efetuada, com o objetivo de avaliar se existe relação entre o padrão de expressão dessas proteínas e a presença de

metástase regional, estadiamento clínico e gradação histológica de malignidade, conforme a metodologia previamente descrita.

### 5.3.1 Quanto à presença de metástase regional

Analisando a intensidade da expressão relacionada com a presença e ausência de metástase regional, pode-se observar que a BMP-2 apresentou uma predominância no padrão de intensidade forte tanto no grupo sem metástase, com 16 casos (80%), como no grupo com metástase, com 17 casos (85%). Para a BMPR-IA, verificou-se que o grupo sem metástase demonstrou um padrão de intensidade ausente/ fraca em 17 casos (85%) e, o grupo com metástase, um padrão de intensidade forte, com 15 casos (75%). Em relação à BMPR-II, ambos os grupos apresentaram a mesma predominância no padrão de intensidade ausente/ fraca, com 16 casos (80%) em cada grupo. A análise estatística com o teste não-paramétrico do Qui-quadrado revelou associação estatisticamente significativa entre a forte expressão imunohistoquímica de BMP-2 nas lesões do estudo e a presença de metástase regional ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunohistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010

Marcador	Metástase	Intensidade de expressão		Total n (%)	$\chi^2$	p*
		Ausente/ Fraca n (%)	Forte n (%)			
BMP-2	Ausência	4 (20,0)	16 (80,0)	20 (100,0)	0,173	0,677
	Presença	3 (15,0)	17 (85,0)	20 (100,0)		
BMPR-IA	Ausência	17 (85,0)	3 (15,0)	20 (100,0)	14,545	<0,001
	Presença	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)		
BMPR-II	Ausência	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (100,0)	0,000	1,000
	Presença	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (100,0)		

Quando relacionamos o percentual de células positivas com a presença e ausência de metástase regional, todos os marcadores, independentes dos grupos (com e sem metástase), apresentaram predominância no percentual de mais de 75% das células positivas (score 3).

Para a BMP-2, os 15 casos (75%) do grupo sem metástase e 16 casos (80%) do grupo com metástase apresentaram mais de 75% das células positivas (score 3). Em relação a BMPR-IA, de forma similar ao constatado para a BMP-2, os 15 casos (75%) do grupo sem metástase e 16 casos (80%) do grupo com metástase revelaram mais de 75% das células positivas. Por fim, a maioria dos casos (65%) do grupo sem metástase e a maior proporção

dos casos (90%) do grupo com metástase, exibiram mais de 75% das células positivas para BMPR-II (Tabela 9).

**Tabela 9.** Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo a presença e ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010

Marcador	Metástase	Percentual de células positivas			Total n (%)
		0-50% n (%)	51-75% n (%)	> 75% n (%)	
<b>BMP-2</b>	Ausente	1(5,0)	4 (20)	15 (75)	20 (100)
	Presente	0 (0,0)	4 (20)	16 (80)	20 (100)
<b>BMPR-IA</b>	Ausente	1 (5)	4 (20)	15 (75)	20 (100)
	Presente	0 (0,0)	4 (20)	16 (80)	20 (100)
<b>BMPR-II</b>	Ausente	3 (15)	4 (20)	13 (65)	20 (100)
	Presente	0 (0,0)	2 (10)	18 (90)	20 (100)

A análise comparativa do percentual de células positivas entre os grupos com e sem metástase regional, realizada por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, revelou diferença estatisticamente significativa apenas para a BMPR-II ( $p=0,049$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal-RN, 2010

Marcador	Metástase	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	P
<b>BMP-2</b>	Ausência	20	3	2,25 – 3	19,90	398,00	188,00	0,655
	Presença	20	3	3 – 3	21,10	422,00		
<b>BMPR-IA</b>	Ausência	20	3	2,25 – 3	19,90	398,00	188,00	0,655
	Presença	20	3	3 – 3	21,10	422,00		
<b>BMPR-II</b>	Ausência	20	3	2 – 3	17,85	357,00	147,00	0,049
	Presença	20	3	3 – 3	23,15	463,00		

### 5.3.2 Quanto ao estadiamento clínico

Na distribuição absoluta e relativa da intensidade de expressão imunoistoquímica em relação ao estadiamento, pode-se observar que, para a BMP-2, predominou um padrão de intensidade forte em todos os estágios (Tabela 11). Para a BMPR-IA, todos os casos (100%) classificados no estágio I e a maioria dos casos (83,3%) classificados no estágio II, apresentaram padrão de intensidade ausente/ fraca. Por sua vez, a maioria dos casos pertencentes aos estágios III (63,3%) e IV (81,1%), exibiu forte expressão de BMPR-IA. Em relação a BMPR-II, os casos classificados como estágio I apresentaram a mesma distribuição em ambos os padrões de intensidade, ao passo que, os demais estágios, exibiram predomínio do padrão de intensidade ausente/ fraca (Tabela 11).



**Tabela 11.** Distribuição absoluta e relativa da intensidade de expressão imunistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010

Marcador	Estadiamento	Intensidade de expressão		Total n (%)
		Ausente/ Fraca n (%)	Forte n (%)	
<b>BMP-2</b>	Estágio I	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100)
	Estágio II	1 (8,3)	11(91,7)	12(100)
	Estágio III	4 (36,4)	7 (63,6)	11(100)
	Estágio IV	0 (0,0)	11 (100)	11(100)
<b>BMPR-IA</b>	Estágio I	6 (100)	0 (0,0)	6 (100)
	Estágio II	10 (83,3)	2 (16,7)	12(100)
	Estágio III	4 (36,4)	7 (63,6)	11(100)
	Estágio IV	2 (18,2)	9 (81,8)	11(100)
<b>BMPR-II</b>	Estágio I	3 (50)	3 (50)	6 (100)
	Estágio II	11 (91,7)	1 (8,3)	12(100)
	Estágio III	8 (72,7)	3 (27,3)	11(100)
	Estágio IV	10 (90,9)	1 (9,1)	11(100)

Com intuito de verificar possíveis diferenças na intensidade de expressão das proteínas estudadas em relação ao estadiamento clínico, os casos pertencentes aos estágios I e II foram reunidos em um único grupo. De forma similar, os casos que pertenciam aos estágios III e IV foram agrupados em uma única categoria. O teste não-paramétrico do Qui-quadrado revelou associação estatística significativa apenas para a BMPR-IA ( $p < 0,001$ ), onde 88,9% dos casos do grupo constituído pelos estágios I e II apresentaram intensidade de expressão ausente/ fraca e 72,7% dos casos pertencentes ao grupo constituído pelos estágios III e IV apresentaram um forte expressão desta proteína (Tabela 12).

**Tabela 12.** Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010

Marcador	Estadiamento	Intensidade de expressão		Total n (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
		Ausente/ Fraca n (%)	Forte n (%)			
<b>BMP-2</b>	Estágio I/ II	3 (16,7)	15 (83,3)	18 (100,0)	0,016	0,900
	Estágio III/ IV	4 (18,2)	18 (81,8)	22 (100,0)		
<b>BMPR-IA</b>	Estágio I/ II	16 (88,9)	2 (11,1)	18 (100,0)	15,186	<0,001
	Estágio III/ IV	6 (27,3)	16 (72,7)	22 (100,0)		
<b>BMPR-II</b>	Estágio I/ II	14 (77,8)	4 (22,2)	18 (100,0)	0,101	0,751
	Estágio III/ IV	18 (81,8)	4 (18,2)	22 (100,0)		

Na tabela 13 pode-se observar o percentual de células positivas em relação com estadiamento clínico. A BMP-2 e a BMPR-IA apresentaram a maioria dos casos, independente do seu estadiamento, com mais de 75% das células positivas (score 3). Ainda para essas proteínas, no percentual de 0-50% (score 1), não foi encontrado nenhum caso nos

estágios I, III e IV. A BMPR-II também apresenta a predominância dos casos com mais de 75% das células positivas (escore 3) e no estágio IV nenhum caso foi encontrado no percentual 0-50% das células positivas (escore 1).

**Tabela 13.** Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo o estadiamento clínico. Natal-RN, 2010

Marcador	Estadiamento	Percentual de células positivas			Total n (%)
		0-50% n (%)	51-75% n (%)	> 75% n (%)	
<b>BMP-2</b>	Estágio I	0 (0,0)	3 (50)	3 (50)	6 (100)
	Estágio II	1 (8,3)	1 (8,3)	10 (83,3)	12(100)
	Estágio III	0 (0,0)	1 (9,1)	10 (90,9)	11(100)
	Estágio IV	0 (0,0)	3 (27,3)	8 (72,7)	11(100)
<b>BMPR-IA</b>	Estágio I	0 (0,0)	3 (50)	3 (50)	6 (100)
	Estágio II	1 (8,3)	1 (8,3)	10 (83,3)	12(100)
	Estágio III	0 (0,0)	3 (27,3)	8 (72,7)	11(100)
	Estágio IV	0 (0,0)	1 (9,1)	10 (90,9)	11(100)
<b>BMPR-II</b>	Estágio I	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,6)	6 (100)
	Estágio II	1 (8,3)	3 (25)	8 (66,7)	12(100)
	Estágio III	1 (9,1)	1 (9,1)	9 (81,8)	11(100)
	Estágio IV	0 (0,0)	1 (9,1)	10 (90,9)	11(100)

Com intuito de verificar possíveis diferenças no percentual de células positivas às proteínas estudadas em relação ao estadiamento clínico, os casos pertencentes aos estágios I e II foram reunidos em um único grupo. Por sua vez, os casos que pertenciam aos estágios III e IV foram agrupados em uma única categoria. Após aplicação do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das proteínas estudadas (Tabela 14).

**Tabela 14.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao estadiamento clínico. Natal-RN, 2010

Marcador	Estadiamento	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
<b>BMP-2</b>	Estágio I/ II	18	3	2 – 3	19,33	348,00	177,00	0,432
	Estágio III/ IV	22	3	3 – 3	21,45	472,00		
<b>BMPR-IA</b>	Estágio I/ II	18	3	2 – 3	19,33	348,00	177,00	0,432
	Estágio III/ IV	22	3	3 – 3	21,45	472,00		
<b>BMPR-II</b>	Estágio I/ II	18	3	2 – 3	18,33	330,00	159,00	0,146
	Estágio III/ IV	22	3	3 – 3	22,27	490,00		

### 5.3.3 Quanto à gradação histológica de malignidade

De acordo com a distribuição absoluta e relativa da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao grau histológico de malignidade do tumor, é possível evidenciar que, para a proteína BMP-2, houve uma predominância do padrão de intensidade forte tanto nos carcinomas de baixo grau de malignidade (81%) como nas lesões de alto grau (84,2%) (Tabela 15). Com relação à BMPR-IA, a maioria dos carcinomas de baixo grau de malignidade (71,4%) apresentou padrão de intensidade ausente/ fraca, ao passo que a maior proporção das lesões de alto grau de malignidade (63,2%) revelou padrão de intensidade forte. Para a BMPR-II, a maioria dos carcinomas de baixo grau de malignidade (81%) e dos carcinomas de alto grau (78,9%) apresentou padrão de intensidade ausente/ fraca.

