

## **Agradecimentos**

A Jesus Cristo, sem Ele nada seria possível, conhece-Lo e acreditar transforma a minha vida num milagre.

Ao Adélio, meu companheiro de todas as horas que enche os meus dias de felicidade.

À minha querida filha, pelas ausências a que a obriguei, e porque sempre acreditou na mãe.

Aos meus pais pelo seu amor incondicional.

Ao meu irmão Zee, pela sua força e pela coragem que me transmite.

Ao Hugo, à Cris e à Inês pela alegria e presença assídua na minha vida.

À Carla, minha irmã do coração que está sempre comigo, mesmo sem ser chamada.

À Paula pela ajuda e disponibilidade constante.

À minha amiga Leonor, pelo seu sorriso e pelo que nos divertimos durante o mestrado.

À Ana, sempre com brincadeiras e gargalhadas contagiantes.

Aos colegas que trilharam este caminho comigo.

Aos meus amigos.

Ao Professor Luís Monteiro, o amigo com quem tanto aprendo todos os dias.

A todos os meus Professores.

Ao coordenador de Mestrado, Professor Doutor Fernando Ferreira.

A todos MUITO OBRIGADA.

## Resumo

O cancro oral é um sério problema de saúde pública mundial representando, com a faringe, o sexto tipo de cancro mais frequente em todo o mundo. Apesar dos recentes avanços no seu tratamento, as taxas de sobrevivência continuam perto dos 50%. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à carcinogénese oral, nomeadamente ao seu tipo histológico mais frequente (carcinomas espinocelulares), resultará num número crescente de biomarcadores que podem ser usados para prever o comportamento da doença.

A CD147 é uma proteína codificada pelo gene BSG, expressa por células epiteliais, endoteliais e leucócitos, sendo conhecida como indutora das metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) – proteases que participam na degradação da matriz extracelular. O aumento da expressão de CD147 nos carcinomas espinocelulares orais (CEO) poderá ser um indicador da actividade das MMPs, da invasão tumoral e, conseqüentemente, da agressividade tumoral.

Para estudar a expressão da CD147 em CEO através de técnicas Imuno-histoquímicas seleccionaram-se 99 casos de CEO provenientes do arquivo do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António (HGSA). De cada bloco de TMA efectuado, realizaram-se cortes histológicos, submetidos posteriormente à técnica Imuno-histoquímica através do uso da técnica de polímero HRP.

Os resultados obtidos demonstram que a CD147 está presente nos carcinomas orais tendo possivelmente um papel importante na génese tumoral dos CEO.

## Summary

Oral squamous cell carcinoma is the most common cancer of oral cavity, although some prognostic factors remain unclear. CD147 protein is codified by BSG gene, and expressed in epithelial cells, endothelial cells and leukocytes. CD147, also known by EMMPRIN – Extracellular matrix metalloproteinase inducer plays a critical role in the progression of malignancies by stimulating expression of metalloproteinases (MMPs) and it might be an indicator of the invasive behavior of oral squamous cell carcinoma.

The aim of this study was to determine the expression pattern of CD147 in 99 samples of oral squamous cell carcinoma, which had been diagnosed by pathological examination, obtained from Hospital Geral de Santo António (HGSA).

Immunohistochemical studies were performed in Tissue Microarrays, according to the instructions of the reagent kit - Polymer Detection System - NovoLink™- Leica Microsystems. Primary tumours were stained for CD147 protein using a primary mouse monoclonal anti-CD147 antibody.

These preliminary results indicate the positive expression of CD147 in oral squamous cells carcinomas. We thus conclude that CD147 probably plays a crucial role in tumorigenesis of OSCC.

# Índice

INTRODUÇÃO .....	9
OBJECTIVO .....	11
MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
Seleccção dos casos.....	12
Construção do TMA e Técnica de Imuno-histoquímica .....	12
Técnica de Imuno-histoquímica.....	14
Critérios de Avaliação .....	15
A análise estatística.....	15
RESULTADOS .....	16
DISCUSSÃO .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
ANEXOS .....	27

