

Análise da expressão de TIMP-1 em leucoplasia e carcinoma de boca de células escamosas

Analysis of TIMP-1 expression in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma

Susy Carmelita P. Nascimento; Liliana Aparecida P. Barros; Letícia N. G. Souza

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, Espírito Santo, Brasil.

RESUMO

Introdução: O estudo atual da transição da displasia epitelial oral, presente em lesões como a leucoplasia, para o carcinoma de células escamosas (CCE), envolve não somente aspectos histopatológicos, como também a análise da presença de biomarcadores, os quais influenciam o microambiente em que as células estão inseridas. **Objetivo:** Avaliar o perfil da expressão do inibidor tecidual de metaloproteínase 1 (TIMP-1) em casos de leucoplasias e CCE classificados em diferentes graus de displasia e graus histopatológicos, respectivamente, e confrontar os achados imuno-histoquímicos com os aspectos microscópicos adotados na classificação das lesões. **Material e métodos:** Foram resgatados casos de leucoplasia e CCE do Serviço de Anatomia Patológica Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES), entre os anos 2004-2010. Novas lâminas foram obtidas ao serem submetidas ao ensaio imuno-histoquímico para determinação do perfil de expressão de TIMP-1. Foram avaliados parênquima, bem como as diferentes camadas do epitélio e estroma. **Resultados:** Em todos os casos, foi detectada a presença de TIMP-1 no estroma e no parênquima. Na leucoplasia leve, a camada basal e com hiperplasia apresentou imunomarcagem intensa; as células com perda de polaridade tiveram expressão menor. Na leucoplasia moderada, todas as camadas do epitélio, exceto a córnea, apresentaram marcação. A leucoplasia severa teve a camada espinhosa marcada mais intensamente, sem variação em áreas com pleomorfismo. O CCE grau I apresentou as ilhas mais profundas com marcação intensa em células com pleomorfismo e mitoses. Nas ilhas tumorais, células menos diferenciadas tiveram marcação menor, e em pérolas córneas a marcação foi fraca ou ausente nas células centrais. No CCE grau II, foi observada a marcação em células basais com hiperplasia e, em células da camada espinhosa, a camada parabasal não foi marcada. Também nas ilhas, células menos diferenciadas não expressaram a proteína e não houve marcação em pérolas córneas. **Conclusão:** Foi possível detectar imunomarcagem para TIMP-1 em todos os espécimes, com variação em intensidade e localização. A ausência de expressão em células menos diferenciadas sugere que lesões mais agressivas possuem redução da enzima. O microambiente é importante para as diversas atividades celulares, e TIMP é uma enzima que participa da remodelação da matriz. Portanto, alteração na sua expressão pode ser uma valiosa ferramenta para um melhor entendimento da carcinogênese da mucosa bucal.

Unitermos: leucoplasia oral; carcinoma de células escamosas; câncer oral; inibidor tecidual de metaloproteínase 1.

ABSTRACT

Introduction: The current study about transition of oral epithelial dysplasia, present in lesions such as leukoplakia, for squamous cell carcinoma (SCC) involves not only the histopathological aspects, but also the analysis of the presence of biomarkers which influence the microenvironment where cells are embedded. **Objective:** To evaluate the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) profile in cases of leukoplakia and SCC classified into different degrees of dysplasia and histological grading, respectively. The immunohistochemical findings were confronted with microscopic features adopted in the classification of each lesion. **Material and methods:** Cases of leukoplakia and SCC were recovered from files of The Oral Pathological Anatomy Service of the Dental School at the Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES), between the years 2004 and 2010. New slides were obtained and submitted to immunohistochemical assay to determine TIMP-1 expression profile. Parenchyma, as well as the different layers of the

epithelium and stroma was evaluated. Results: In all cases the presence of TIMP-1 was detected in the stroma and parenchyma. In mild leukoplakia, the basal layer with hyperplasia showed intense immunolabeling, whereas cells with loss of polarity presented weaker expression. In moderate leukoplakia, all epithelium layers, except the cornea, were labeled. Severe leukoplakia had the spinous layer most intensely labeled, with no variation in areas with pleomorphism. Stage I SCC showed the deepest islands with intense labeling in cells with pleomorphism and mitoses. In the tumor islands, less differentiated cells were weakly labeled, and in keratin pearl, labeling was weak or absent in central cells. In stage II SCC, labeling was observed in basal cell with hyperplasia and in cells of the spinous layer; however, the parabasal layer was not labeled. Also, on tumor islands, less differentiated cells did not express the protein and keratin pearls were not labeled. Conclusion: It was possible to detect TIMP-1 immunolabeling in all specimens, ranging in intensity and location. The absence of expression in less differentiated cell suggests that more aggressive lesions present reduced enzyme expression. The microenvironment is important for the various cellular activities, and TIMP is an enzyme that participates in matrix remodeling, therefore changes in its expression can be a valuable tool in the better understanding oral carcinogenesis.

Key words: oral leukoplakia; squamous cell carcinoma; oral cancer; tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

RESUMEN

Introducción: El estudio actual de la transición de displasia epitelial oral, presente en lesiones como la leucoplasia, hacia carcinoma epidermoide, implica no solo aspectos histopatológicos, sino también el análisis de la presencia de biomarcadores que influyen en el microambiente en el que se insertan las células. **Objetivo:** Evaluar el perfil del inhibidor tisular metaloproteínasa-1 (TIMP-1) en casos de leucoplasia y carcinoma de células escamosas (CCE) clasificados en diferentes grados de displasia y grados histopatológicos, respectivamente. Confrontar los hallazgos inmunohistoquímicos con los aspectos microscópicos adoptados en la clasificación de lesiones. **Material y métodos:** Casos de leucoplasia y CCE fueron recuperados del Servicio de Anatomía Patológica Bucal del Curso de Odontología de la Universidad Federal de Espírito Santo (SAPB-UFES), entre los años 2004-2010. Se obtuvieron nuevos portaobjetos y se sometieron a ensayos inmunohistoquímicos para determinar el perfil de expresión de TIMP-1. Se evaluó el parénquima, así como las diferentes capas del epitelio y estroma. **Resultados:** En todos los casos se detectó TIMP-1 en estroma y parénquima. En la leucoplasia leve, la capa basal y con hiperplasia mostró inmunotinción intensa, mientras que las células con pérdida de polaridad tuvieron menos expresión. En la leucoplasia moderada, todas las capas del epitelio, excepto la córnea, mostraron inmunotinción. En la leucoplasia grave la capa espinosa tuvo inmunotinción más intensa, sin variación en áreas con pleomorfismo. El CCE grado I mostró las islas más profundas con tinción intensa en células con pleomorfismo y mitosis. En las islas tumorales, las células menos diferenciadas tuvieron tinción menor, y en las perlas de queratina la tinción fue débil o ausente en las células centrales. En el CCE grado II, se observó tinción en células basales con hiperplasia y, en células de la capa espinosa, la capa parabasal no fue marcada. También en las islas, las células menos diferenciadas no expresaron la proteína y no hubo tinción en las perlas de queratina. **Conclusión:** Fue posible detectar inmunotinción para TIMP-1 en todos los especímenes, con variación en intensidad y ubicación. La ausencia de expresión en células menos diferenciadas sugiere que las lesiones más agresivas tienen enzima reducida. El microambiente es importante para las diversas actividades celulares, y el TIMP es una enzima que participa en la remodelación de la matriz; por lo tanto, la alteración en su expresión puede ser una herramienta valiosa en el mejor entendimiento de la carcinogénesis de la mucosa oral.