O teste não-paramétrico do Qui-quadrado demonstrou associação estatisticamente significativa do alto grau histológico de malignidade das lesões com a forte expressão de BMPR-IA ( $p=0,028$ ) (Tabela 15). Por sua vez, para a BMP-2 e BMPR-II, não houve associação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão e o grau histológico de malignidade das lesões ( $p>0,05$ ).

**Tabela 15.** Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da intensidade de expressão imunoistoquímica de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010

Marcador	Grau histológico	Intensidade de expressão		Total n (%)	$\chi^2$	P
		Ausente/ Fraca n (%)	Forte n (%)			
<b>BMP-2</b>	Baixo	4 (19,0)	17 (81,0)	21 (100,0)	0,073	0,787
	Alto	3 (15,8)	16 (84,2)	19 (100,0)		
<b>BMPR-IA</b>	Baixo	15 (71,4)	6 (28,6)	21 (100,0)	4,821	0,028
	Alto	7 (36,8)	12 (63,2)	19 (100,0)		
<b>BMPR-II</b>	Baixo	17 (81,0)	4 (19,0)	21 (100,0)	0,025	0,874
	Alto	15 (78,9)	4 (21,1)	19 (100,0)		

Na tabela 16, são apresentados os resultados obtidos com a análise do percentual de células positivas às proteínas estudadas em relação ao grau histológico de malignidade das lesões. Para todos os marcadores, independente da gradação histológica dos carcinomas estudados, a maioria dos casos apresentou mais de 75% das células positivas (escore 3).

A BMP-2 exibiu o mais de 75% das células positivas (escore 3) em 15 casos (71,4%) dos carcinomas de baixo grau e em 16 casos (84,2%) dos carcinomas de alto grau. Em relação à BMPR-IA, verificou-se que 18 casos (85,7%) de carcinomas de baixo grau possuíam mais de 75% das células positivas (escore 3), enquanto que 13 casos (68,4%) de

alto grau, também exibiam o mesmo escore. Por fim, para a BMPR-II, 16 casos (76,2%) de baixo grau e 15 casos (78,9%) de alto grau de malignidade, revelaram mais de 75% das células positivas (escore 3).

**Tabela 16.** Número de casos de carcinoma epidermóide de lábio inferior, quanto ao percentual de células positivas, segundo a gradação histológica de malignidade. Natal-R, 2010

Marcador	Grau histológico	Percentual de células positivas			Total n (%)
		0-50% n (%)	51-75% n (%)	> 75% n (%)	
<b>BMP-2</b>	Baixo	0 (0,0)	6 (28,6)	15 (71,4)	21 (100)
	Alto	1 (5,3)	2 (10,5)	16 (84,2)	19 (100)
<b>BMPR-IA</b>	Baixo	0 (0,0)	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100)
	Alto	1 (5,3)	5 (26,3)	13 (68,4)	19 (100)
<b>BMPR-II</b>	Baixo	2 (9,5)	3 (14,3)	16 (76,2)	21 (100)
	Alto	1 (5,3)	3 (15,8)	15 (78,9)	19 (100)

A análise de possíveis diferenças no percentual de células positivas em relação à gradação histológica de malignidade dos tumores, por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, este não revelou diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das proteínas estudadas (Tabela 17).

**Tabela 17.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o percentual de células positivas para BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II, em relação ao grau histológico de malignidade do tumor. Natal-RN, 2010

Marcador	Grau histológico	n	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
<b>BMP-2</b>	Baixo	21	3	2 – 3	19,43	408,00	177,00	0,401
	Alto	19	3	3 – 3	21,68	412,00		
<b>BMPR-IA</b>	Baixo	21	3	3 – 3	22,21	466,50	163,50	0,179
	Alto	19	3	2 – 3	18,61	353,50		
<b>BMPR-II</b>	Baixo	21	3	2,5 – 3	20,17	423,50	192,50	0,795
	Alto	19	3	3 – 3	20,87	396,50		

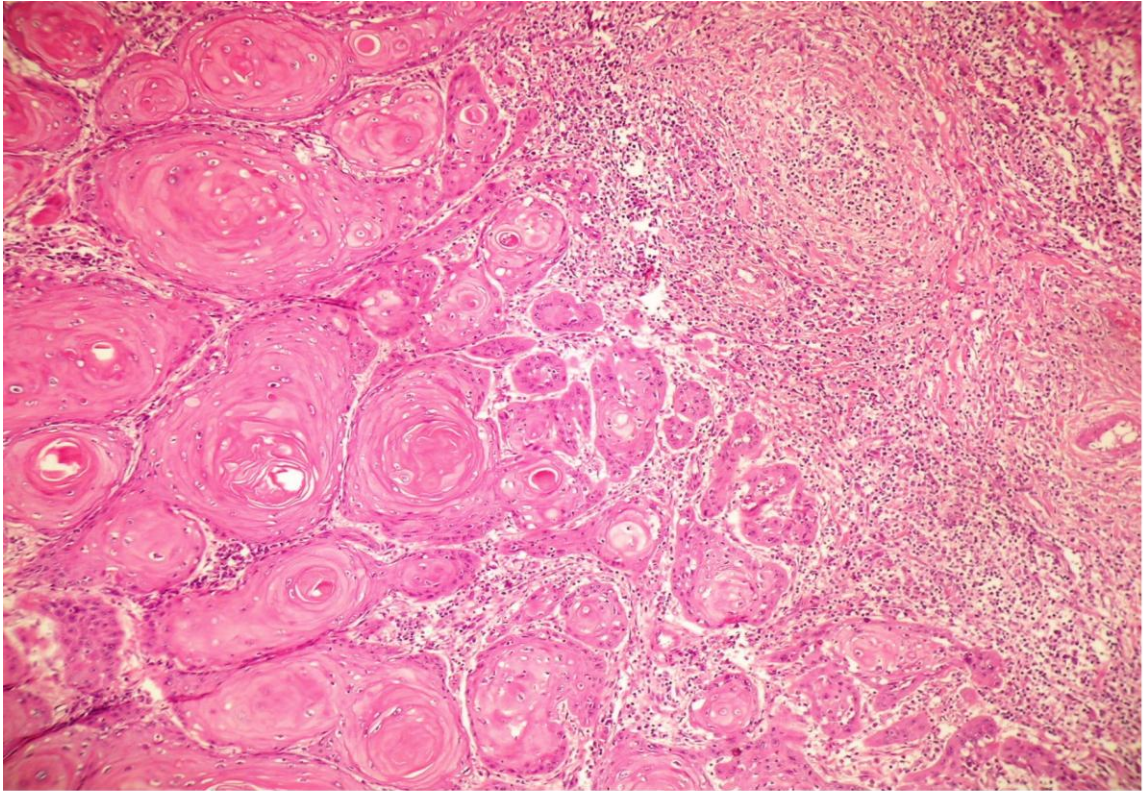


Figura 2 – CE de lábio inferior de baixo grau de malignidade. (H/E 200×)

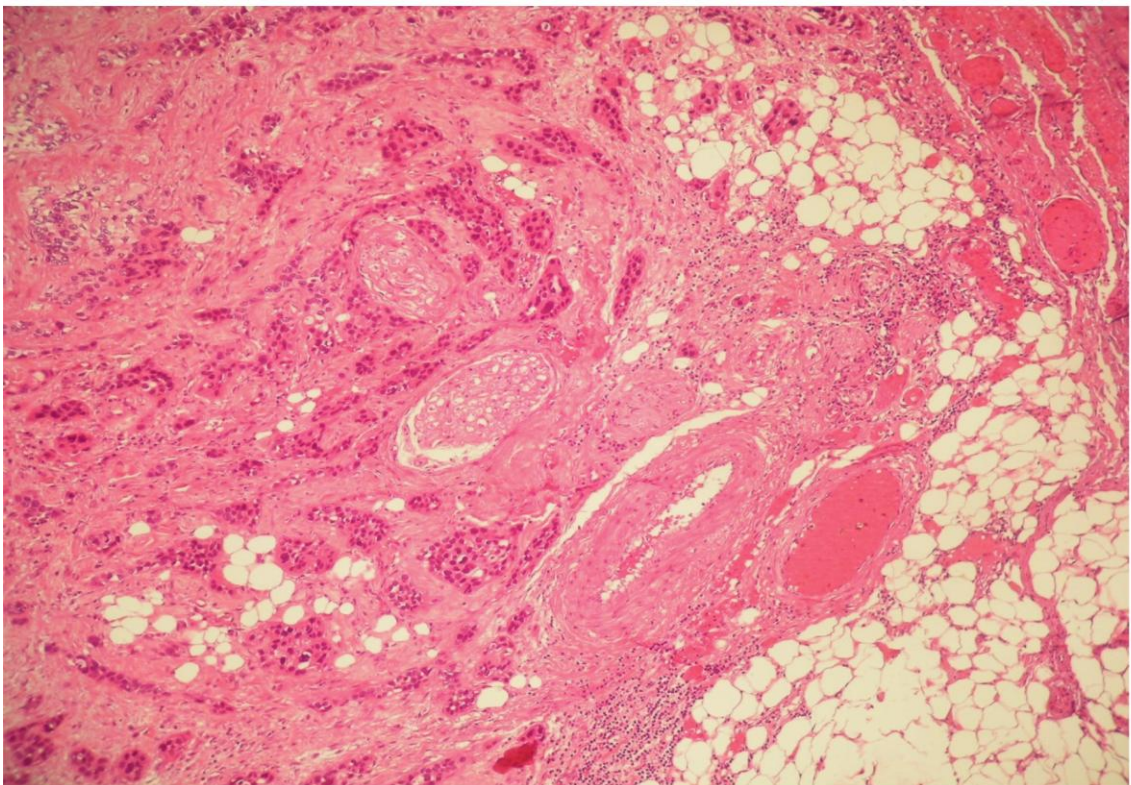


Figura 3 – CE de lábio inferior de alto grau de malignidade (H/E 200×).