## **Lista de Abreviaturas**

Atg – antigénio

CEO – Carcinoma Espinocelular oral

DAB - Diaminobenzidina

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

HE – Hematoxilina e Eosina

HGSA – Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António

HRP – *Polymer Detection System*

MEC – Matriz extra celular

MMPs – Metaloproteinases

O.N. – Over Night

OSCC – *Oral Squamous Cell Carcinoma*

TMA – *Tissue Microarrays*

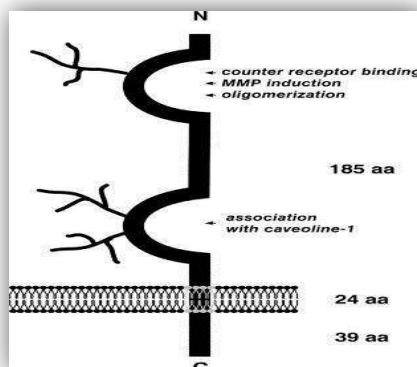
## **INTRODUÇÃO**

O cancro oral é um sério problema de saúde pública mundial representando, com a faringe, o sexto tipo de cancro mais frequente em todo o mundo. Estes correspondem a carcinomas espinocelulares em mais de 90% dos casos. Apesar dos recentes avanços no seu tratamento a sua sobrevivência não melhorou nas últimas décadas continuando perto dos 50% (6). Avanços na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao CEO resultaram num número crescente de biomarcadores que podem ser usados para prever o comportamento da doença. Alguns marcadores moleculares foram identificados e classificados em cinco grupos com base nas suas funções biológicas: a activação do ciclo celular e proliferação; supressão tumoral e apoptose; hipóxia; angiogênese e adesão celular e degradação da matriz. Os biomarcadores de activação do ciclo celular e proliferação mostraram os resultados mais divergentes no prognóstico. Estudos sobre a supressão do tumor e de marcadores de apoptose foram os mais prevalentes (1). Há poucos estudos de hipóxia, angiogênese e os estudos da adesão celular e biomarcadores de degradação da matriz mostram que este grupo tem o maior potencial para a avaliação dos parâmetros prognósticos. Entre as várias proteínas analisadas, os níveis de expressão imuno-histoquímica do receptor do factor de crescimento epitelial (EGFR), p53 e MMPs têm demonstrado valor prognóstico em CEO (1). A génese e o desenvolvimento tumoral baseiam-se em alguns fenómenos e alterações que ocorrem na fisiologia das células, como por exemplo, a indução de sinais de crescimento, insensibilidade para os factores de inibição dos sinais de crescimento, a desregulação da apoptose, a facilitação da angiogénese e a invasão tecidual (1). A capacidade de invadir tecidos adjacentes e produzir metástases em áreas distintas e remotas são características que definem as neoplasias malignas. Como tal a existência de metástases é um factor de mau prognóstico em pacientes com cancro, nomeadamente em pacientes com CEO. Consequentemente, a compreensão dos processos da invasão tumoral e metástases pode "mostrar" novos alvos terapêuticos (2).

## CD 147

A CD147 é uma proteína codificada pelo gene BSG, constituída por um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático (figura 1). É expressa por células epiteliais, endoteliais e leucócitos sendo também conhecida como indutora das MMPs – proteases que participam na degradação da matriz extracelular. As MMPs activadas estão geralmente presentes em maior quantidade nos tecidos malignos do que nos benignos, ou pré-malignos com uma alta expressão ocorrendo em áreas de invasão activa na interface tumor-estroma. As MMP-2 e MMP -9 (colagenases tipo IV) são proteases essenciais para a invasão da membrana basal. A MMP-2 é produzida por células mesenquimais e a MMP-9 é secretada por células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos. Ambas são consideradas como reguladoras da angiogénese patológica. (3)

A expressão aumentada de CD147 nos CEO pode indicar a presença e actividade de MMPs e uma rápida invasão tumoral.



**Figura 1** - Esquema da molécula CD147/EMMPRIN

A CD147 contém um domínio extracelular composto por duas alças Ig com três oligossacarídeos, domínio transmembranar e um domínio de 39 aa citoplasmáticos. O primeiro domínio Ig é necessário para a actividade do receptor e está envolvido na indução de MMP e e oligomerização. O segundo domínio Ig é necessário para a associação com a caveolina-1 que leva à diminuição da adesão na superfície da célula. Adaptado de Muramatsu e Miyuchi (4).

### **Tissue Microarrays**

Os *Tissue Microarrays* (TMAs) são blocos de parafina que contêm vários cilindros de tecido, provenientes de amostras armazenadas em blocos de parafina. Desde a descrição inicial com método semiautomático, por *Kononen* em 1998, a sua utilização tem sido amplamente utilizada e validada em investigação. Para além de ser económico, pode também ser aplicado a programas de controlo de qualidade inter e intra-laboratorial e para optimização de reagentes para tecidos destinados a diagnóstico. O seu formato de amostragem múltipla reduz o custo dos reagentes e tempo, tanto na realização da técnica como na avaliação dos resultados.

A crítica mais frequentemente feita ao TMAs é a pouca representatividade que apresentam quando comparados aos cortes histológicos normais. No entanto, tem sido demonstrada uma concordância elevada entre os cilindros dos TMAs e o tecido inteiro na avaliação imuno-histoquímica de vários tipos de tumores.

### **OBJECTIVO**

Avaliar a expressão da CD147 em carcinomas espinocelulares orais *in situ* e invasivos através de imuno-histoquímica.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleccção dos casos

Foram incluídos 99 casos de carcinomas orais provenientes do arquivo do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António (HGSA), diagnosticados entre 2000-2006. A idade média dos pacientes foi 58,36 anos ( $\sigma \approx 15,4$ ) compreendidas entre 36 e 89 anos.

Os casos foram cedidos, exclusivamente, para fins de investigação e estudos retrospectivos após aprovação pelo serviço e comissão de ética do HGSA.

<b>Género</b>	<b>%</b>
Feminino	22%
Masculino	78%
<b>Idade</b>	<b>Valores</b>
Média de Idades	58,36
Intervalo de Idades	36-89

### Construção do Tissue Microarray e Técnica de Imuno-histoquímica

As áreas tumorais representativas foram seleccionadas a partir da observação das respectivas secções de tecido corado pela técnica de rotina histológica – hematoxilina-eosina (HE) e marcadas no bloco de parafina correspondente (*bloco dador*). Antes da elaboração do TMA propriamente dito, foi efectuado o mapa das amostras (ver figura 2) tendo em conta a dimensão predefinida de 6x4 *cores*. Foram seleccionados dois *cores*/cilindros de tecido (2mm de diâmetro) de cada amostra e incluídos no bloco de parafina receptor (*array*). Esta operação foi realizada recorrendo ao *kit* caneta extractora para TMA (*TMA builder - Histopathology Ltd, Hungary*) e ao seu respectivo molde.