Palabras clave: leucoplasia oral; carcinoma de células escamosas; cáncer de la boca; inhibidor tisular de metaloproteínasa-1.

INTRODUÇÃO

A leucoplasia oral, desordem potencialmente maligna mais frequente na cavidade oral⁽¹⁾, e o carcinoma de células escamosas (CCE), neoplasia maligna mais comum na região maxilofacial,

figuram entre as lesões de maior interesse para o entendimento da carcinogênese oral. Essas lesões compartilham características clínicas e microscópicas similares e, ao mesmo tempo, diferentes e próprias⁽²⁾ que as distanciam quanto à sua repercussão na saúde do indivíduo e na forma de abordagem profissional⁽³⁾.

A carcinogênese é descrita como um processo complexo multipasso e multifatorial, por meio do qual uma série de eventos resulta em perda do equilíbrio entre proto-oncogenes ativados e genes supressores, que conduzem à transformação celular, à autonomia e ao crescimento descontrolado. Todos esses eventos podem ocorrer devido a influências de exposição a carcinógenos e/ou fatores inerentes ao hospedeiro ao longo da vida e em sucessivos passos, levando a transformação de múltiplos genes⁽⁴⁾. A perda de regulação desses genes, portanto, é a base molecular para mudanças fenotípicas que envolvem desenvolvimento de imortalidade celular, habilidade para invadir tecidos, facilidade para gerar metástase e indução da angiogênese⁽⁵⁾.

O conceito do desenvolvimento do câncer na mucosa oral envolve as alterações mencionadas, como também, de maneira bem estabelecida, a presença inicial de uma lesão precursora. Dentro desse contexto, a lesão mais conhecida é a leucoplasia⁽⁶⁾.

Contudo, entre as alterações fenotípicas da mucosa oral, é importante dar destaque à displasia epitelial, um campo de estudo fundamental para o entendimento da transformação maligna das desordens com potencial de malignização, como ocorre com a leucoplasia⁽⁷⁾. A análise dos aspectos teciduais e citológicos preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2005) norteia a graduação das lesões precursoras em leve, moderada e severa, carcinoma *in situ* e propriamente o carcinoma invasivo.

Embora a identificação do grau de displasia epitelial oral seja amplamente aceita e considerada a mais importante ferramenta para prever o risco de transformação maligna, ela ainda é subjetiva e controversa⁽⁸⁾.

Reibel (2003)⁽⁶⁾ lista três grandes problemas nessa associação de lesões com displasia epitelial oral e a sua transformação: 1. diagnóstico subjetivo; 2. nem todas lesões que exibem displasia epitelial tornam-se malignas, e algumas até regredem; 3. carcinomas podem se desenvolver a partir de lesões sem diagnóstico prévio de displasia epitelial nas biópsias.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de outras ferramentas que possam auxiliar os profissionais na determinação do risco de transformação maligna na cavidade oral. Assim, a utilização de marcadores biológicos e genômicos tornaram-se bons candidatos no aprimoramento da avaliação prognóstica das lesões precursoras do câncer de boca.

Os biomarcadores podem auxiliar num diagnóstico mais preciso para a displasia epitelial. Nesse contexto, com objetivo de avaliar a associação dos aspectos histopatológicos da displasia epitelial oral com biomarcadores, Shimamura *et al.* (2011)⁽⁹⁾ compararam a marcação da fascina e da podoplanina em lesões

com diferentes graus de displasia, em carcinomas *in situ* e em carcinomas invasivos, considerando-as ferramentas-chave para o diagnóstico preciso deste grupo de lesões com potencial de malignização.

Outros estudos utilizando diferentes biomarcadores para esclarecer a carcinogênese oral têm sido publicados, como perlecan, metaloproteases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)^(8, 10-13).

Ikarashi *et al.* (2004)⁽¹²⁾ demonstraram que as células epiteliais displásicas, ou do carcinoma *in situ*, são capazes de produzir e depositar moléculas da matriz extracelular (MEC) antes de adquirirem a natureza invasiva. Com 82 biópsias de epitélio normal, hiperplásico, displásico e do carcinoma, os autores avaliaram, imuno-histoquimicamente, perlecan e proteoglicano de heparan sulfato e mostraram diferenças topográficas na expressão, sendo superexpressadas nas células epiteliais displásicas com a redução da adesão celular.

Com base nesses achados, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou as diferenças de expressão entre as MMPs no progresso da displasia epitelial oral para CCE na tentativa de reconhecer centros de proliferação, bem como de confirmar a remodelação da MEC intraepitelial. Os autores ainda examinaram MMP-1, -2 e -7 em 20 casos de displasia oral, carcinoma *in situ* e CCE e sugeriram que o aumento da MMP-7 teria um papel importante na proliferação celular e na transformação maligna, tornando-se um instrumento valioso nessa identificação⁽⁸⁾.

As MMPs estão envolvidas em diversos processos, alguns fisiológicos e também patológicos, como o câncer⁽¹⁴⁾. A atividade das MMPs é controlada em ao menos três níveis: transcrição, ativação proteolítica e inibição da atividade enzimática por inibidores naturais, enzimas conhecidas como TIMPs^(15, 16). A atividade da rede de MMPs é resultado do balanço entre os níveis da enzima ativa e os níveis de TIMPs, que juntos formam um sistema biológico complexo que controla estritamente a degradação da MEC. TIMPs também têm habilidade de formar um complexo com pro-MMPs, regulando o processo de ativação de MMP. Se por um lado já foi demonstrado que as TIMPs bloqueiam a atividade de MMPs, aspecto importante na inibição da tumorigênese e, conseqüentemente, na progressão da doença, por outro lado, essas enzimas podem participar da tumorigênese⁽¹⁷⁾.