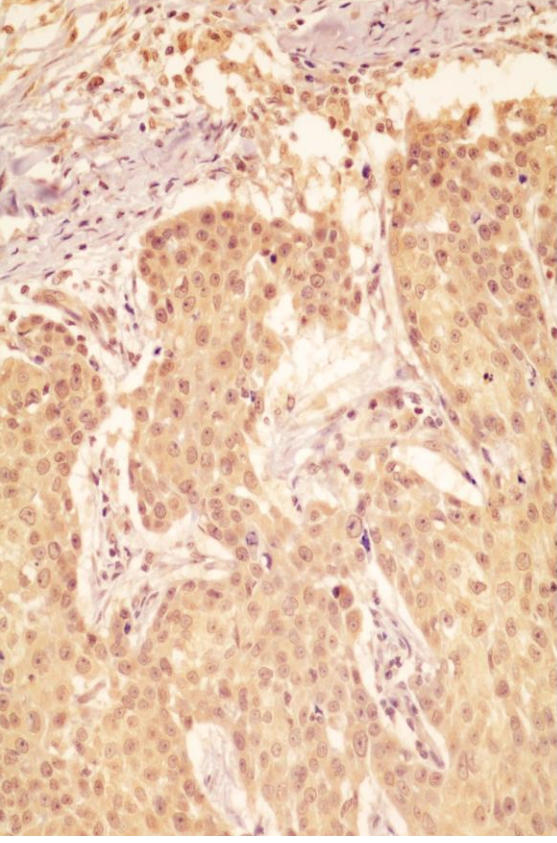


Figura 4 - tForte expressão da BMP-2 em CE de lábio inferior e mais de 75% das células positivas (LSAB 400x) e expressão da

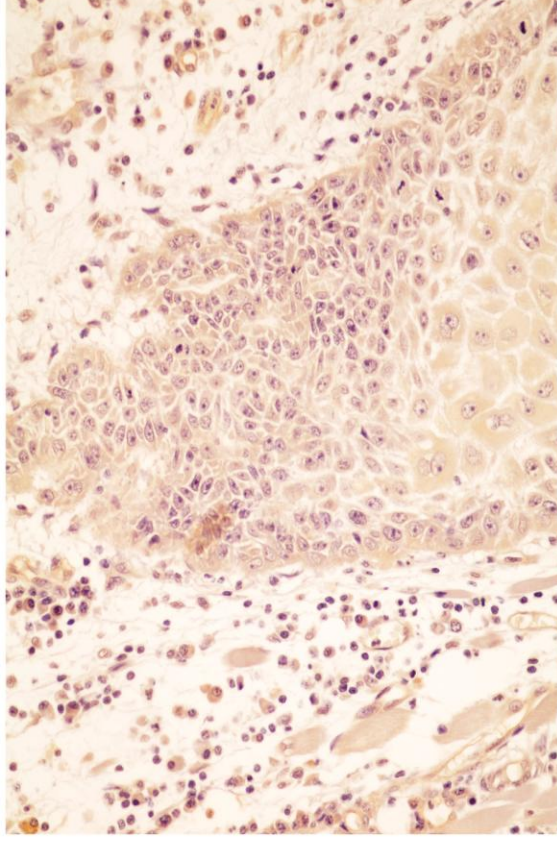


Figura 5 -Fraca expressão da BMPR-IA em CE de lábio inferior e mais de 75% das células positivas (LSAB 400x).

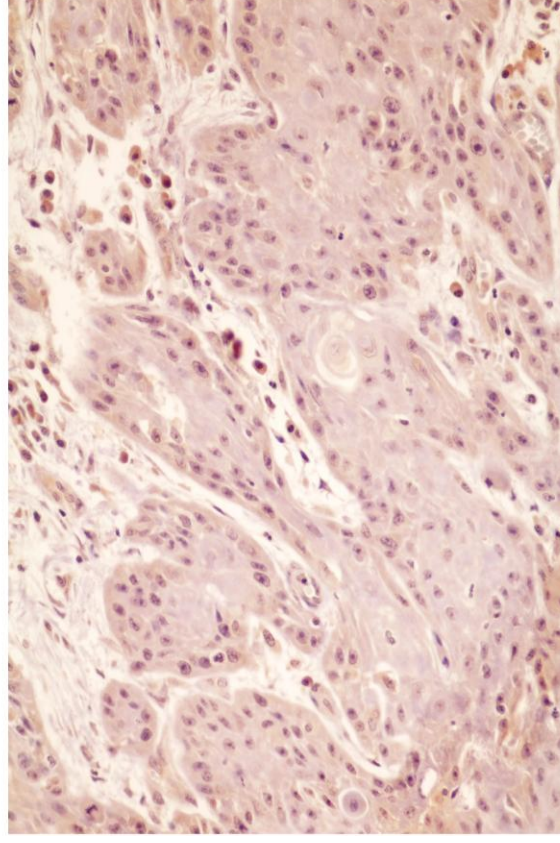


Figura 6 - tFraca expressão da BMPR-II em CE de lábio inferior e 0 a 50% das células positivas (LSAB 400x).

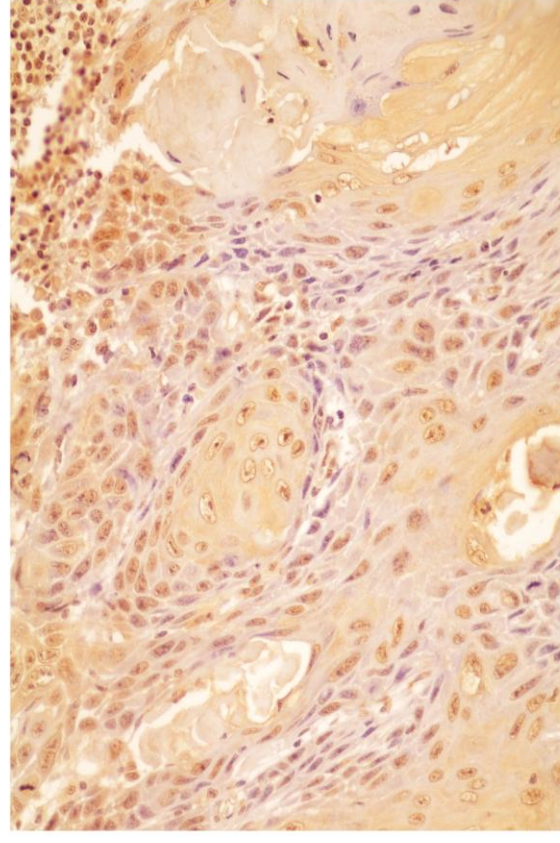


Figura 7 -Forte expressão da BMPR-II em CE de lábio inferior e 51 a 75% das células positivas (LSAB 400x).

## **DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

O CE é o câncer mais comum da região de cabeça e pescoço, sendo considerado como um dos problemas de saúde pública (MORSELLI et al., 2008). Segundo Manuel et al. (2003) e O'Regan et al. (2006), o CEO compreende cerca de 90% de todos os cânceres de boca, sendo este considerado um tipo de câncer agressivo, com taxa de sobrevida de 5 anos em apenas 56% dos casos.

O CE de lábio inferior é um dos mais freqüentes tumores da boca e está diretamente relacionado com a exposição solar (ABREU et al., 2004). Oliveira, Silva e Zucalota (2006) encontraram, em seu estudo, que 73,8% dos CE de lábio inferior estavam relacionados à exposição solar desprotegida.

Costa et al. (2002) em seu estudo de 120 casos de CEO, verificaram ser o lábio inferior a localização mais comum, com 31,67% dos casos. Em 2006, Oliveira, Silva e Zucalota, tentando traçar um perfil epidemiológico do CEO no Brasil, realizaram um estudo com 340 pacientes, onde a língua foi a localização mais freqüente, seguida do lábio. Esta divergência quanto à localização mais comum é devido à diferença da exposição aos fatores que variam geograficamente. É importante ressaltar que o estudo em CE de lábio inferior torna-se relevante, pois em nosso estado, Rio Grande do Norte, o CE de lábio inferior tem uma alta prevalência, já que se trata de uma região de forte incidência solar durante todo ano.

No presente estudo, observou-se que 72,5% dos casos ocorreram em pacientes do sexo masculino e a média de idade foi de 65,8 anos, sendo a faixa etária mais comum entre 70 a 79 anos. Estes achados são semelhantes aos encontrados na literatura mundial, haja vista que entre outros, no estudo retrospectivo de 189 casos de CE de lábio inferior, Kornevs et al. (2005), relataram que 69% eram homens e 31% eram mulheres com idade média de 66,8 anos.

Quando se estuda parâmetros clínicos do câncer, não podemos deixar de mencionar o estadiamento clínico (TNM) por constituir uma forma de comunicação universal entre os centros oncológicos no planejamento do tratamento dessas lesões, além de ser aceito como indicador de agressividade dos CEOs. Na presente pesquisa o estágio II, do estadiamento clínico, isoladamente foi o mais prevalente com 30% dos casos, não obstante, quando agrupamos o número de casos nos estágios III e IV, tenha mostrado uma maior prevalência com 22 casos (55%), contra 18 casos dos estágios I e II. Luna-Ortiz et al. (2004) encontraram um resultado semelhante, considerando que 50% da sua amostra estava nos estágios III e IV.



Neste trabalho, a prevalência dos estágios III e IV pode ser explicada pela amostra intencional composta por 20 casos de CE de lábio inferior sem metástase e 20 casos de carcinoma com metástase regional, sendo esses posicionados somente nos estágio III e IV. O que nos leva acreditar que CE em lábio inferior realmente possua prognóstico melhor que as demais localizações desse câncer na boca, como afirmam Costa et al. (2002).

Para Amar et al. (2003), Bettendorf, Piffkò e Bankfalvi (2004) e El-Gazzar et al. (2005), não se pode utilizar apenas o TNM para a determinação do prognóstico pois, alguns tumores com mesmo estadiamento clínico, mostram diferentes padrões de crescimento e prognóstico. Mesmo com a realização de várias pesquisas nas áreas da biologia molecular e imunoistoquímica, muitos aspectos em relação à progressão dos CEOs são pouco compreendidos. Esta neoplasia ainda permanece como uma das mais difíceis de ser controlada, conforme citações de Choi et al. (2006). Este problema tem movido numerosos pesquisadores em todo mundo na busca de indicadores prognósticos fidedignos, que complementem os indícios fornecidos pelo estadiamento clínico do tumor (BAGAN; SCULLY, 2009).