<b>Parafina</b>	<b>Caso 1</b> 2	<b>Caso 2</b> 1	<b>Caso 3</b> 1	<b>Caso 4</b> 1	<b>Gengiva Normal</b>
<b>Caso 5</b> 1	<b>Caso 6</b> 1	<b>Caso 7</b> 1	<b>Fígado</b>	<b>Caso 8</b> 1	<b>Caso 9</b> 1
<b>Caso 10</b> 1	<b>Caso 11</b> 1	<b>Caso 12</b> 1	<b>Caso 13</b> 1	<b>Caso 14</b> 1	<b>Caso 15</b> 1
<b>Próstata</b>	<b>Caso 16</b> 1	<b>Caso 17</b> 1	<b>Caso 18</b> 1	<b>Caso 20</b> 1	<b>Caso 21</b> 1

Figura 2 – Exemplo de um mapa TMA

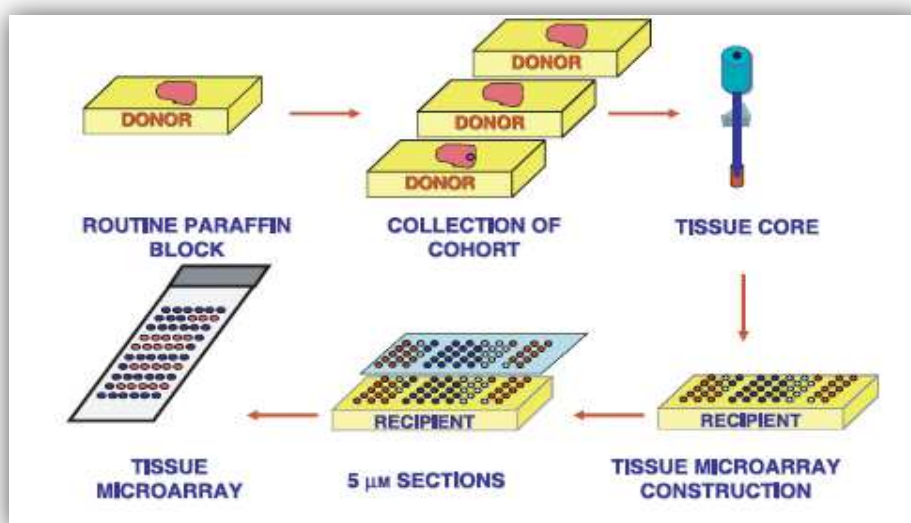


Figura 3 - Construção de TMA (Radhakrishnan *et al.* 2008)

### Técnica de Imuno-histoquímica

De cada bloco de TMA realizaram-se cortes histológicos a 3 µm em lâminas adesivadas, que foram colocados na estufa a 37°C O.N. e submetidos à técnica Imuno-histoquímica.

O anticorpo primário, anti-CD147 (Novocastra®) clone AB1843, foi detectado através do uso da técnica de polímero HRP (*Polymer Detection System - NovoLink™ - Leica Microsystems*), com revelação da reacção com o cromogénio diaminobenzidina (DAB). A diluição efectuada foi 1/30 e o tempo de incubação 1 hora. Anteriormente, procedeu-se à recuperação dos antigénios em banho-maria a 98°C, com tampão citrato pH6, durante 30 minutos. O controlo positivo usado foi pele (Tabela 1).

**Tabela 1.** Anticorpos e condições aplicadas na técnica de Imuno-histoquímica

Anticorpo	Recuperação Atg	Diluição	Tempo	C <sup>+</sup>	Marcação
<b>CD147</b>	Citrato pH6	1/30	60'	Pele	Membrana citoplasmática/citoplasma

### **Critérios de Avaliação**

A marcação imuno-histoquímica do anticorpo primário em estudo foi avaliada segundo os seguintes critérios:

- **Extensão** – Traduz o número de células marcadas: 0% a 9% = 0; 10% a 24% = 1; 25 a 49% = 2; 50% a 74% = 3; 75% a 100% = 4
- **Intensidade** – Indicador semi-quantitativo da quantidade de proteína no tecido: 1 = Marcação fraca; 2 = Marcação moderada; 3 = Marcação Forte.
- **Localização** – Exprime o local da marcação: 1 = Membrana citoplasmática; 2 = Citoplasma; 3 - Núcleo
- **Extensão Tecedular** – Indica se a marcação imuno-histoquímica, no tumor, é homogénea ou heterogénea: 1 = Periférico; 2 = Central: 3 = Homogéneo.
- **Marcação Tecido Conjuntivo** – Revela se existe marcação da proteína no tecido conjuntivo: 1 = Não marca; 2 = Marca fibroblastos; 3 = Marca células inflamatórias.

Foi seleccionado o maior valor em todos os parâmetros acima descritos.

Relativamente ao parâmetro extensão tecedular, no caso dos 2 *cores* terem uma classificação não concordante, optou-se pelo valor que distingue a natureza do tumor.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram organizados e analisados no programa IBM SPSS *Statistics* 19. A relação entre os padrões de expressão dos marcadores foi avaliada através de tabelas de contingência e aplicação do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p$  é inferior 0.05 ( $p < 0.05$ ).

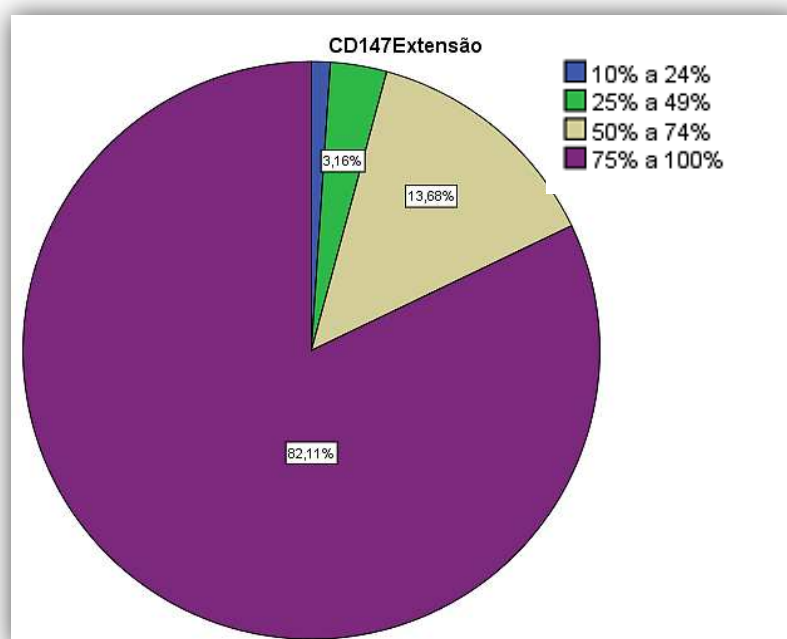
## RESULTADOS

Da totalidade dos casos analisados, 12,1% (12/99) eram carcinomas *in situ* e 87,9 (87/99) eram carcinomas invasivos (tabela 2).