Portanto, TIMPs na tumorigênese são consideradas moléculas multifuncionais, uma vez que atuam regulando proliferação celular, apoptose, atividade de pro-MMP-2 e angiogênese; e paradoxalmente podem com essas ações também facilitar a progressão da doença. O efeito inibitório de TIMP no crescimento tumoral e na metástase foi sugerido pela superexpressão do gene

dentro das células neoplásicas; porém, foi demonstrado que TIMP tem efeito estimulatório de crescimento e efeito antiapoptótico⁽¹⁸⁾.

Dessa forma, acredita-se que a função anti-MMP de TIMP pode desempenhar papel inibitório importante durante a fase tardia da progressão do tumor, mas, devido às suas atividades de promoção do crescimento e efeito antiapoptótico, pode atuar estimulando a formação na fase inicial da lesão⁽¹⁷⁾.

Dentre as moléculas que fazem parte da família das TIMPs, a mais conhecida é a TIMP-1. Sua produção é induzida por estímulos externos, como fatores de crescimento [fator de crescimento de fibroblasto (b-FGF); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento epidérmico (EGF)] e citocinas [interleucina 6 (IL-6), 1 (IL-1) e 1 β (IL-1 β)]. Ela é expressa por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, osteoblastos, condrócitos, células do músculo liso e muitas células do tumor, além de fluido corporal⁽¹⁸⁾.

O efeito estimulatório para o crescimento celular de TIMP-1 foi inicialmente reconhecido na atividade eritroide, porém, sabe-se que tal efeito não se limita a esse tipo celular. Em queratinócitos normais, fibroblastos, células do adenocarcinoma de pulmão e células do melanoma também já foi demonstrado efeito mitogênico⁽¹⁷⁾.

O aumento da expressão foi relatado como um aspecto paradoxalmente associado a prognóstico negativo em muitos tumores sólidos, como em câncer de mama, câncer colorretal, câncer de estômago e de pulmão⁽¹⁷⁾. Também foi relacionado com metástase locoregional e a distância. Vale ressaltar ainda que o alto nível de TIMP-1 no plasma de pacientes com câncer sugere que a molécula é um marcador da progressão da doença⁽¹⁹⁾.

A partir do exposto, fica evidenciado que as técnicas de biologia celular e molecular, as quais permitem melhor entendimento dos eventos que contribuem para o surgimento, crescimento tumoral, invasão e metástases, devem ser aplicadas para o estudo da carcinogênese oral. Algumas pesquisas demonstraram que a análise da expressão, regulação e localização da proteína TIMP-1 pode ser utilizada como possível marcador do prognóstico da invasividade em tumores de origem epitelial, como o CCE oral.

Assim, o presente trabalho avaliou o perfil da expressão de TIMP-1 na leucoplasia, lesão considerada como precursora do CCE, bem como no próprio tumor, em diferentes graus de displasia e de diferenciação, respectivamente, com intuito de traçar o perfil dessa importante proteína e de suas mudanças conforme a gravidade da lesão. Por fim, os achados imuno-histoquímicos foram confrontados com os aspectos histopatológicos adotados

na classificação de cada lesão para o estabelecimento de possíveis associações entre a expressão de TIMP-1 e as alterações teciduais e celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi constituída pelos casos de leucoplasia e de CCE registrados no Serviço de Anatomia Patológica Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES), entre os anos de 2004-2010. Para os estudos histopatológico e imuno-histoquímico foram resgatados os blocos parafinados do acervo do SAPB-UFES.

Foi considerada como critério de inclusão a presença de material suficiente nos blocos de parafina para obtenção das novas lâminas. Os espécimes de leucoplasia e CCE parafinizados foram obtidos por biópsia incisional ou excisional de pacientes referenciados ao Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca e Lesões de Boca (SIEX/PROEX), desenvolvido pelas disciplinas de Estomatologia e Cirurgia Bucomaxilofacial II do Departamento de Clínica Odontológica da UFES. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos – Centro de Ciências da Saúde/UFES e aprovado com protocolo e registro número 70/10.

Processamento imuno-histoquímico para TIMP-1

Para o ensaio imuno-histoquímico, os blocos de parafina foram submetidos à microtomia manual para obtenção de cortes de 3 μ m de espessura (microtomo Leica RM212 RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha). Os cortes passaram por uma solução de álcool a 30%, com a finalidade de esticá-los, e foram depois imersos em banho-maria a 45°C (Lupetec BH 05), e pescados com lâminas silanizadas (Immunoslide, EasyPath, Brasil) devidamente identificadas.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa (FANEM 900 kw, modelo 310, Brasil) a 60°C durante 120 minutos, e diafanizados em três banhos de xilol: xilol II; xilol I e álcool/xilol, tendo cada banho a duração de 5 minutos. Em seguida foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 80%) e água, cada banho com duração de 5 minutos. A remoção do pigmento formólico foi feita com solução de hidróxido de amônio (10%) em etanol (95%) por 10 minutos.

Os cortes foram lavados com *tryptic soy broth-tween* (TBST) por três vezes, sendo 5 minutos cada banho; em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica, utilizando uma solução tampão citrato

(ácido cítrico a 10 mM e 0,05% de *tween* 20 com pH 6), aquecida entre 95°C e 100°C, por 30 minutos. O sistema de detecção por polímeros foi o NovoLink Novocastra (Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemanha). Para neutralizar a peroxidase endógena, foi utilizado *peroxidase block* por 5 minutos, seguido de lavagem em TBST, duas vezes, por 5 minutos cada. As seções foram incubadas com *protein block* por 5 minutos e novamente lavadas em TBST, duas vezes, por 5 minutos cada. Utilizou-se o anticorpo primário monoclonal anti-TIMP-1 [Ms mAb to TIMP-1 (102D1), Abcam] diluído em TBS 1:100 por 60 minutos, em temperatura ambiente e câmara úmida. Os cortes foram novamente lavados em TBST, duas vezes, por 5 minutos e incubados com *post primary block* durante 30 minutos, seguidos de lavagem em TBST, duas vezes, por 5 minutos. A seguir, os cortes foram incubados com *polymer* por 30 minutos e lavados em tampão TBST, duas vezes, por 5 minutos cada lavagem. Foram adicionados 50 µl de diaminobenzidina (DAB) *chromogen* a 1 ml de DAB *substrate buffer (polymer)* para desenvolver a atividade de peroxidase por 5 minutos.

As lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos e em seguida enxaguadas em TBST por 3 minutos e submetidas à contracoloração com hematoxilina de Mayer. Procedeu-se a lavagem em água e hidróxido de amônio por 5 minutos, seguida de nova lavagem em água corrente por 10 minutos. A etapa final do protocolo foi a desidratação em série crescente de álcool 70%, 85%, 90%, absoluto e xilol durante 5 minutos cada uma, e montagem das lâminas com Ervmount (EasyPath, Brasil). O controle negativo foi feito pela omissão do anticorpo primário (dado não ilustrado).

Avaliação microscópica do perfil da expressão de TIMP-1

A análise da reatividade imuno-histoquímica para TIMP-1 foi realizada por um único examinador, previamente calibrado. As lâminas foram examinadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) que dispõe de microscópio óptico (Olympus AX70, Olympus America Inc., NY, USA).

Para avaliação da imunomarcação foram determinados os seguintes parâmetros:

- para leucoplasia – presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nos queratinócitos nas diferentes camadas do tecido epitelial da mucosa oral, considerando células em duas áreas das lesões, parênquima e estroma;
- para CCE – presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nas células neoplásicas, nas ilhas tumorais e no estroma.

Durante toda a etapa de estudo e descrição do perfil de expressão de TIMP-1, conforme os critérios mencionados anteriormente, examinaram-se as lâminas diretamente no microscópio. Objetivas de diferentes aumentos foram utilizadas, permitindo uma análise inicial panorâmica, com observação subsequente dos detalhes de marcação nas camadas, ilhas e células. Os achados microscópicos foram compilados e serão apresentados de maneira descritiva.

RESULTADOS

A amostra para análise imuno-histoquímica foi representada pelos espécimes cirúrgicos emblocados com quantidade de material suficiente para obtenção das novas lâminas e composta por dois casos de cada grau de leucoplasia (leve, moderada e severa) e de dois casos de cada tipo de CCEs (grau I e grau II).

A imunomarcação para TIMP-1 foi observada em todos os espécimes, com intensidade e localização variando entre as lesões e em locais diferentes em uma mesma lesão.

Expressão de TIMP-1 em lesões de leucoplasia

Nos cortes de leucoplasia leve, a expressão de TIMP-1 foi detectada em diferentes tecidos e células analisados, incluindo epitélio de revestimento, fibroblastos, células endoteliais no tecido conjuntivo subjacente, células musculares estriadas esqueléticas e citoplasma de ductos de glândulas mucosas. Com relação ao tecido epitelial, a marcação foi observada em toda a sua espessura, contudo, quando se analisaram as camadas, foi possível identificar que queratinócitos da camada basal apresentaram imunomarcação mais intensa e com aspecto citoplasmático de presença de grânulos contendo a proteína estudada, destacada nas regiões com hiperplasia das células basais. Não foi possível estabelecer padrão de marcação nuclear; algumas células epiteliais apresentaram núcleo corado em azul, enquanto outras, aspecto de imunomarcação, com núcleo acastanhado. Essa variação foi mais evidente nas células com perda de polaridade (**Figura 1A e B**).

Na leucoplasia moderada foi detectada imunomarcação em todas as camadas do tecido epitelial de revestimento, com exceção da córnea. Contudo, diferente do observado na leucoplasia leve, não foi identificada variação na intensidade da expressão entre as camadas do epitélio, assim como não houve predominância de TIMP-1 em relação a qualquer fator displásico (**Figura 1C e D**).

Na leucoplasia severa, todas as camadas do tecido epitelial apresentaram expressão de TIMP-1, porém, de maneira heterogênea. As células da camada espinhosa foram as que

apresentaram imunomarcção mais intensa quando comparadas com os demais estratos do epitélio. Contudo, os queratinócitos dessa camada também apresentaram variação na expressão da proteína, estando entre bem e pouco marcados. Apesar da presença de áreas extensas com pleomorfismo celular e nuclear, nessas regiões não houve variação na expressão de TIMP-1 (**Figura 1E e F**).

Expressão de TIMP-1 em lesões de CCE

Ao analisar o CCE grau I, foi possível observar expressão de TIMP-1 tanto no parênquima quanto no estroma tumoral; entretanto, as células estromais apresentaram intensidade de marcação menor quando em comparação com as células epiteliais (**Figura 2A**). No parênquima, a marcação não foi uniforme. As camadas mais profundas da lesão apresentaram marcação intensa em células com pleomorfismo e em áreas com mitoses (setas); já as células com perda de polaridade apresentaram marcação mais fraca (*) (**Figura 2B**). Em regiões invasivas, como as ilhas tumorais,

houve variação na imunomarcção; as células menos diferenciadas tiveram marcação menor (**Figura 2C** – seta). Por sua vez, queratinócitos com aumento de nucléolos e alterações na relação núcleo-citoplasma apresentaram expressão maior. Em locais com presença de pérolas córneas bem organizadas, foi observada expressão intensa nos queratinócitos periféricos e marcação fraca ou ausente nas células centrais (**Figuras 2D-F**).

No CCE grau II, estroma e parênquima apresentaram marcação heterogênea (**Figura 3A**). No estroma, foi observada marcação em fibroblastos (**Figura 3B**). Já para o parênquima tumoral, houve variação na expressão da molécula conforme a camada. Células basais com hiperplasia apresentaram marcação intensa, assim como as células da camada espinhosa. Contudo, entre essas duas regiões, foi detectada uma faixa de queratinócitos, correspondente a camada parabasal, com queratinócitos não marcados (**Figura 3B-D**). Assim como descrito para CCE grau I, nas ilhas tumorais, houve variação