Uma alternativa surgiu com o sistema de gradação histológica de malignidade preconizada por Broders (1920, 1941) para a classificação dos CEOs, tomando por base o grau de diferenciação das células neoplásicas. Diversos outros sistemas de gradação histológica de malignidade foram propostos, desde então: Wahi (1971), conhecido como a gradação da classificação da Organização Mundial da Saúde; Jakobsson et al. (1973), que foi o primeiro a utilizar características histológicas indicativas da relação tumor-hospedeiro além das características das células neoplásicas; Crissman et al (1984) e Anneroth, Batsakis e Luna (1986, 1987), que fizeram pequenas modificações a partir do sistema de Jakobsson et al. (1973).

As neoplasias malignas são constituídas de populações celulares heterogêneas, onde as células tumorais das áreas mais invasivas diferem, substancialmente, das células centrais ou superficiais (BRYNE et al.; 1989; BRYNE, 1998; KUROKAWA et al. 2005). Baseado neste princípio Bryne, em 1998, propôs um sistema de gradação histológica de malignidade com avaliação apenas no *front* de invasão tumoral, no qual são considerados os fatores inerentes à neoplasia, grau de ceratinização, pleomorfismo celular e padrão de invasão neoplásico, assim como fatores relacionados ao próprio hospedeiro como infiltrado inflamatório.

Nesta pesquisa optou-se utilizar o sistema de gradação histológica de malignidade proposto por Bryne (1998), pelo fato de acreditar ser um método rápido, de fácil realização e

com valor prognóstico demonstrado em outros trabalhos (BRYNE, 1998; BÀNKA FALVI; PIFFKO, 2000; SAWAIR et al., 2003). Para a classificação das lesões com relação ao grau histológico de malignidade, adotamos a adaptação proposta por Silveira et al. (2009).

Vários estudos com CE de lábio inferior relatam que em sua maioria, essa lesão apresenta-se como de baixo grau de malignidade quando comparado com outras localidades. Como relatado por Miranda (2002), onde esse autor mostrou que os carcinomas situados em língua foram classificados, predominantemente, como de alto grau de malignidade, quando comparados aos de lábio inferior, onde, somente 8,33% de sua amostra estava constituída por CEs de alto grau. Seguindo esta mesma linha, Silveira et al. (2009) relataram que da amostra de 20 casos de CE em lábio inferior, por eles estudada, a maioria dos casos (65%) estava constituída por carcinoma de baixo grau de malignidade.

Em nossa investigação, dos 40 casos de CE de lábio inferior estudados, a maioria (52,5%) foi classificada como lesão de baixo grau de malignidade. Entretanto, a diferença entre o número de CE de baixo grau de malignidade com os de alto grau de malignidade não foi expressiva, como verificado nos estudos acima citados. Pois verificamos 21 casos de CE de baixo grau contra 19 (49,5%) de alto grau. Essa proximidade dos números pode ser justificada pela nossa amostra, que consta de 20 casos de CE de lábio inferior com metástase e, assim, como visto na literatura, CEs com metástase tendem a serem mais invasivos e indiferenciados (ABREU et al., 2004).

Ao realizar, neste trabalho, a análise do grau histológico de malignidade dos tumores em relação à presença ou ausência de metástase, observou-se que o grupo com 20 casos de CE com metástase, apresentou 70% dos casos estudados, como de alto grau de malignidade, enquanto que o grupo sem metástase exibiu que 75% dos casos eram de baixo grau, permitindo, assim, atribuir significância estatística ao achado ( $p = 0,004$ ). Apesar de usar gradação histológica de malignidade diferente da deste estudo, Broders, em 1920, estabeleceu que os tumores indiferenciados metastizam mais frequentemente. Pensam igualmente, os autores Saywel e al. (1996), Daniele et al. (1997), Breuninger et al. (1997), Abreu et al. (2004) quando concordam que gradação histológica de malignidade é um fator prognóstico para o carcinoma epidermóide de lábio inferior, considerando que recidivas e metástases são mais frequentes em tumores de alto grau de malignidade.

Ao relacionar a gradação histológica malignidade com TNM, verificamos nos resultados deste estudo, que a maioria dos casos de CEs de alto grau (73,3%) estava nos estágios III/IV, bem como os casos de CEs de baixo grau (61,9%) que se encontravam nos estágios I/II, mostrando, assim, uma associação significativa ( $p = 0,024$ ), resultados estes, que

concordam com os estudos de Costa et al. (2002), nos quais esses autores, também, encontraram relação significativa entre estadiamento clínico (TNM) e a gradação histológica de malignidade.

Apesar do câncer oral, em mais de 90% dos casos, ser CE, com características morfológicas semelhantes, mostra, o mesmo, grande variabilidade no comportamento biológico. Dessa forma, o valor prognóstico da gradação histológica de malignidade ainda permanece controverso, porém é bastante ressaltado na literatura, se a utilização de parâmetros morfológicos presentes no tumor, poderia fornecer informações adicionais em relação à sua atividade biológica (SILVEIRA et al., 2007; BARROS, 2006).

Eventos moleculares de importância para o conhecimento do crescimento tumoral é essencial à adoção de medidas terapêuticas adequadas. Desta forma, estudos nas diversas áreas da biologia molecular estão sendo realizados buscando-se compreender a complexa via de sinalização das células neoplásicas e as diversas proteínas envolvidas nesse processo de sobrevivência, migração e invasão das células tumorais (FERNÁNDEZ-ÁNGEL et al., 2003; BRINKMAN; WONG, 2006; BAGAN; SCULLY, 2009 ). Dentre essas proteínas, as BMPs, da mesma forma que seus receptores, estão sendo alvo de estudos na área da cancerologia (THAWANI et al., 2010).

As BMPs são membros de uma ampla família de fatores de crescimento relacionados ao TGF- $\beta$  e participam de diversas etapas durante os estágios da embriogênese e organogênese. Após o nascimento e na vida adulta essas proteínas e seus análogos são essenciais para o reparo tecidual, homeostase e o controle do crescimento (NOHE et al., 2004; SEBALD et al., 2004).

Níveis alterados de BMP-2 em tecidos específicos podem ocasionar anormalidades de desenvolvimento ou influenciar a formação de diversas doenças; desta forma, a identificação dos mecanismos moleculares que regulam o grau preciso de expressão da BMP-2 é de suma importância. A expressão anormal desta proteína está foi identificada em osteoartrites, psoríase, displasias ósseas e cânceres em diversas localizações e órgãos como pulmão, mama, cólon, pâncreas e próstata, onde níveis normais de BMP-2 podem suprimir tumores em alguns tecidos, enquanto que, sua superexpressão pode promover a transição do normal para o maligno (XU; ROGERS, 2007; HARDWICK et al., 2004; LANGENFELD et al., 2005).

Os efeitos da BMP-2 em células tumorais são controversos, dependendo do tipo de tecido e célula em que ela está atuando, bem como da sua concentração. Por exemplo, a BMP-2 tem sido mostrada estimulando o crescimento de células de melanoma, carcinoma

pancreático e câncer de próstata, este último, na ausência de andrógeno (HSU et al, 2005). Por outro lado, a BMP-2 inibe a proliferação das células de câncer da tireóide, carcinoma de próstata na presença de andrógeno, mielomas e células de câncer gástrico (WEN et al., 2004; LE PAGE et al., 2009).

Em tumores de origem mesenquimal, as BMPs podem estar associadas à formação patológica de osso, massas calcificadas e tecido condróide no interior do tumor ou em sítios ectópicos (JIN et al., 2001). O papel das BMPs no desenvolvimento de tumores epiteliais ainda é incerto, tendo sido implicadas no desencadeamento de alterações fenotípicas em células epiteliais, tornando-as mais semelhantes às células mesenquimais (STRNAD et al., 2010). Durante o desenvolvimento neoplásico, este processo permite as células malignas a migrarem para microambientes diferentes. Este processo, chamado de transição epitélio-mesenquima, é responsável por alterações, tais como, facilitar a migração celular e invasão, ajudando desta forma, ao desenvolvimento tumoral e aumento do potencial metastático (THAWANI et al., 2010).

Alguns estudos já vêm sendo feitos em CEO na tentativa de elucidar os mecanismos de atuação da BMP nessa neoplasia (JIN et al., 2001; SOARES et al., 2009; ARAÚJO, 2009). Entretanto, não se encontra nenhum estudo a respeito do CE de lábio inferior. Devido a isso, este trabalho objetiva analisar a relação da imunexpressão da BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II com as características clínico-patológicas, na tentativa de conhecer o papel dessas proteínas no comportamento biológico desta neoplasia.

No presente estudo, observou-se um predomínio da marcação de intensidade forte (82,5%) para BMP-2 nos CEs de lábio inferior. Além disso, 77,5% dos 40 casos apresentaram mais de 75% das células positivas (escore 3) para essa proteína. Em consonância com trabalhos diversos, como Jin et al. (2001) estudando a expressão da BMP-2/4 e -5, Soares et al.(2009) a expressão BMP 2/4 e Araújo (2009) com a BMP-2, verificaram, por imunistoquímica, a alta expressão dessas proteínas em CEO, quando comparada a tecidos diferenciados normais e processos patológicos benignos da boca, no qual, mostraram que esta proteína se mantém em baixos níveis de expressão. Esses resultados reforçam a tendência de que a superexpressão da BMP-2 está envolvida com a malignidade das lesões epiteliais e desta forma, no desenvolvimento dos CEs de lábio inferior.

Strnad et al. (2010), estudando a influência dos fatores de crescimento produzidos por fibroblastos do estroma de CEs de cabeça e pescoço, afirmam que a BMP-4 é um fator de crescimento que estimula a transformação do epitélio normal. Ao induzirem BMP-4, em ceratinócitos normais, observaram que essas células adquiriram fenótipo diferente, ficando semelhantes aos ceratinócitos do carcinoma. Esses autores concluíram que a secreção

parácrina da BMP por fibroblastos estromais pode levar a alterações na interação epitélio-mesênquima e, desta forma, contribuir para o desenvolvimento de neoplasia epitelial.

Raida et al. (2006) concluíram, em sua pesquisa com células progenitoras epiteliais, células troncos mesenquimais e BMP-2 recombinante, que a secreção da BMP-2 associada ao tumor, pode promover a angiogênese tumoral por efeitos quimiotáticos nas células progenitoras endoteliais circulantes do sangue periférico e por aumento da secreção parácrina de fatores de crescimento angiogênico, como o fator de crescimento placentário (PIGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), em células tronco mesenquimais, no estroma tumoral. Nesse mesmo sentido, Araújo (2009), encontrou associação estatística significativa da expressão da BMP-2 com o índice angiogênico, avaliado através da contagem microvascular, em lesões de CE localizado em língua. Concluindo assim, que a intensa expressão da BMP-2 promove o crescimento tumoral, em virtude de estimular a angiogênese.