**Tabela 2** – Frequência Tipo Histológico

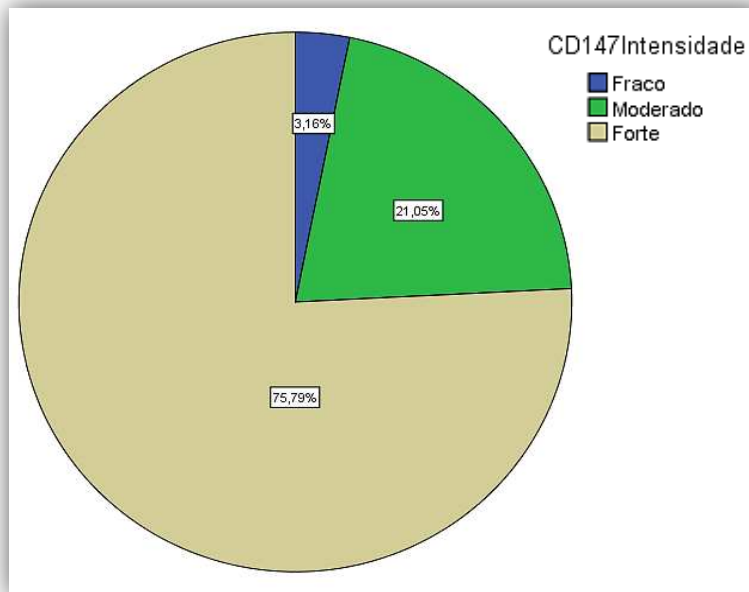
Tipo Histológico	Frequência	Porcentagem
Carcinoma <i>in situ</i>	12	12,1
Carcinoma Invasivo	87	87,9
Total	99	100,0

Verificou-se que 82,11% dos carcinomas de ambos os tipos histológicos apresentaram extensão 4 (75% a 100%).



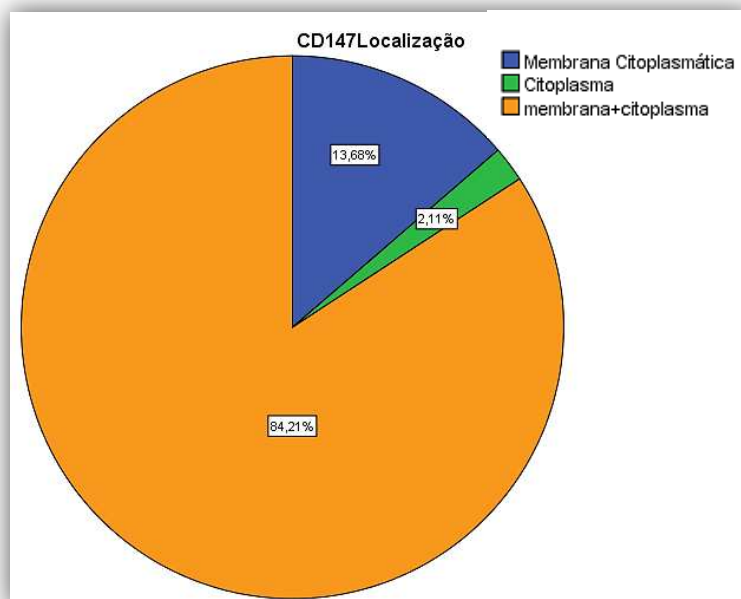
**Gráfico 1** – Frequência da extensão na totalidade dos casos

A maioria dos carcinomas (75,79%) de ambos os tipos histológicos marcou com intensidade forte a proteína CD147.



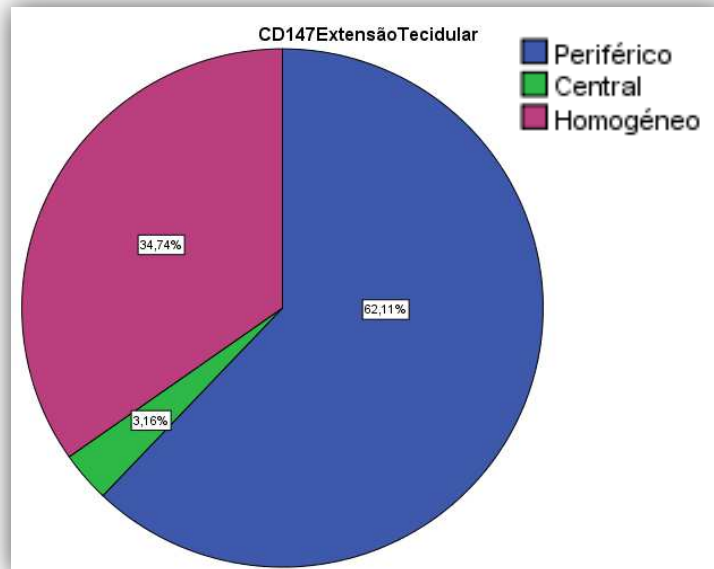
**Gráfico 2** - Frequência da intensidade na totalidade dos casos

No gráfico 3 podemos observar que a marcação predominante foi membrana citoplasmática e citoplasma, estando marcadas em 84,21% dos casos, tanto carcinomas *in situ* com invasivos