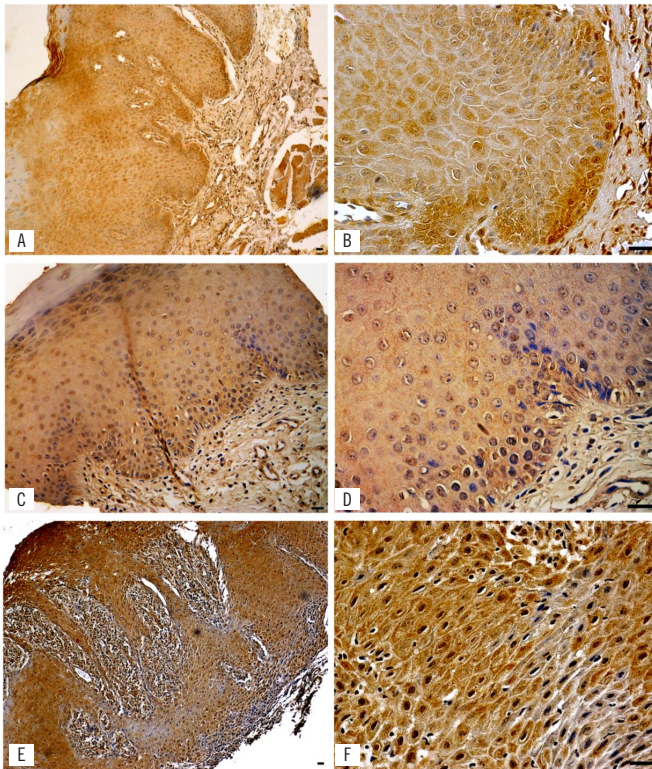


FIGURA 1 – Fotomicrografias de imunomarcção para TIMP-1 em leucoplasias

A) leucoplasia leve com expressão da proteína em epitélio conjuntivo, vasos e músculo estriado esquelético; B) imunomarcção em todas as camadas do epitélio, sendo mais intensa na camada basal e na área de hiperplasia; C e D) leucoplasia moderada com expressão de TIMP-1 em todas as camadas do epitélio, sem variação da intensidade entre os estratos; E) leucoplasia severa com imunomarcção heterogênea, presente em todas as camadas epiteliais; F) intensidade maior na camada espinhosa, com queratinócitos pleomórficos e variação entre bem e pouco marcados; barra de escala = 20 μ m. TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase 1.

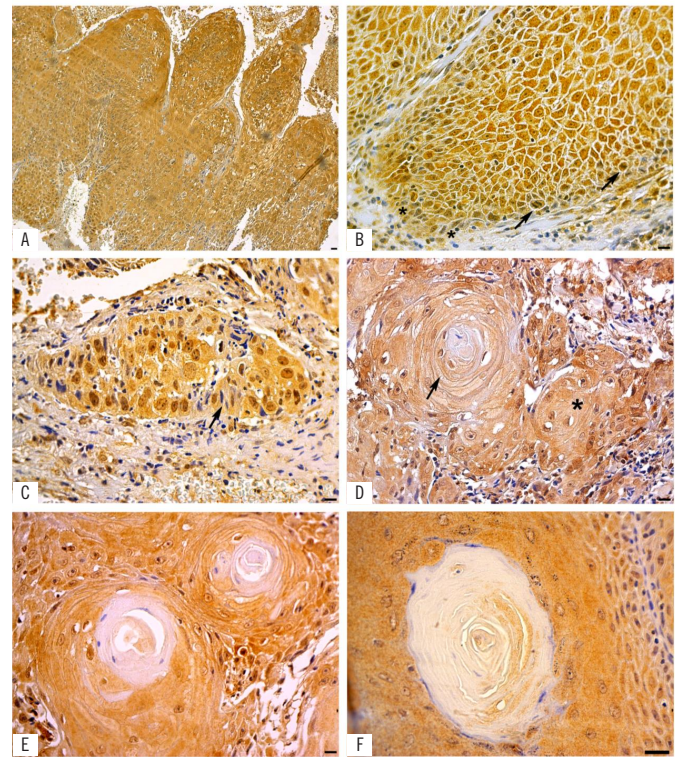


FIGURA 2 – Fotomicrografias de imunomarcção para TIMP-1 em CCE grau I

A) visão panorâmica com expressão da molécula no estroma e no parênquima, neste último sendo mais intensa; B) camadas mais profundas da lesão com marcação intensa em células pleomórficas e em mitoses (setas); células com perda de polaridade apresentaram marcação mais fraca (*); C) ilha tumoral com células apresentando variação na expressão de TIMP-1 – as menos diferenciadas tiveram marcação menor (seta); células do estroma ao redor da ilha pouco marcadas; D) peróla córnea em formação (*) e estrutura propriamente dita (seta), exibindo padrões de expressão de TIMP-1 diferentes; E e F) presença de pérolas córneas bem organizadas, com marcação intensa nos queratinócitos periféricos e marcação bem fraca ou ausente nas células centrais; barra de escala = 20 μ m.

TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase 1; CCE: carcinoma de células escamosas.

na marcação. Células com nucléolos proeminentes possuíam marcação citoplasmática intensa, enquanto aquelas menos diferenciadas deixaram de expressar a proteína (**Figura 3E**). Outro aspecto observado foi a não marcação em pérolas córneas, estando essas em menor número e tamanho quando comparadas com as pérolas em lesões de CCE grau I (dado não ilustrado). Observou-se também a inversão na expressão da molécula em áreas da lesão nas quais a estrutura do epitélio estava mantida, sendo detectada a presença de células da camada espinhosa bem marcada, enquanto queratinócitos da camada basal e com perda de polaridade foram fracamente marcados (**Figura 3F**).

A **Figura 4** apresenta as lesões avaliadas no estudo, permitindo uma observação panorâmica tanto dos aspectos histopatológicos (A-E), quanto do perfil da imunomarcação (F-J). É possível observar que TIMP-1 foi expressa em todos os casos analisados e de forma heterogênea.