Gao et al. (2009) realizaram um estudo *in vitro* com células de carcinoma epidermóide oral (UMSCC-1 e UMSCC-74A) e observaram o efeito da BMP-2 na proliferação e angiogênese desta lesão. Após tratarem as células com BMP-2 recombinante e verificarem a secreção de IL-8 e VEGF, não encontraram diferença significativa entre as células estudadas e o grupo controle. Esses autores, concluíram que a exposição de células de CEO à BMP-2 não estimula a proliferação ou angiogênese desta lesão. Este resultado contraria os estudos citados previamente, mas Langenfeld et al. (2005) mencionam que as condições de cultura, em estudos *in vitro*, bem como a concentração de antagonistas intra e extracelular interferem na atividade biológica das BMPs.

Quanto aos receptores, BMPR-IA e BMPR-II, ambos apresentaram imunomarcagem ausente/ fraca em 55% e 80% dos casos, respectivamente. Muito embora, quando analisamos a porcentagem de células positivas, nota-se que a maioria dos casos (77,5%), para ambas as proteínas, exibiu mais de 75% das células positivas (escore 3). Contrariamente, estudos realizados em vários tipos de tumores, como os cânceres de mama (ARNOLD, TIMS E MCGRATH 1999; POULIOT, BLAIS E LABRIE, 2003), CEO (JIN et al., 2001), gástrico (WEN et al., 2004), ameloblastomas e tumores odontogêncio adenomatóide (KUMAMOTO; OOYA, 2006) observaram superexpressão das BMPRs, confirmando que a função das BMPs e de seus receptores pode variar em diferentes tipos celulares e de malignidades.

Em estudos mais recentes em CEO, também reportam uma forte expressão dos receptores de BMPs. Nas pesquisas de Soares et al. (2009) com BMPR-IA, eles observaram uma superexpressão deste receptor no CEO. Araújo (2009) estudando a BMPR-IA e BMPR-II, também observaram que houve uma forte expressão desses receptores em CE de língua. É

importante salientar que esses estudos foram realizados em CEs de outras localizações anatômicas, o que poderia justificar a diferença dos resultados em relação ao presente estudo. Sabe-se que, o CE de lábio inferior tem seu como principal fator etiológico a radiação ultravioleta e os principais carcinógenos do CE em outras localizações intra-oral são o fumo e o álcool, e desta forma, essas lesões podem ativar diferentes processos na carcinogênese (SCULY; BAGAN, 2009).

Hardwick et al. (2004) encontraram, em estudo com células de câncer colorretal, que a hipoeexpressão de BMPR-IA, -IB e II estava relacionada com a presença de mutações nos genes desses receptores. Além disso, Hsu et al. (2005) afirmam que os receptores podem estar expressos, porém inativos, devido à interação com antagonistas extracelulares das BMPs, como o noggin, os quais podem estar superexpressos nos estágios mais avançados da progressão tumoral. Consequentemente, as BMPs que estão superexpressas deixam de atuar via autócrina, como efeito anti-proliferativo, para agir de forma parácrina nas células estromais, como efeito pró-tumoral. (HSU et al., 2005)

Considerando os vários papéis desempenhados nos diversos processos biológicos, a sinalização da BMP pode ter impacto em muitos genes alvos simultaneamente. Junto com a cascata de sinalização iniciadas pela ativação da via Smad, respostas celulares da ativação da via da BMP podem ser ampliadas através da ativação de outras vias, como a Wnt, MAPK – p38, Erk-MAPK, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), cálcio/calmodulina e as vias JAK-STAT. As proteínas Smads podem ou não participarem dessas vias alternativas, sendo assim, outras proteínas transdutoras de sinal intracelular podem estar envolvidas, como exemplo, a TAK1 e TAB1. Desta forma, a ativação e/ou mutações nessas outras vias também podem levar a alterações na sinalização da BMP e assim, causar o desequilíbrio celular e, por conseguinte, o desenvolvimento tumoral (THAWANI et al., 2010; MIYAZONO; KAMIYA e MORIKAWA, 2010; BLANCO CALVO et al., 2009; NOHE et al., 2004; VON BUBNOFF e CHO, 2001).

A sinalização intracelular feita pelas proteínas TAK1-TAB1 na via p38 leva à ativação da apoptose. A BMP-2 medeia a apoptose através dessa via, e a expressão de TAK1 defeituosa, bem como da BMP-2, pode levar a inibição da apoptose e, assim, ao desenvolvimento desenfreado de células mutantes. Além disso, a BMP-2 é capaz de ativar a sinalização ERK-RAS que é importante na regulação de fibronectina e osteopontina, proteínas da membrana extracelular que estão envolvidas no processo de adesão celular (NOHE et al., 2004).

Deng, Ravikumar e Yang (2009) estudaram a expressão da BMP-4 em culturas de células de adenocarcinoma colorretal (HCT116) e verificaram que essa proteína estava superexpressa, mas a Smad 4, proteína responsável por levar o sinal da BMP até o núcleo, estava defeituosa e inativa. Induzindo a BMP-4 nessas células, observaram a alteração em 91 genes (65 superexpressos e 26 com baixa expressão) além de aumentar a migração celular, quando comparado com o grupo controle. Esses autores concluíram que a BMP-4 favorece o desenvolvimento desse câncer, mas a Smad 4 não participa desse processo sinalização e sim outras sinalizações independentes de Smads.

As BMPs exercem duplo papel na progressão da lesão e metástase tumoral. Durante estágios precoces da carcinogênese essas proteínas agem como supressoras da proliferação celular e, em estágios avançados, induzem interação epitélio-mesênquima e aumentam a motilidade e invasividade das células, resultando em metástase (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; BLANCO CALVO et al., 2009). Além da sua atuação no processo de invasão tumoral, as BMPs também participam na inibição da vigilância imune (RAIDA et al., 2006). Em razão de todos os seus efeitos nas diversas etapas do câncer, essas proteínas têm sido consideradas como biomarcadores preditivos à progressão da tumorigênese, também como alvo da prevenção e tratamento do câncer e metástase (JAKOWLEW, 2006).

A análise de metástase regional é crucial para o desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento do câncer. Estudos têm mostrado que a BMP modula a migração celular e invasão em vários tipos de câncer, através da ativação de metaloproteinases da matriz (MMP) (ROTHHAMMER et al., 2008). A BMP-2 aumenta a capacidade de invasão e migração das células tumorais de condrossarcomas aumentando a expressão de MMP-13, através da via da transdução de sinal das proteínas PI3K, Akt, c-fos/c-Jun e AP-1 (HOU et al., 2009).

Além da ativação de MMPs, Kang et al. (2010) observaram, em seu estudo, que células de câncer gástrico tratadas com BMP-2 diminuía a expressão de E-caderina através da ativação da via de sinalização PI3K-Akt, e desta forma, alteravam seu fenótipo epitelial levando ao aumento da motilidade e invasão das células cancerígenas. Assim, identificaram a associação entre o alto nível de BMP-2, no soro de pacientes com câncer gástrico que tinham metástase óssea, quando comparado aos pacientes dos grupos controle e de carcinomas sem metástase.

No presente estudo, foi observado que a BMP-2 apresentou uma intensidade de expressão forte em mais de 75% das células positivas (escore 3) para ambos os grupos, não mostrando, portanto, associação entre a expressão dessa proteína com a presença e ausência

de metástase. Resultados similares foram encontrados por Jin et al. (2001) e Soares et al. (2009), que não conseguiram associar a presença de metástase com a expressão de BMP-2/4.

Com relação à BMPR-IA, pôde-se observar que 85% do grupo sem metástase exibiram marcação ausente/ fraca e 75% do grupo com metástase apresentaram marcação forte, mostrando uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Estes resultados sugerem que a BMPR-IA esteja envolvida no processo de metástase do CE de lábio inferior, não obstante estudos com CEO em outras localizações tenham evidenciado o contrário, onde a BMPR-IA apresentou alta expressão em carcinomas sem metástase e baixa expressão em carcinomas com metástase (JIN et al., 2001; SOARES et al. 2009).

A intensidade de marcação da BMPR-II foi ausente/ fraca para os dois grupos, muito embora, quando comparamos o percentual de células marcadas com a presença e ausência de metástase, de todas as proteínas estudadas, apenas a BMPR-II apresentou relação significativa com esta variável ( $p = 0,049$ ). Pouliot, Blais e Labrie (2003) verificaram que a superexpressão estável ou transitória de um receptor tipo II truncado em células de câncer de mama, essa inativação desses receptores bloqueavam a ativação da Smad1 pela BMP-2, inibindo o crescimento celular dessa neoplasia. De acordo com esses autores, as BMPs interagem com os BMPR-II, contribuindo, assim, para proliferação e sobrevivência das células de câncer de mama.

As numerosas vias de sinalização da BMP retratam a complexidade das funções dessas proteínas, bem como sua relação com a carcinogênese. Pelos resultados do nosso trabalho podemos supor que a influência da BMP-2 e de seus receptores no CE de lábio inferior pode estar relacionada com a ativação das outras vias de sinalização relatadas anteriormente.

Conforme estudos de Nohe et al. (2002), Blanco Calvo et al. (2009), além da via canônica de sinalização da BMP-2, existe uma via chamada de via de sinalização “não-canônica”, a MAPK-p38, que é ativada pela ligação homodímera dos receptores I na superfície da membrana celular e que dessa forma, ligam-se a um receptor II para iniciar a sinalização intracelular da BMP.

A via MAPK-p38 é ativada por estresses ambientais e genotóxicos e tem um papel-chave na inflamação, bem como na homeostase tecidual, sendo responsável pelo controle da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e migração celular. Esta via pode estar desregulada em cânceres, muito embora, suas funções no desenvolvimento de tumores malignos sejam complexas. Células normais utilizam essa via de sinalização para antagonizar a proliferação celular e transformação neoplásica, enquanto que as células cancerosas podem



subverter estes caminhos para facilitar a proliferação, sobrevivência e invasão (WAGNER e NEBREDA, 2009).

A p38 ativa pode agir diretamente na invasão e angiogênese tumoral, independentemente do seu papel na inflamação. Por exemplo, ela pode induzir a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-3 e MMP-13), que regulam a remodelação da matriz extracelular, auxiliando o processo metastático de células cancerosas, bem como, induzir a expressão de VEGF (DOLADO; NEBREDA, 2008). Experimentos utilizando linhagem de células cancerígenas e testes de invasão corroboram o papel da p38 no processo de metástase (WAGNER; NEBREDA, 2009).