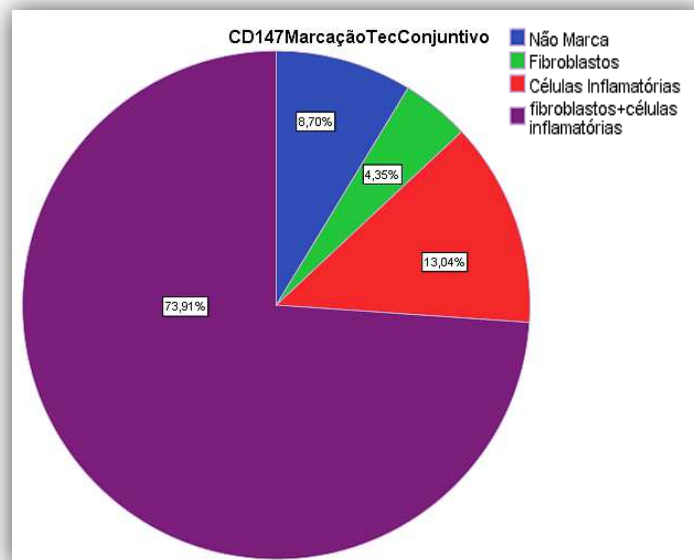
**Gráfico 3** - Frequência da localização na totalidade dos casos

Relativamente à extensão tecidular da CD147, 62.11% dos carcinomas (*in situ* e invasivos) demonstraram uma tendência periférica, ou seja, a marcação positiva encontrava-se nas células tumorais mais profundas ou basais. (Gráfico 4)



**Gráfico 4** - Frequência da Extensão tecidular na totalidade dos casos

A marcação positiva da CD147 em tecido conjuntivo encontrou-se em 73.91% dos carcinomas, de ambos os tipos histológicos. (Gráfico 5)

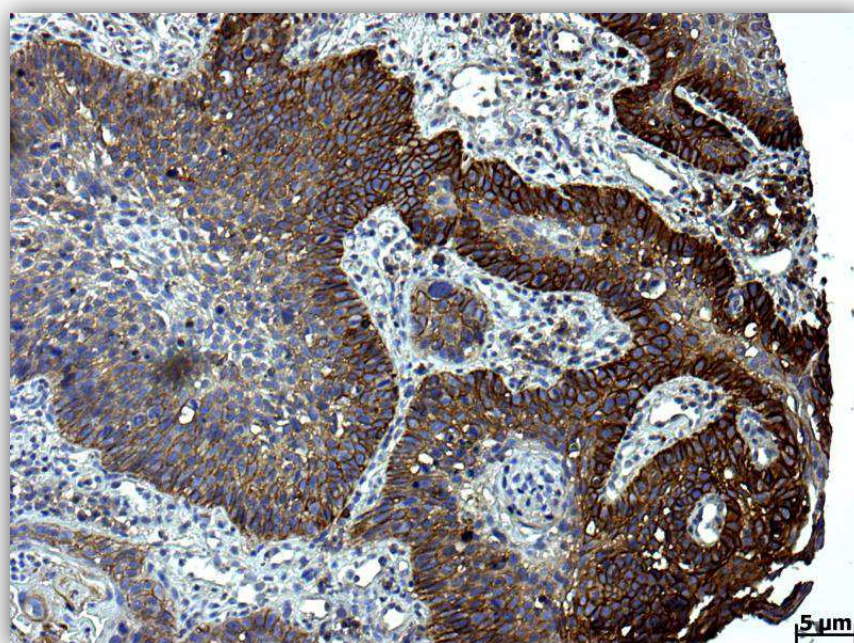


**Gráfico 5** - Frequência da marcação positiva do tecido conjuntivo na totalidade dos casos

**Tabela 3** – Avaliação da extensão em cada tipo histológico

		CD147 Extensão				Total
		10% a 24%	25% a 49%	50% a 74%	75% a 100%	
p = 0.607						
Tipo Histológico	Carcinoma <i>In Situ</i>	0 (0%)	1 (9.09%)	2 (18.18%)	8 (72.7%)	11 (100%)
	Carcinoma Invasivo	1 (1.19%)	2 (2.38%)	11 (13.09%)	70 (83%)	84 (100%)

Em 72.7% (8/11) dos carcinomas *in situ*, mais de 75% das células marcaram positivamente para o CD147. Relativamente aos carcinomas invasivos, 83% (70/84) mostraram marcação positiva em mais de 75% das células tumorais, embora esta correlação não seja estatisticamente significativa ( $p=0.607$ ).



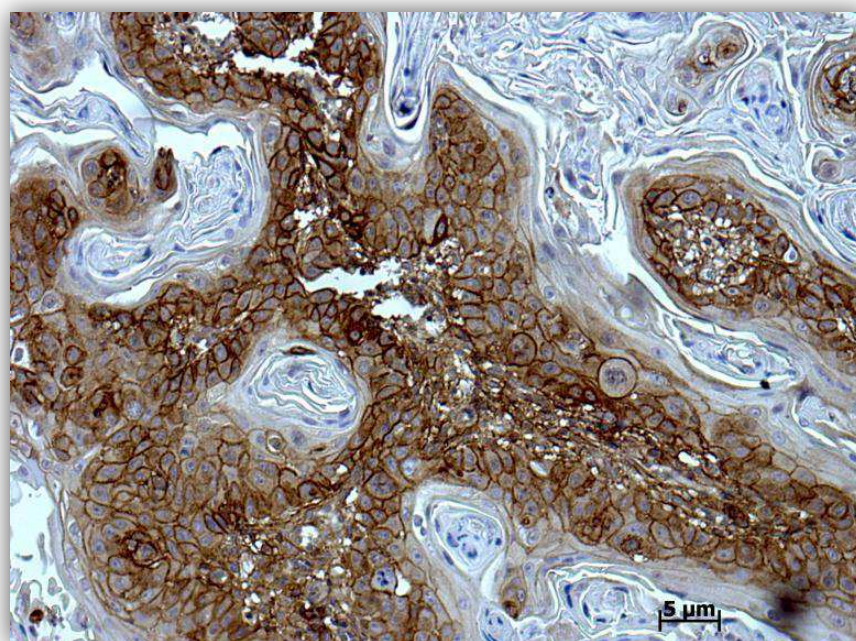
**Figura 4** – Carcinoma *in situ* marcação positiva CD147