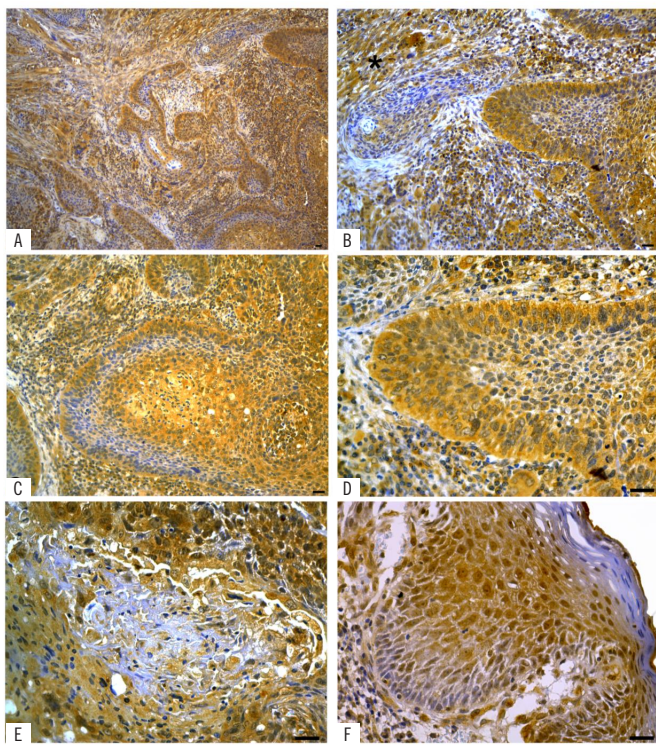


FIGURA 3 – Fotomicrografias de imunomarcação de TIMP-1 em CCE grau II A) imagem panorâmica mostrando áreas invasivas e perda da arquitetura do epitélio. Marcação presente no parênquima e no estroma de forma heterogênea; B) fibroblastos expressando TIMP-1 (C) e camada epitelial basal hiperplásica com intensa marcação; C e D) detalhe do epitélio mostrando variação na expressão da molécula entre estratos, queratinócitos da camada basal e da camada espinhosa bem marcados e células da camada parabasal não marcadas; E) ilha tumoral com variação na expressão de TIMP-1, sendo a maior parte das células pouco diferenciadas e pouco marcadas; F) área da lesão em que a estrutura do epitélio está mantida, presença de células da camada espinhosa bem marcadas, enquanto os queratinócitos da camada basal e com perda de polaridade estão fracamente marcados; barra de escala = 20 μ m. TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase 1; CCE: carcinoma de células escamosas.

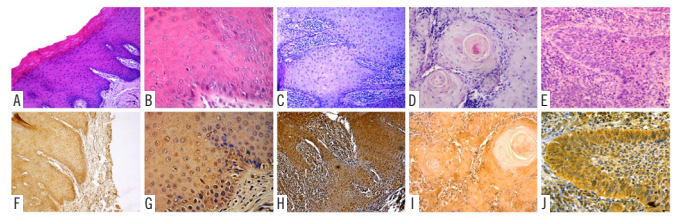


FIGURA 4 – Fotomicrografias de leucoplasias e de CCEs orais em coloração HE (A-E) e imunomarcadas para TIMP-1

Leucoplasia leve (A e F); leucoplasia moderada (B e G); leucoplasia severa (C e H); CCE grau I (D e I); CCE grau II (E e J); barra de escala = 20 μ m.

CCE: carcinoma de células escamosas; HE: hematoxilina e eosina; TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase 1.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo descrever a expressão e distribuição da TIMP-1 em leucoplasia e CCE provenientes de biópsias incisionais e excisionais do SAPB-UFES. A imunohistoquímica foi utilizada, pois permite a visualização da localização e a correlação com a morfologia, especialmente com eventos celulares na interface estroma/tumor.

Já se sabe que o processo de proteólise é importante em todos os estágios do desenvolvimento e da progressão do câncer. Dentro desse contexto, Chambers e Matrisian (1997)⁽²⁰⁾, em revisão, mostraram evidências que sugerem um papel complexo de MMPs nas etapas anteriores e após a degradação da MEC. Tanto as enzimas, quanto os seus inibidores, como as TIMPs, mostraram-se importantes reguladores de crescimento tumoral, atuando sobre os sítios primários e metastáticos das neoplasias.

O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs é aspecto reconhecido que favorece a degradação da MEC, facilitando a invasão e metástase tumoral. Entre as várias MMPs envolvidas na tumorigênese, estudos vêm mostrando que a MMP-2 e a MMP-9 desempenham papel relevante na progressão tumoral. Suas expressões aumentadas já foram observadas em várias neoplasias, e esse aumento quase sempre vem acompanhado de atividades invasiva e metastática maiores, que levam a uma diminuição da sobrevida do paciente⁽²¹⁻²³⁾.

Embora todos os membros da família TIMP possuam capacidade de inibir atividade de MMPs, já foi descrito que essa inibição é seletiva. Em relação a TIMP-1, alvo deste estudo, Baker *et al.* (2002)⁽²⁴⁾ e Lambert *et al.* (2004)⁽¹⁸⁾ descrevem-na como inibidor de todas as MMPs, exceto a MMP do tipo membrana e MMP-19. Ainda, seus alvos preferenciais são as MMPs 7, 9, 1 e 3⁽²⁵⁾.

A literatura também demonstrou, no entanto, que as TIMPs estão envolvidas em várias atividades biológicas, incluindo

diferenciação celular; crescimento, migração, invasão, angiogênese e apoptose; todos esses efeitos celulares são mediados independentemente de sua capacidade de inibir atividade de MMPs⁽²⁶⁾.

Outro aspecto importante a se destacar ainda é a diversidade de atividades dessa família de moléculas. Embora sejam proteínas secretadas e com funcionamento extracelular, já tiveram identificados receptores de superfície, sugerindo, portanto, um controle do comportamento celular com sinalização conhecida como “de fora para dentro da célula”⁽²⁵⁾.

Ao demonstrarmos que lesões de leucoplasia e de CCE orais expressam a molécula TIMP-1, torna-se possível buscar correlações entre o perfil da expressão com aspectos histopatológicos, os quais são relevantes na determinação da gravidade de cada lesão, seja ela o carcinoma propriamente dito ou sua lesão precursora.

O perfil da imunomarcagem sofreu variação entre as lesões (leucoplasias e CCEs) e também dentro de cada lesão. Nos casos de leucoplasias, independente do grau de displasia, todas expressaram TIMP-1 nos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular estriado esquelético. Para a leucoplasia classificada com grau de displasia leve, a expressão de TIMP-1 foi mais evidente na camada basal e em áreas de hiperplasia basal. De maneira diferente, as células da camada basal que apresentaram perda de polaridade tiveram expressão menor da molécula quando em comparação com as demais células. Sendo TIMP-1 uma molécula sintetizada e secretada, sugere-se que a desorganização do citoplasma e das organelas envolvidas na síntese, em função da perda de polaridade, pode ter como resultado a diminuição da produção e o acúmulo da proteína.

Para a leucoplasia moderada, não foi estabelecida nenhuma correlação entre fatores displásicos e expressão de TIMP-1, enquanto para leucoplasia severa, todas as camadas do tecido epitelial apresentaram expressão de TIMP-1, porém, de maneira heterogênea. As células da camada espinhosa foram as que apresentaram imunomarcagem mais intensa, e os queratinócitos dessa camada também tiveram variação na expressão da proteína, estando entre muito e pouco marcados, independente do pleomorfismo celular e nuclear.

Apesar das moléculas de TIMP terem uma função reguladora da remodelação de MEC, é importante ressaltar que já foram encontrados sítios de ligação para TIMP-1 na superfície celular de queratinócitos, de fibroblastos e de células tumorais, como no câncer de mama. Embora esse grupo de receptores ainda necessite de mais estudos, acredita-se que possam participar da transdução de sinais intracelulares^(27, 28).