Xu, Chen e Bergan (2006) estudaram o processo de invasão em câncer de próstata humano e observaram que a expressão da MMP-2 nas células neoplásicas aumentava após a aplicação da MAPKAPK 2 (proteína quinase ativada por mitógeno-proteína quinase ativada 2), um ativador da via MAPK-p38, sendo o processo inverso recíproco, ou seja, quando adicionado nas células do câncer de próstata um inibidor da via MAPK-p38 (SB203580), ocorria a diminuição de expressão da MMP-2 e conseqüentemente, a diminuição da invasão celular.

Analisando a função da p38 no crescimento e invasão celular em CE de cabeça e pescoço, Junttila et al. (2007) observaram que em ceratinócitos humanos primários epidérmicos, a ativação da via MAPK-p38 inativa a via ERK 1, 2 pela desfosforilação da proteína MEK 1, 2. Já nas células do carcinoma, não ocorria essa inativação da via ERK 1, 2. Além disso, a inibição da p38 endógena, por um adenovírus de domínio negativo da p38, causou uma redução na sobrevivência das células do CE, bem como uma diminuição na expressão de MMP-13 e MMP-1, suprimindo assim, a invasão das células neoplásicas. Com esse estudo, os autores sugeriram que a p38 promove o fenótipo maligno de células do CE por regular a sobrevivência, proliferação e invasão celular, sugerindo que essa via seja um alvo terapêutico potencial para CEs de cabeça e pescoço.

Em virtude da forte expressão da BMPR-IA no CE de lábio inferior com metástase, é possível que ocorra na superfície da membrana celular, a formação de homodímeros, e conseqüente ativação pelos receptores II, pois estes também se mostraram mais presentes no grupo com metástase. A formação deste complexo ativa a via MAPK-p38, como relatado anteriormente, levando a acreditar que esta via esteja envolvida no processo de metástase do CE de lábio inferior.

Na presente pesquisa, foram avaliadas possíveis diferenças na expressão de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II em relação ao estadiamento clínico (TNM). Considerando os diversos

estágios clínicos, não foram identificadas diferenças significativas na intensidade de expressão e percentual de células positivas para BMP-2 e BMPR-II. Este resultado foi semelhante ao reportado por Araújo (2009), que também buscou relacionar esse parâmetro com a expressão dessas proteínas, em CE de língua, não encontrando nenhuma associação.

Entretanto, para a BMPR-IA, neste estudo, foi observado que a maioria dos casos nos estágios mais avançados (estágios III/ IV) apresentava uma forte expressão dessa proteína (72,7%). Em contrapartida, nos estágios mais precoces (I/ II), a maioria dos casos (88,9%) exibiu um padrão de intensidade de expressão ausente/ fraca ( $p < 0,001$ ). No entanto, no estudo de Araújo (2009), que avaliou a expressão de BMPR-IA em CE de língua, não foi constatada associação entre a expressão dessa proteína e o estadiamento clínico (TNM).

Estudos sobre possíveis implicações prognósticas para as BMPs são escassos na literatura, destacando-se as recentes pesquisas de Davies et al. (2008) e Bieniasz et al. (2009). No estudo de Davies et al. (2008), com cânceres de mama, foi constatada associação positiva entre a expressão de BMP-2 e BMP-7 e o prognóstico da doença, presença de metástase linfonodal e recidiva da lesão. Já Bieniasz et al. (2009), em estudo com carcinomas de pulmão, não constataram associação da expressão da BMP-2 com estadiamento clínico e envolvimento de linfonodos regionais.

Os resultados do presente estudo sugerem uma possível implicação prognóstica para a BMPR-IA nos CEs de lábio inferior. Em virtude da escassez de trabalhos sobre o assunto (DAVIES et al., 2008; BIENIASZ et al., 2009) sugere-se a realização de novas pesquisas a respeito da utilidade das BMPs e de seus receptores como possíveis indicadores de prognóstico em neoplasias malignas.

Na presente pesquisa, foram avaliadas possíveis diferenças na expressão de BMP-2, BMPR-IA e BMPR-II em relação ao grau histológico de malignidade das lesões. Para BMP-2 e BMPR-II, não foi encontrada associação significativa com o grau histológico de malignidade. Resultado que corrobora com o encontrado por Araújo (2009), onde a expressão dessas duas proteínas não mostraram associação com o grau de diferenciação de CE de língua. Muito embora, na pesquisa de Kim et al. (2004), onde investigaram o papel de BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II em 30 espécimes de Carcinoma de Células Intermediárias (CCI) da bexiga urinária, verificaram as células tumorais ao perderem a expressão de BMPR-II, mostravam um maior grau de indiferenciação. Além disso, esses autores verificaram que a superexpressão do BMPR-II conduz a uma restauração da sinalização da BMP, sugerindo-o como um potente supressor de crescimento tumoral na linhagem celular, TSU-Pr1, de CCI de bexiga humana.

Neste estudo, a maioria dos casos de CE de alto grau de malignidade (63,2%) apresentou forte expressão de BMPR-IA, ao passo que a maior proporção de lesões de baixo grau de malignidade (71,4%) exibiu intensidade de expressão ausente/ fraca ( $p = 0,028$ ). Pesquisas sobre a expressão de BMPR-IA em relação ao grau histológico de malignidade de neoplasias malignas são escassos, destacando-se o trabalho de Araújo (2009) em CE de língua, onde a autora não encontrou relação significativa entre a BMPR-IA e a gradação histológica dessa lesão.

Vários estudos sugerem que a diferenciação celular é mediada pelos receptores BMPR-IA e BMPR-IB em diferentes tipos de células, usando a via canônica ou não-canônica da BMP. Esses receptores estão presentes na diferenciação dos condrócitos, diferenciação neural em embriões, bem como em células progenitoras mesenquimais, onde a ativação do receptor tipo IA induz a diferenciação de adipócitos e o receptor IB ativa receptores específicos para a linhagem osteogênica (ZOU et al., 1997; CHEN et al., 1998; PANCHISON et al., 2001).

Em nosso estudo, a expressão da BMPR-IA mostrou associação com a o grau histológico de malignidade do CE de lábio inferior, entretanto, mais pesquisas devem ser realizada, pois são escassos os trabalhos que relacionam a BMPR-IA com a diferenciação celular em tumores malignos, bem como em CEO.

Com base nos resultados desta pesquisa e os estudos na literatura científica, pode-se sugerir prováveis distúrbios na via de sinalização da BMP-2, bem como na promoção de metástase, pois os receptores estudados mostraram associação com os CE de lábio inferior com metástase linfonodal regional. Por existir escassos trabalhos que estudem as BMPs e seus receptores em CEO, principalmente, em CE de lábio inferior, são necessários estudos adicionais para que haja uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessas proteínas nessas lesões.

**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Frente aos nossos resultados, podemos concluir que:

- 1) A superexpressão de BMP-2 associada à baixa expressão de BMPR-IA e BMPR-II, na maioria dos casos analisados, sugere que distúrbios na via de sinalização BMP-mediada podem estar envolvidos no desenvolvimento do CE de lábio inferior;
- 2) Lesões com metástase regional apresentaram maior intensidade de expressão de BMPR-IA e maior percentual de células positivas para BMPR-II, em comparação com as lesões sem metástase. Tais achados, em associação à superexpressão de BMP-2, sugerem um papel importante para a via de sinalização BMP-mediada no desenvolvimento de metástases regionais em CE de lábio inferior;
- 3) A intensidade de expressão de BMPR-IA demonstrou associação estatisticamente significativa com o estágio clínico (TNM) das lesões, sugerindo uma possível implicação prognóstica para este marcador no CE de lábio inferior;
- 4) A associação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão de BMPR-IA e o grau histológico de malignidade das lesões sugere um provável papel deste receptor no processo de desdiferenciação celular em CE de lábio inferior.

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABREU, M.A.M.M. et al. Carcinoma espinocelular de lábio: avaliação de fatores prognósticos. **Rev. Brás. Otorrinolaringol.**, v. 70, n. 6, p. 765-70. nov/dez. 2004.

AMAR, A. et al. Tratamento cirúrgico do carcinoma epidermóide de língua e soalho de boca localmente avançado: efeito da radioterapia pós-operatória. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**,v.69, n.4, p.480-3, jul/ago. 2003.

ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.G; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, n.3, p. 229-249, jun.1987.

ARAÚJO, C.R.F. **Estudo clinico-patológico do carcinoma epidermóide de língua e imunoistoquímico das proteínas BMP-2, BMPR-IA, BMPR-II e Endoglina** . 2009. Tese (Doutorado em Patologia Oral) – Departamento de Odontologia, UFRN, Natal, 2009.

ARNOLD, S.F.; TIMS, E.; McGRATH, B.E. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP-2. **AP**, v. 11,n. 12, p. 1031-37, 1999.

BAGAN, J.V.; SCULLY, C. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. **Oral Oncology**, v. 45, p. 45-48, 2009.

BALEMANS, W.; VAN HUL, W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. **Dev. Biol.**, v.250, n.2, p.231-250, oct. 2002.

BÀNKFALFI, A.; PIFFKO, J. Prognostic and predictive factores in oral cancer: the role of the invasive tumour front. **J. Oral Pathol. Med.**, v.29, p.291-298, 2000.

BARROS, S.S.L.V. **Expressão imuno-histoquímica de metaloproteinases em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) – Departamento de Odontologia, UFRN, Natal, 2006.

BETTENDORF, O.; PIFFKÒ, A.; BÀNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol.**, v. 40, p.110-119, 2004.

BLANCO CALVO, M. et al. Biology signalling and cancer. **Clin. Transl. Oncol.**, v.11, p. 126-137, 2009.

BIENIASZ, M. et al. The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 in lung cancer patients. **Lung Câncer**. In press, 2009.

BOTCHKAREV, V.A. et al. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. **J. Invest. Dermatol.**, v. 118, n. 1, p. 3-10, jan.2002.

BRANDIZZI, D. et al. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. v.13, n.9, p.E544-548, sep.2008.

BREUNINGER, H. et al. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface. A highly malignant subtype of skin cancer. **Cancer**, v.79, N.5, p.909-915, 1997.

BRINKMAN. B.M.N.; WONG, D.T.W. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. **Curr. Opin. Oncol.**, v.18, p.228–233, 2006.

BRODERS, A.C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **J. Am. Med. Assoc.** v.6, n.10, p.656-664, 1920.