**Tabela 4** – Comparação da intensidade da marcação com cada tipo histológico

		CD147 Intensidade			Total
		Fraco	Moderado	Forte	
p= 0.395					
<b>Tipo Histológico</b>	Carcinoma <i>In Situ</i>	1 (9.09%)	3 (27.27%)	7 (63.63%)	11 (100%)
	Carcinoma Invasivo	2 (2.38%)	17 (20.23%)	65 (77%)	84 (100%)

Relativamente à intensidade da marcação, verificou-se que marcaram forte (50% a 74%) 63.63% (7/11) dos carcinomas *in situ* e 77% (65/84) dos carcinomas invasivos. No entanto, esta correlação não foi estatisticamente significativa ( $p= 0.395$ ).

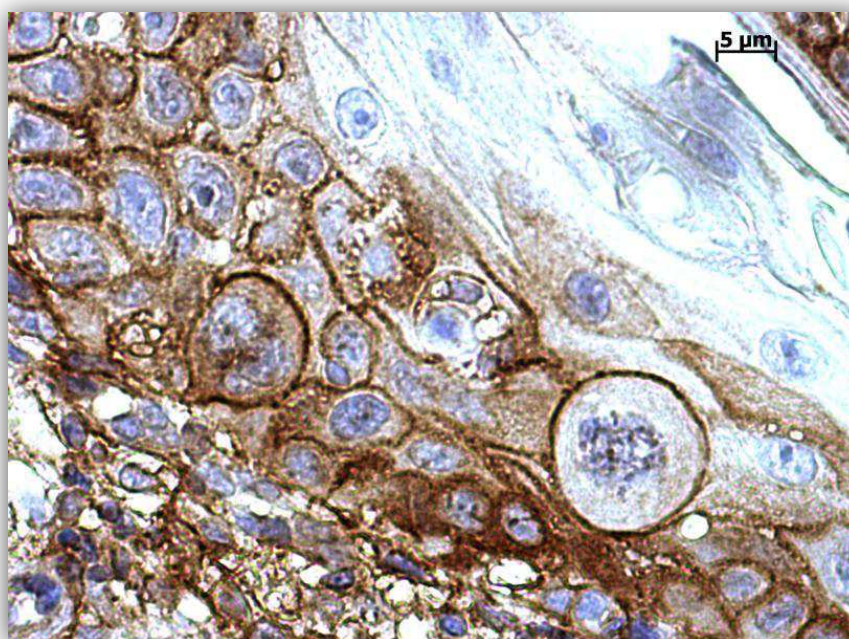


**Figura 5** – Marcação positivada CD147 em carcinoma invasivo

**Tabela 5** – Localização da marcação positiva da CD147

p= 0.344		CD147 Localização			Total
		Membrana Citoplasmática	Citoplasma	Membrana+ citoplasma	
Tipo Histológico	Carcinoma <i>in situ</i>	3 (27.3%)	0 (0%)	8 (72.7%)	11 (100%)
	Carcinoma Invasivo	10 (11.9%)	2 (2.4%)	72 (85.7%)	84 (100%)

Normalmente, a CD147 encontra-se na membrana citoplasmática, daí 72.7% (8/11) dos carcinomas *in situ* e 85.7% (72/84) dos carcinomas invasivos apresentarem marcação positiva na membrana citoplasmática e no citoplasma, o que pode ter algum significado biológico. Este resultado não foi estatisticamente significativo ( $p= 0,344$ ).



**Figura 6** – Marcação CD147 membranar em carcinoma invasivo

**Tabela 6** – Na tabela seguinte verifica-se se o tumor é homogéneo ou heterogéneo relativamente à sua extensão tecidular

		CD147 Extensão Tecidular			Total
		Periférico	Central	Homogéneo	
<b>p = 0.816</b>					
<b>Tipo Histológico</b>	Carcinoma <i>in situ</i>	7 (63.63%)	0 (0%)	4 (36.36%)	11 (100%)
	Carcinoma Invasivo	52 (61.90%)	3 (3.57%)	29 (34.52%)	84 (100%)

A maioria dos casos, 63.63% (7/11) *in situ* e 61.90% (52/84) carcinomas invasivos, foram periféricos, ou seja, havia positividade de marcação à periferia do tumor. Estes dados podem revelar importância biológica uma vez que este marcador está relacionado com a invasão e produção de metástases. No entanto não apresentam significado estatístico ( $p = 0.816$ ).

**Tabela 7** – Correlação entre o tipo histológico e a marcação de tecido conjuntivo

Tipo Histológico CD147 Marcação Tecido Conjuntivo						
		CD147 Marcação Tecido Conjuntivo				Total
		Não Marca	Fibroblastos	Células Inflamatórias	Fibroblastos células inflamatórias	
<b>p = 0.575</b>						
<b>Carcinoma <i>in situ</i></b>	<i>Count</i>	2	0	1	8	11
	<i>% within TipoHistologico</i>	18,2%	0%	9,1%	72,7%	100,0%
<b>Carcinoma Invasivo</b>	<i>Count</i>	6	4	11	60	81
	<i>% within TipoHistologico</i>	7,4%	4,9%	13,6%	74,1%	100,0%

A maioria dos casos, em ambos os tipos histológicos, apresentou marcação positiva em fibroblastos e células do tipo inflamatório. Com uma expressão de 72.7% (8/11) nos carcinoma *in situ* e 74.1% (60/81) nos invasivos.