Embora o padrão de distribuição de TIMP-1 tenha variado entre as leucoplasias, conforme mencionado, e tenha sido possível correlacionar alguns aspectos celulares da displasia com presença maior ou menor da molécula, ainda restam lacunas que precisam ser preenchidas para que se possa definir a relação entre a expressão da enzima, assim como de outras TIMPs, e a gradação da displasia nessa importante lesão precursora do CCE oral.

Algumas dessas lacunas vêm sendo preenchidas com estudos em desordens com potencial de malignização, como é o caso das leucoplasias, e dos diferentes graus displásicos de lesões e condições. Chen *et al.* (2008)⁽²⁹⁾ avaliaram MMPs-2 e -9 e TIMP-2 no espectro de líquens planos não atrófico, atrófico e em carcinomas originados de líquen plano, na tentativa de elucidar o balanceio entre essas proteínas na progressão para o CCE. Nas lesões sem a presença de fatores displásicos, a expressão da TIMP-2 foi de moderada a forte, principalmente no citoplasma das células basais e espinhosas, contrariamente à imunomarcagem da MMPs. Apesar do aumento da TIMP-2 durante a cancerização do líquen plano, sua expressão foi menor que a das MMPs.

Poucos estudos relacionam a expressão do TIMP-1 com as leucoplasias e com seus graus de displasias. Esse fato tornou-se um desafio durante a análise, mas ao mesmo tempo foi motivador, no entendimento do seu papel na carcinogênese, vastamente descrito em outros tipos de câncer. Sutinen *et al.* (1998)⁽³⁰⁾ compararam a expressão de TIMP-1 mRNA em lesões com displasia epitelial oral (leve, moderada e severa), líquen plano oral, CCE e linfonodos com metástase. Os resultados não foram notáveis para as displasias epiteliais e líquen plano; porém, foi observada imunomarcagem positiva e fraca no estroma dos CCEs orais e nos linfonodos, sugerindo uma menor ativação nas áreas do carcinoma propriamente estabelecido.

Nossas análises mostraram que, nas lesões de CCE, foi possível identificação da proteína tanto no estroma quanto no parênquima tumoral, com os fibroblastos do CCE grau II, apresentando marcação mais evidente. Vicente *et al.* (2005)⁽³¹⁾, em estudo da imunorreatividade de TIMP-1 em 45 casos de CCE, relataram 19 casos (28%) em que a molécula também era expressa no estroma e ao redor das células tumorais. Vale ressaltar que o microambiente, antes considerado apenas como estrutura de suporte passivo, foi reconhecido como fator dinâmico efetivo na progressão tumoral. Além das células estromais, esse ambiente contém MEC, proteínas e seus inibidores, vasos, nervos e células do sistema imune, que são importantes participantes do processo.

Contudo, foi no parênquima tumoral que as variações de marcação apresentaram alguns aspectos importantes que devem ser considerados e pontuados, principalmente no que se refere a

presença ou ausência de TIMP-1 em áreas invasivas, como as ilhas tumorais e células menos diferenciadas.

Para o CCE grau I, foi detectada presença de TIMP-1 em todas as camadas do epitélio; o mesmo não ocorreu no CCE grau II. Neste último, células basais com hiperplasia apresentaram marcação intensa, assim como as células da camada espinhosa. Porém, entre essas duas regiões foi detectada uma faixa de queratinócitos, correspondente à camada parabasal, não marcados.

Vicente *et al.* (2005)⁽³²⁾ também detectaram a presença da proteína em CCE com expressão heterogênea. Os autores descreveram que 45 (66,2%) de 68 casos de CCE apresentaram marcação, sendo 11 (16,2%) fortemente expressa, 16 (23,5%) com imunomarcção entre 10% e 50% das células do tumor, 18 (26,5%) expressaram menos do que 10% de células positivas e 23 casos foram negativos.

A análise realizada nesse trabalho permitiu ainda caracterizar as camadas mais profundas dos CCEs como as com marcação intensa em células com pleomorfismo e em áreas com mitoses, sejam elas típicas ou atípicas. Já as células com perda de polaridade estavam com menor expressão. Esse último aspecto foi semelhante ao descrito para leucoplasia leve e severa.

Devemos destacar o perfil da imunomarcção em regiões invasivas, como as ilhas tumorais. Nesses locais, tanto para CCE grau I quanto para grau II, houve variação na imunomarcção. As células menos diferenciadas tiveram marcação menor; por sua vez, queratinócitos com aumento de nucléolos e alterações na relação núcleo-citoplasma tiveram expressão maior. As células que mantinham aspectos microscópicos que caracterizam o epitélio, como justaposição e alguma polaridade, eram as que ainda expressavam TIMP-1. Porém, o CCE grau II apresentava suas ilhas com maior proporção de células indiferenciadas e, portanto, menos marcadas quando em comparação com o grau I. Esses dados corroboram os de Vicente *et al.* (2005)⁽³²⁾, que observaram a presença de TIMP-1 em ninhos e cordões epiteliais em três padrões distintos, sendo homogêneo somente na parte central do ninho de células tumorais e disperso ou irregular.

A literatura ainda é controversa quanto à expressão de TIMP-1 e seu papel na tumorigênese. Já foi demonstrado que a sobre-expressão de TIMP-1 inibe crescimento e metástase de melanoma⁽³³⁾ e suprime a capacidade metastática das células do câncer gástrico humano⁽³⁴⁾ e de células de carcinoma escamoso oral⁽³⁵⁾.

Por outro lado, também houve relatos associando TIMP-1 com potencial de invasão e metástase. Palikhe *et al.* (2010)⁽¹⁹⁾, em estudo com pacientes com câncer de cabeça e pescoço, avaliaram o nível de TIMP no plasma e encontraram associação entre a

concentração de TIMP e a maior sobrevida; como TIMP inibe MMP e também funciona como fator de crescimento, pode influenciar diretamente na progressão do câncer.

Nossos achados sugerem que nas áreas invasivas, como ilhas tumorais, em que é possível detectar células que estão perdendo suas características de epitélio e que, como consequência, possuem comportamento mais agressivo, a expressão de TIMP-1 está reduzida. No entanto, para melhor avaliação, seria necessário estudo com análise semiquantitativa ou quantitativa, além da descritiva.

Em locais com presença de pérolas córneas bem organizadas, foi observada expressão intensa nos queratinócitos periféricos e marcação fraca ou ausente nas células centrais. As pérolas são áreas de queratinização que remetem ao evento normal de formação da camada córnea, mas que nos CCEs ocorrem de maneira intraepitelial e não na superfície do tecido⁽³⁶⁾. A imunomarcção negativa nessas estruturas, características de CCE, sugere que as células achatadas, eosinófilas e translúcidas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas lisossomais e cujo citoplasma repleto de numerosos tonofilamentos de queratina, impossibilitaram a marcação por TIMP-1⁽³⁷⁾.