BRODERS, A.C. The microscopic grading of cancer. **Surg. Clin. North Am.**, v. 21, p.947-961, 1941.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v.18, n.8, p.432-437, sep.1989.



BRYNE, M. Is the invasive front of oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v.4, n.2, p.70-77, jun.1998.

CAMPISI, G. et al. HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. **Oral Oncol.**, v. 42, p. 638-645. 2006

CANALIS, E.; ECONOMIDES A.N.; GAZZERRO E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocr. Rev.**, v.24, p.218–235, 2003.

CANTIN, L.M. et al. Carcinoma de Células Escamosas de Labio Inferior: Asociación Entre Grado de Angiogénesis, Graduación Histológica y Frente de Invasión Tumoral. **Int. J. Morphol**, v.26, n.1, p.77-82, 2008.

CHEN, D. et al. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification mesenchymal precursor cells to osteoblasts and adipocyte lineages. **J. Cell Biol.**,v.142, p.295-305, 1998.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone Morphogenetic Proteins. **Growth Factors**, v.22, n.4, p.233-341,dec. 2004.

CHOI, K.K. et al. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncol.**, v.42, n.2, p.208-217, Feb. 2006.

COSTA, A.L.L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesq. Odontol. Bras.**, v.16, n.3, p.216-220, jul/set. 2002.

COSTA, A.L.L.; ARAÚJO JÚNIOR, R.F.; RAMOS, C.C.F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Ver. Brás. Otorrinolaringol.**, v.71, n. 2, p.181-7, mar/abr. 2005.

CRISMAN, J.D. et al. Prognostic value of histopatologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Cancer**, v.54, p.2995-3001, 1984.

CURADO, M.P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v.21, p.194–200, 2009.

DAVIES, S.R. et al. Bone morphogenetic proteins 1 to 7 in human breast cancer, expression pattern and clinical/prognostic relevance. **J. of Experimental Ther and Oncol.**, v.7, p. 327-338, 2008.

DANIELE, E. et al. Prognosis in lower lip squamous cell carcinoma: assessment of tumor factors. **Pathol. Res. Pract.**, v.194, p. 319-324, 1998.

DANTAS, D.D.L. et al. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. **Braz. Dent. J.**, v.14, n.1, p.22-25, jun. 2003.

DENG, H.; RAVIKUMAR, T.S.; YANG W. et al. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v.281, p.220–231, 2009.

DERYNCK, R.; AKHURST, R.J.; BALMAIN, A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat. Genet.**, v.29, n.2, p.117-29, oct. 2001.

DOLADO, I.; NEBREDA, A.R. Regulation of tumorigenesis by p38 $\alpha$ MAP kinase. **Topics in Current Genetics: Stress-Activated Protein Kinases**, v.20, p.99–128, 2008.

FEELEY, B.T. et al. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J. Bone Miner Res.*, v.20, n.12, p.2189-2199, 2005.

EL-GAZZAR, R. et al. Vascularity and expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma, resection margins, and nodal metastases. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.44, p.193-197, 2005.

FERNÁNDEZ-ÁNGEL, I. et al. Markers of metastasis in lip cancer. **Eur. J. Dermatol.**, v.3, p.276–9, 2003.

- GAO, W. et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 on proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** In press, 2009.
- GAZZERRO, E.; CANALIS, E. Bone Morphogenetic Protein and their antagonist. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v.7, n.1-2, p. 51-65. jun, 2006.
- GOSSELET, F.P. et al. BMP-2 and BMP-6 control p57 expression and cell growth arrest/terminal differentiation in normal primary human epidermal keratinocytes. **Cell signal**, v.19, n.4, p.731-739, abr. 2007.
- GRANJEIRO, M.J. et al. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.38, n.10, p.1463-73, oct. 2005.
- GROPPE, J. *et al.* Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine-knot protein Noggin. **Nature**, v.420, n.6916, p.636-42, dec. 2002.
- HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur. Arch Otorhinolaryngol.**, v.260, n.9, p.502-508, oct. 2003.
- HARRISON, C.A. et al. Modulation of activin and BMP signaling. **MCE**, v. 225, p.19-24, 2004.
- HARDWICK, J.C.H. et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. **Gastroenterology**, v,126, p. 111-121, 2004.
- HARDWICK, J.C.H. et al. Bone morphogenetic protein signaling in colorectal cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 10, p. 806-812, Oct. 2008.
- HASSON, O. Squamous Cell Carcinoma of the Lower Lip. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.66, p.1259-62, 2008.
- HATAKEYAMA, S. et al. Expression of bone morphogenetic proteins of human neoplastic epithelial cells. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.42, n.3, p.497-505, jul. 1997.

HOU, C. H. et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances the motility of condrosarcoma cells via activation of matrix metalloproteinase-13. **Bone**, v. 44, p. 233-242, 2009.

HSU, M.Y. et al. Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? **Cancer Metastasis Rev.**, v.24, n.2, p. 251-263, jun. 2005.

INCA. Câncer de boca. 2010. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view](http://www.inca.gov.br/conteudo_view)>. Acesso em: 29 dez. 2009.

JAKOWLEW, S.B. Transforming growth factor- $\beta$  in cancer and metastasis. **Metastasis Rev.**, v.25, p.435-457, 2006.

JAKOBSSON, P.A. et al. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx (a pilot study). **Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.**, v.12, p.1-8, 1973.

JIN, Y. *et al.* Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium. **Oral Oncol.**, v.37, n.3, p.225-33, apr. 2001.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. IARC Press: Lyon, p.168-176, 2005.

JUNTTILA, M. R. et al. p38a and p38d mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. **Oncogene**, v.25, p.5267 – 5279, 2007.

KADEMANI, D. Oral Cancer. **Mayo Clin. Proc.**, v.82, n.7, p. 878-887, jul. 2007.

KANG, M.H. et al. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. **Experimental Cell Research**, v.316, p. 24-37, 2010.

KUROKAWA, H. et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v.34, p.329-333, 2005.

KUSAFUKA, K. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas. **Virchows Arch.**, v.432, n.3, p.247-53, mar. 1998

KIM, I.Y. *et al.* Restoration of bone morphogenetic protein receptor type II expression leads to a decreased rate of tumor growth in bladder transitional cell carcinoma cell line TSU-Pr1. **Cancer Res.**, v.64, n.20, p.7355-60, oct. 2004.

KIM, S.G. *et al.* The differential expression pattern of BMP-4 between the dentigerous cyst and the odontogenic keratocyst. **J. Oral Pathol. Med.**, v.34, n.3, p.178-183, mar. 2005.

KIM, I.Y.; KIM, S.J. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. **Cancer Lett.**, v.241, n.1, p.1-6, sep. 2006.

KOMAI *et al.* Possible involvement of bone morphogenetic protein 2 in heterotopic ossification in metastatic lesion from urothelial carcinoma of bladder. **Int. J. Urol.**, v.13, n.8, p.1126-1128, aug, 2006.

KORNEVS, E. *et al.* 5 year experience with lower lip cancer. *Stomatologija*, v.7,n.3, p.95-98, 2005.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. **Oral. Dis.**, v.12, n.2, p.163-170, mar. 2006.

LANGENFELD, E.M.; LANGENFELD, J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. **Mol. Cancer Res.**, v.2, n.3, p.141-9. mar, 2004.

LANGENFELD, E.M. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. **Ann Thorac. Surg.**, v.80, n.3, p.1028-32, sep. 2005.

LE-PAGE, C. *et al.* BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. **Journal of Ovarian Research**, v. 2, n. 4, p. 1-11, 2009.

LEVY, L.; HILL, C. Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathways in human cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.17, n. 1-2, p.41-58, feb/apr. 2006.

LIANG, X. *et al.* Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: The Mayo clinic experience. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.66, p. 1875-1880, sep. 2008.

LOPES, F. F. et al. Changes in immunoexpression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Annals of Diagnostic Pathology* v.13, p. 22–29, 2009.

LOURENÇO, S.Q.C. et al. Classificação Histológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.53,n.3, p.325-333, 2007.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncology**, v.40, p.992-999, 2004.

MANUEL, S. et al. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.32, n.2, p.167-73, 2003.

MARTINS NETO, M. Sistemas de graduação histopatológica de malignidade (SGHM) do carcinoma espinocelular. Revisão de literatura e sua importância dentro do contexto da estomatologia. **Rev. Odonto Ciênc.**, v. 14, n. 28, p. 97-106, dez. 1999.

MIRANDA, J. L. **Expressão de proteínas de matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua.** 2002, 119f. Tese (Doutorado em Patologia Oral) Departamento de Odontologia da UFRN, Natal,RN, 2002.

MORSELLI, P. et al. Clinical Parameters in T1N0M0 Lower Lip Squamous Cell Carcinoma. **J Craniof Surg.**, v.18, n.5, p.1079-82, sep. 2007.

MORSELLI, P. et al. Clinical Prognostic Factors in Stage I Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J. Craniof. Surg.**, v. 19, n.3, p.740-743, may. 2008.

MS. **TNM: classificação de tumores malignos.** 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

MIYAZONO, K.; MAEDA, S.; IMAMURA, T. BMP receptor signaling: transcripcional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, p. 251-264, 2005.

MIYAZONO, K.; KAMIYA, Y; MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **J. Biochem.**, v. 147, n. 1, p. 35–51, 2010;

NAGPAL, J.K.; BIBHU, R.D. Oral câncer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncol.**, v.39, p.213-221, 2003.

NEVILLE. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 410 p.

NOHE, A. et al. The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.7, 2002.

NOHE, A. et al. Signal transduction for bone morphogenetic protein receptors. **Cell. Signal.**, v.16, p. 291-299, 2004.

OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A.R.; ZUCALOTA, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.5, p. 385-392, out. 2006.

O'REGAN, E.M. et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in young Irish adults. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, p.203-206, 2006.

PANCHISON, D. M. et al.: Sequential action of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. **Genes Dev.**, v.15, p.2094-2110, 2001.

POULIOT, F.; BLAIS, A.; LABRIE, C. Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 63, n.2, p. 277-81, jan. 2003.

RAIDA, M. et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and induction of tumor angiogenesis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.131, n.11, p.741-50, nov. 2005.

RAIDA, M. et al. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, p.735-739, 2006.

REDDI, A.H. BMPs: From bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.16, n.3, p. 249-250, jun. 2005.

RIBEIRO, A.C.P. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in Young people. A descriptive study in Brazilians. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.47, p.95-98, 2009.

ROSS, S.; HILL, C.S. How the Smads regulate transcription. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.40, p.383-408, 2008.

ROTHHAMMER, T. et al. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.*, v.65, n.2, p. 448-456, 2005.