**Tabela 8** – Relação entre a localização da marcação positiva com a extensão tecidual dos carcinomas invasivos

<b>CD147 Localização * CD147 Extensão Tecidual</b>						
			<b>CD147 Extensão Tecidual</b>			<b>Total</b>
			<b>P</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	
		<i>Count</i>	10	0	0	10
		<i>% within CD147Localização</i>	100,0%	0%	0%	100,0%
<b>CD147 Localização</b>	<b>Membrana Citoplasmática</b>	<i>Count</i>	1	0	1	2
		<i>% within CD147Localização</i>	50,0%	,0%	50,0%	100,0%
	<b>Citoplasma</b>	<i>Count</i>	41	3	28	72
		<i>% within CD147Localização</i>	56,9%	4,2%	38,9%	100,0%
	<b>Membrana+ Citoplasma</b>	<i>Count</i>	52	3	29	84
		<i>% within CD147Localização</i>	61,9%	3,6%	34,5%	100,0%
<b>Total</b>		<i>Count</i>	52	3	29	84
<b>Total</b>		<i>% within CD147Localização</i>	61,9%	3,6%	34,5%	100,0%

p = 0.127

- P** – Periférico
- C** – Central
- H** – Homogéneo

A correlação da localização com a extensão tecidual mostrou que nos carcinomas invasivos onde a localização da marcação apenas ocorreu na membrana citoplasmática, em 10 casos, sendo todos esses casos de tendência periférica. Marcação unicamente citoplasmática verificou-se em dois casos, sendo um periférico e outro homogéneo.

Como já se tinha verificado acima a marcação mais prevalente foi membrana citoplasmática e citoplasma. 56.9% (41/72) eram tumores periféricos, 38.9% (28/72) eram homogéneos.

De extensão tecidual central apenas se encontrou 4,2% (3/72), todos com a localização na membrana citoplasmática e no citoplasma.

**Tabela 9** – Relação entre a localização da marcação positiva com a extensão tecidual dos carcinomas *in situ*

<b>CD147Localização * CD147ExtensãoTecidual</b>					
		<b>p = 0.125</b>	<b>CD147 Extensão Tecidual</b>		<b>Total</b>
			Periférico	Homogéneo	
<b>CD147 Localização</b>	<b>Membrana Citoplasmática</b>	<i>Count</i>	3	0	3
		<i>% within CD147Localização</i>	100,0%	0%	100,0%
	<b>Membrana+ citoplasma</b>	<i>Count</i>	4	4	8
		<i>% within CD147Localização</i>	50,0%	50,0%	100,0%
<b>Total</b>		<i>Count</i>	7	4	11
		<i>% within CD147Localização</i>	63,6%	36,4%	100,0%

Nos carcinomas *in situ* o que se verificou relativamente à correlação entre localização e extensão tecidual foi que 3 casos marcaram apenas na membrana citoplasmática, sendo todos eles periféricos.

8 casos tiveram uma marcação membranar e citoplasmática, sendo 4 periféricos e 4 homogéneos.

Nos carcinomas *in situ* não se verificou nenhum caso com localização central.

## DISCUSSÃO

A CD147 expressa pelas células do tumor pode ser um importante regulador das MMPs. Tem sido implicada na indução da expressão de MMP por estroma fibroblastos (Guo *et al.*, 1996). Tem sido sugerido que a CD147/EMMPRIN pode ter uma função natural do desenvolvimento embrionário ou na cura de lesões, fazendo com que os fibroblastos dérmicos aumentem a produção de MMP, facilitando assim a remodelação tecidual. A expressão da CD147 pelas células de carcinomas orais induzem os fibroblastos a produzir MMPs para remodelar o MEC, facilitando assim a invasão das células tumorais. De facto, isto sugere que a expressão de CD147 correlaciona-se com o comportamento invasivo resultante de uma interacção entre as células tumorais e as células do estroma. O processo de invasão do tumor e a produção de metástase é muito complexo, envolvendo não só a expressão de MMP mas também a activação de integrinas e outros receptores de adesão e deposição de transição moléculas da matriz. Mas a expressão da CD147 em associação com esses outros factores parece facilitar o comportamento invasivo e metastático do CEO.

Futuramente, poder-se-á fazer uma abordagem imuno-histoquímica para relacionar a expressão da CD147 com MMP 2 e MMP 9, uma vez que há uma correlação positiva noutros tipos de tumores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg. 2011 Jan 24. [Epub ahead of print] PMID: 21269808 [PubMed - as supplied by publisher]
- 2 - Flavio Monteiro Amado; Avaliação imunohistoquímica da expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 e CD31 em carcinomas espinocelulares de soalho bucal. 2007.
- 3 - Ling-Chang Shen, Yuk-Kwan Chen, Shue-Sang Hsue, Shyh-yu Shaw; Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. J Oral Pathol Med 2010;39: 242 – 249.
- 4 - T. Muramatsu and T. Miyauchi, Basigin CD147: a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion, *Histol. Histopathol* 2003;18:981–987
- 5 - Huang Z, Huang H, Li H, Chen W, Pan C. EMMPRIN expression in tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2009;38(6):518-23
- 6 - Dominic F, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, Gerhard S, Rasse M and Laimer K. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Modern Pathology* 2008;21:186–191
- 7 - Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray – a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. J Oral Pathol Med 2008;37:166–176