Devemos ressaltar que, no estudo da carcinogênese e da doença estabelecida, invasão e metástase são aspectos que podem ser avaliados microscópica e clinicamente; já a expressão de TIMP-1 pode ser uma valiosa ferramenta de auxílio no diagnóstico, sendo possível sua análise por meio de imuno-histoquímica. Apesar das marcações com anticorpos monoclonais serem bastante específicas e evidenciam o comportamento biológico das células, a quantificação visual nem sempre é precisa. Portanto, é importante ressaltar que um desafio significativo dessa técnica é a determinação da intensidade da marcação, pois pode apresentar grande variabilidade.

Sendo assim, o estudo do padrão da expressão de TIMP-1 tem apresentado, em sua maioria, análises subjetivas ou semiquantitativas, atribuindo escores aos diferentes níveis de imunomarcção. Neste estudo, a análise da expressão da proteína em questão se restringiu à comparação de intensidade entre os diferentes tecidos em um mesmo corte, impossibilitando comparações com outros estudos que atribui escores.

Todavia, a realização de estudos que buscam justamente identificar biomarcadores que possam inibir a atividade das MMPs, e com isso uma possível redução na progressão da doença ou até mesmo na malignização de lesões precursoras, tem seu valor como ferramenta auxiliar não somente no prognóstico, como também para o estabelecimento de futuros candidatos a agentes terapêuticos. Dentre esses medicamentos, citam-se os

peptideomiméticos, os não peptideomiméticos, os derivados da tetraciclina e os bisfosfonatos; todos eles interferem na expressão e ativação das MMPs, reduzindo a função dessas enzimas e consequentemente degradando a MEC, inibindo, dessa maneira, a função das MMPs como forma alternativa de terapia anticâncer⁽³⁸⁾.

CONCLUSÃO

Baseados nos experimentos e nas análises realizados, concluímos que:

- o padrão de expressão de TIMP-1 teve associação com aspectos celulares displásicos, como hiperplasia da camada basal e perda de polaridade nas leucoplasias e CCEs, independente dos graus de displasia e diferenciação, respectivamente;
- os CCEs, nas áreas do parênquima tumoral povoadas por células que sofreram o processo de desdiferenciação, tiveram expressão menor ou até mesmo ausente de TIMP-1;
- no CCE grau II, as áreas de ilhas tumorais com perda de aspectos microscópicos de tecido epitelial e menor expressão de TIMP-1, foram mais frequentes do que no CCE grau I.

REFERÊNCIAS

1. Waal VD, Schepman KP, Meji EHVD, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997; 33(5): 291-301.
2. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol.* 2007; 1(1): 61-6.
3. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82(7): 878-887.
4. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
5. Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dental Educat.* 2001; 65(11): 1282-90.
6. Reibel J. Prognosis of oral premalignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(1): 47-62.
7. Warnakulasuiya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(3): 127-33.
8. Tilakaratne WM, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, et al. Matrix metalloproteinase 7 and perlecan in oral epithelial dysplasia and carcinoma in situ: an aid for histopathologic recognition of their cell proliferation centers. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38(4): 348-55.
9. Shimamura Y, Abe T, Nakahira M, Yoda T, Murata SI, Sugawara M. Immunohistochemical analysis of oral dysplasia: diagnostic assessment by fascin and podoplanin expression. *Acta Histochem Cytochem.* 2011; 44(6): 239-45.
10. Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. *Bri J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 44(6): 482-6.
11. Barros SSLV, Henriques ACG, Pereira KMA, Medeiros AMC, Galvão HC, Freitas RA. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(8): 752-60.
12. Ikarashi T, Ida-Yonemochi H, Ohshirok, Cheng J, Saku T. Intraepithelial expression of perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan reflects dysplastic changes of the oral mucosal epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(2): 87-95.
13. Singh RD, Haridas N, Patel JB, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. *Ind J Clin Biochem.* 2010; 25(3): 250-59.
14. Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274(31): 21491-4.
15. Woessner Jr JF. MMPs and TIMPs-An historical perspective. *Mol Biotechnol.* 2002; 22(1): 33-49.
16. Woessner Jr JF. MMPs and TIMPs. An historical perspective. *Methods Mol Biol.* 2001; 151: 1-23.
17. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene.* 2002; 21(14): 2245-52.
18. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004; 49(3): 187-98.
19. Palikhe PP, Vesterinen T, Tarkkanen J, et al. Plasma level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not that of matrix metalloproteinase-8 predicts survival in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2010; 46(7): 514-18.
20. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(17): 1260-70.
21. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3): 161-74.
22. Freitas VM, Vilas-Boas VF, Pimenta DC, et al. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. *Am J Pathol.* 2007; 171(1): 124-38.

23. Gama-de-Souza LN, Cyreno-Oliveira E, Freitas VM, et al. Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. *Matrix Biol.* 2008; 27(5): 402-19.
24. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002; 115 (19): 3719-27.
25. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20(3): 161-8.
26. Brew K, Nagase H. The inhibitors of metalloproteinase (TIMPs): an ancient family with structural and cuncional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(1): 55-71.
27. Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol.* 1991; 97(4): 679-85.
28. Corcoran M, Stetler-Stevenson W. Tissue inhibitor of metalloproteinase- 2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 1995; 270(22): 13453-59.
29. Chen Y, Zhang W, Geng N, Tian K, Windsor LJ. MMPs, TIMP-2, and TGF-b1 in the cancerization of oral lichen planus. *Head & Neck.* 2008; 30(9): 1237-45.
30. Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and 2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral premalignant lesions, oral squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 1998; 77(12): 2239-45.
31. Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2005; 41(3): 283-293.
32. Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Arranz JSL. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and-2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2005; 41(6): 568-79.
33. Khokha R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(4): 299-304.
34. Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, Mai M, Sasaki T, Seiki M. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer.* 1996; 77(8): 1676-80.
35. Nii M, Kayada Y, Yoshiga K, Takada K, Okamoto T, Yanagihara K. Suppression of metastasis by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in a newly established human oral squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol.* 2000; 16(1): 119-24.
36. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral & maxilofacial.* 3 ed. Rio de Janeiro: editora Koogan; 2004.
37. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
38. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundadram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci.* 2010; 17(1): 10-23.

AUTOR CORRESPONDENTE

Susy Carmelita Pereira do Nascimento  0000-0002-2898-7375
e-mail: susycarmel@hotmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.