ROTHHAMMER, T.; BRAIG, S.; BOSSERHOFF, A. K. Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts. **European Journal Of Cancer** , v.44, p. 2526-2534, 2008.

SALGARELLI, A.C. et al. Surgical Treatment of Lip Câncer: Our Experience With 106 Cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.67, p. 840-845, 2009.

SARGERAN, K. et al. Survival after lip cancer diagnosis. *J. of craniofac. Surg.*, v.20, n.1, p. 248-252, 2009.

SAWAIR, F.A. et al. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. **J. of Oral Pathol. Med.**, v.32, p. 1-9, 2003.

SAYWELL, M.S, WEEDON, D. Histological correlates of metastasis in primary invasive squamous cell carcinoma of the lip. **Australas. J .Dermatol.**, v.37, n.4, p. 193-5, 1996.

SCULLY, C.; BAGAN, J.V. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Diseases**, v. 15, p. 388-399, 2009.



SEBALD, W. et al. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/ receptor interaction. **Biol. Chem.**, v. 32, n. 8, p. 455-460, Sep. 2003.

SHON, S.K. et al. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, p.198-203, 2009.

SOARES, A.F. et al. Bone morphogenetic protein-2/4 and Bone morphogenetic protein receptor type IA expression in metastatic and nonmetastatic oral squamous cell carcinoma. **Americ. J. Otolaryng.** In press, 2009.

SILVEIRA, E.J.D. et al. Correlation of clinical, histological and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, p.376-383, 2007.

SILVEIRA, E.J.D. et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Exp. Mol. Pathol.**, 2009, DOI: 10.1016/j.yexmp.2009.11.2009

STEINERT, S. et al. Differential expression of cancer-related genes by single and permanent exposure to bone morphogenetic protein 2. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.134, n.11, p.1237-1245, nov. 2008.

STRNAD, H. et al. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. **Histochem. Cell Biol.**, v. 133, p. 201-211, 2010.

SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-2 in the oral and maxillofacial area of the human embryo. **Br. Oral Maxillof. Surg.**, v.39, n.4, p.289-293, aug. 2001.

TAKAHASHI, M. et al. Bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and BMP7 inhibit estrogeninducedproliferation of breast cancer cells by suppressing p38 mitogen-activated protein kinase activation. **Journal of Endocrinology**, v. 199, p. 445–455, 2008.

THAWANI, J.P. et al. Bone Morphogenetic Proteins and Cancer: Review of the Literature. **Neurosurgery**, v. 66, p. 233-246, 2010.

VAHTSEVANOS, K. et al. Distant bone metastases from carcinoma of the lip: a report of four cases. *In. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.36, n. 2, p. 180-185, 2007.

VARGA, A.C; WRANA, J.L. The disparate role of BMP in stem cell biology. **Oncogene**, v. 24,p.5713–5721, 2005.

VON BUBNOFF, A.; CHO, K.W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: Pathway or network?. **Dev. Biol.**, v.239, p. 1-14, 2001.

WGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviewa**, v.9, 2009.

WAHL, P.M. **Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos**. Giebra: Organizacion Mundial de la Salud, 1971.

WAN, M.; CAO, X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.328, p.651-7, 2005.

WEN, X. et al. BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cell. *BBRC*, v. 316, p.100-116, 2004.

WHITMAN, M. Smads and early developmental signaling by the TGF-beta superfamily. **Genes Dev.**, v. 12, n. 16, p. 2445-2462, aug. 1998.

YANAGITA, M. BMP antagonist: their roles in development and involvement in pathophysiology. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.16, p. 309-17, 2005.

XIO YT, XIANG LX, SHAO JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 362, p.550–553, 2007.

XU, J.; ROGERS, M.B. Modulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2 gene expression by Sp1 transcription factors. **Gene**, v. 392, p. 221-229, 2007.

XU, L.; CHEN, S.; BERGAN, R. C. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. **Oncogene**, v.25, p. 2987-2998, 2006.

ZOU, H. et al. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. **Genes Dev**, v.11, p.2191-2203, 1997.

---

Trabalho de acordo com as normas de documentação da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT a saber.

**NBR 6023:** Informação e Documentação – referências – elaboração, 2002;

**NBR 6024:** - Informação e Documentação – numeração progressiva das seções de um documento escrito – Apresentação 2003;

**NBR 6027:** Informação e Documentação – sumário – Apresentação 2003;

**NBR 6028:** Informação e Documentação – resumos – Apresentação 2003;

**NBR 10520:** Informação e Documentação – citação em documentos – Apresentação, 2002;

**NBR 14724:** Informação e Documentação – trabalhos acadêmicos – Apresentação, 2002;

**APÊNDICE**

## APÊNDICE A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

### **RELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DA BMP-2, BMPR-IA E BMPR-II COM O PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO INFERIOR**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

##### **A) OBJETIVO E JUSTIFICATIVA DA PESQUISA:**

Obrigado (a) pela sua participação como voluntário (a) em nossa pesquisa!

A presente pesquisa tem por objetivo desenvolver um estudo analítico e comparativo dos achados clínicos e imunoistoquímicos em uma série de casos de Carcinoma Epidermóide de Lábio inferior de pacientes atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, em Natal-RN, com intuito de analisar a expressão imunoistoquímica de BMP-2, seus receptores BMPR-IA e BMPR-II, associando com o comportamento biológico de Carcinomas Epidermóides de lábio inferior.

##### **B) RISCOS POSSÍVEIS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:**

Os sujeitos desta pesquisa não serão expostos a nenhum risco, visto que os mesmos não serão chamados para execução da pesquisa, em nenhum momento. Esclareço, outrossim, que os benefícios esperados envolvem o melhor conhecimento da doença, do perfil da população do Rio Grande do Norte acometida pelo carcinoma epidermóide de língua e, por conseguinte, um tratamento mais adequado, sendo que os resultados obtidos serão publicados para o conhecimento na literatura científica pertinente.

##### **C) PROCEDIMENTOS:**

Para realização desta pesquisa, serão coletados os dados clínicos contidos nos prontuários (fichas clínicas) no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e laudos histopatológicos arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio. Portanto, além de um processamento imunoistoquímico das peças cirúrgicas no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

**D) RESSARCIMENTO:**

Não está previsto nenhum ressarcimento ou indenização para os participantes desta pesquisa, uma vez que o estudo será realizado com dados obtidos em prontuários (fichas clínicas) e laudos histopatológicos, que se encontram arquivados nos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, e, de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, respectivamente, além de uma análise das lâminas com marcação imunoistoquímica processadas no laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

**E) ACESSO ÀS INFORMAÇÕES:**

Você poderá desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, mesmo que tenha assinado este Termo de Consentimento. As informações obtidas de cada participante são confidenciais e somente serão usadas com o propósito científico, sem divulgação de nomes. O pesquisador, os demais profissionais envolvidos nesse estudo e o Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer (LNRCC), terão acesso aos arquivos dos participantes, para verificação de dados, sem, contudo, violar a parte confidencial.

**E) CONSENTIMENTO:**

Declaro que, após ter lido e compreendido as informações contidas neste documento, concordo em participar deste estudo. Portanto, autorizo o uso dos dados contidos nos prontuários e nos laudos histopatológicos já mencionados, além da análise imunoistoquímica de fragmento da minha peça cirúrgica, sem o que fica prejudicada a utilização dos prontuários e laudos para os fins especificados.

E através deste instrumento e da melhor forma de direito, autorizo o Professor Doutor Leão Pereira Pinto, RG 75.129 – SSP/RN, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, situado a Av. Salgado Filho, 1787, lagoa Nova – Natal/RN CEP: 59.060-000, a incluir meu caso no estudo.

Autorizo também a publicação do referido trabalho, de forma escrita, sem citar meu nome. Concedo também o direito do uso para fins de ensino e divulgação em revistas científicas, desde que mantido o sigilo sobre minha identidade. Estou ciente que deverá ser de livre e espontânea.

Em caso de alguma dúvida sobre a conduta ética nesta pesquisa posso entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer (LNRCC), pelos telefones 4009-5494 / 4009-5440 ou com o próprio pesquisador no endereço já mencionado ou, ainda, no Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, localizado no Departamento de Odontologia da UFRN, no endereço supracitado, pelo telefone (84) 3215.4108.

Natal, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Concordo com os termos deste documento, razão pela qual estudo de acordo:**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
RG: \_\_\_\_\_ Órgão expedidor: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Leão Pereira Pinto  
(Pesquisador responsável)

**OBSERVAÇÃO:** Segue, em anexo, envelope com o endereço para a remeça desta correspondência após a sua assinatura.

**APÊNDICE B**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

**RELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DA BMP-2, BMPR-IA E BMPR-II COM O  
PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO  
INFERIOR**

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

Orientanda: Cyntia Helena Pereira de Carvalho

**FICHA CLÍNICA**

**Nº PRONT:** \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_ RAÇA: \_\_\_\_\_

LOCALIZAÇÃO DO TUMOR: \_\_\_\_\_

TAMANHO DA LESÃO: \_\_\_\_\_

ESTADIAMENTO: T \_\_\_ N \_\_\_ M \_\_\_

TRATAMENTO: C ( ) R ( ) Q ( )

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO: \_\_\_\_\_

GRADAÇÃO HISTOLÓGICA: \_\_\_\_\_

BIÓPISIA: EXCISIONAL ( ) INCISIONAL ( )

**Nº DA PEÇA/ BLOCO:** \_\_\_\_\_

METÁTASE: SIM ( ) NÃO ( )                      ÓBITO: SIM ( ) NÃO ( )





**ANEXO**

## ANEXO



Natal, 06 de Março de 2008.

Parecer Consubstanciado Nº. 001/001/2008.

Ilmo. Sr.  
Dr. Leão Pereira Pinto,

Tendo em vista a análise do trabalho sob o título "Estudo da imunexpressão da BMP2, BMPR IA e BMPR II. Do antagonista Noggin e da Endoglina 9CD 105) e sua correlação com o prognóstico do Carcinoma Epidermóide Oral."

A Comissão de Ética na Pesquisa da LNRCC após reunião realizada em 28/02/2008, informa seu parecer favorável ao desenvolvimento da pesquisa. **APROVADO**

OBS: Informamos também que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou e também não aprovou ou expressou sua opinião através de procuração a membros do CEP para análise, aprovação ou não, dos documentos referidos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "F. Edilson P. Jr.", written over a horizontal line.

**Dr. Edilson Leite Pinto Júnior**  
**Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da**  
**Liga Norteriogrاندense Contra o Câncer**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)