## **ANEXOS**



## Anexo 1

### Protocolo Imuno-histoquímica

#### Protocolo Imuno-histoquímica

(Adaptado de *Polymer Detection System - NovoLink™* da Leica Microsystems)

1. Desparafinar/hidratar as lâminas.
2. Recuperação antigénica – 30 min.
3. Lavagem PBS [*Phosphate Buffer Saline*] - 2x2min
4. Bloqueio Peroxidase endógena – 5 min.
5. Lavagem PBS 2x2min
6. *Protein Block* (soro normal) - 5 min.
7. Lavagem PBS 2x2min
8. Incubação AC 1º (tempo variável)
9. Lavagem PBS 2x2min
10. Bloqueio Pós-Primário – 30 min.
11. Lavagem PBS 2x2min
12. Polímero – 30 min.
13. Lavagem PBS 3x2min
14. Revelação com DAB (1ml de substrato + 50 µl de DAB)
15. Lavar em água destilada
16. Contrastar com Hematoxilina de *Mayer* – 3 min.
17. Lavar em água corrente quente.
18. Desidratar e montar em Entellan®.

## Anexo 2

### Kit de Detecção Imuno-histoquímico

# NovoLink™ Polymer Detection System (250/500/1250 tests)



#### System contents (RE7140-K, RE7150-K RE7260-K):

- Peroxidase Block
- Protein Block
- Post Primary Block
- NovoLink™ Polymer
- DAB Chromogen
- NovoLink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)
- Hematoxylin



#### Key advantages

- New to market - Novocastra's first non-biotin polymer detection system
- CE-Marked product (IVD)
- Polymer technology offers greatest sensitivity above all other detection systems
- Detection system of choice
- Ready to use reagents for a simple and stream-lined protocol
- Universal detection - detects both mouse and rabbit antibodies
- Easy to use colour coded dropper bottles and lids – avoids risk of cross-contamination
- Improved penetration into the tissue
- Also available without accessories (DAB, Hematoxylin, Blocking reagents)

## Anexo 3

### Bula anticorpo primário anti-CD147



# Data Sheet CD147

mouse monoclonal antibody

**NCL-CD147**

<b>Intended Use</b>	<b>FOR RESEARCH USE ONLY.</b>
<b>Specificity</b>	Human CD147 antigen. Also known as M6, EMMPRIN, neurothelin or bagsign.
<b>Clone</b>	AB1843
<b>Ig Class</b>	IgG1
<b>Antigen used for immunisations</b>	Prokaryotic recombinant fusion protein corresponding to a 147 amino acid region of the extracellular domain of the human CD147 molecule.
<b>Hybridoma partner</b>	Mouse myeloma (p3-NS1-Ag4-1).
<b>Preparation</b>	Lyophilised tissue culture supernatant containing 15mM sodium azide. Reconstitute with 1ml or 0.1ml of sterile distilled water as indicated on vial label.
<b>Effective on frozen tissue</b>	No
<b>Effective on paraffin wax embedded tissue</b>	Yes (using the high temperature antigen unmasking technique: see overleaf).
<b>Recommendations on use</b>	Immunohistochemistry: Typical working dilution 1:20 - 1:40. High temperature antigen unmasking technique. 60 minutes primary antibody incubation at 25°C. Standard ABC technique.  Western Blotting: Typical working dilution 1:100 (ECL™, Amersham Pharmacia Biotech).
<b>Positive Controls</b>	<b>Immunohistochemistry</b> - Skin. <b>Western Blotting</b> - SAOS-2 cell line.
<b>Staining pattern</b>	Membrane and cytoplasmic.
<b>Storage and stability</b>	Store unopened lyophilised antibody at 4°C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 4°C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the antibody are frozen at -20°C (frost-free freezers are <b>not</b> recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use.

#### General Overview

CD147 is a cell surface glycoprotein of the Ig superfamily. CD147 is thought to bind an unknown ligand on fibroblasts, which stimulates production of collagenase and other extracellular matrix metalloproteinases. CD147 is broadly expressed on the peripheral blood cells, endothelial cells and cultured cells of the hemopoietic and non-hemopoietic origin. In T cells, its expression level is dependent on the differentiation state.

#### General References

- Zucker S, Hymowitz M, Rollo E E, *et al.*. American Journal of Pathology. 158 (6): 1921-1928 (2001).  
Staffler G and Stockinger H. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. 14: 327-330 (2000).  
Caudroy S, Polette M, Tournier J M, *et al.*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 47 (12): 1575-1580 (1999).  
Kasinrerk W, Tokrasinwit N and Phunpae P. Immunology. 96: 184-192 (1999).  
Koch C, Staffler G, Hüttinger R, *et al.*. International Immunology. 11 (5): 777-786 (1999).  
van den Oord J J, Paemen L, Opendakker G, *et al.*. American Journal of Pathology. 151 (3): 665-670 (1997).

## Anexo 4

### Kit de TMAs

TMA Builder Instructions  
CAT# TMA-001  
Rev 032604  
Page 1 of 6

**Thermo**  
SCIENTIFIC

## TMA Builder

### Device for Producing Tissue Micro Arrays

Like the DNA chip, which scans the genome for alterations or abnormal gene expression, the Tissue Micro Array (TMA) permits parallel processing of biological samples. The TMA method makes it possible for researchers to simultaneously compare a variety of molecular and protein parameters (DNA, RNA, using molecular biology techniques, and proteins by immunohistochemistry/immunocytochemistry) in tissues from dozens of individual specimens in a single TMA.

Samples from different tissues are embedded and arrayed in paraffin to create a TMA. The TMA Builder allows for up to 24 different tissue samples to be present in a single tissue block. The TMA block is sectioned to obtain thin sections with each of the different tumors then being represented as dots on microscope slides. Because each TMA block can be sliced into hundreds of consecutive sections of 3-4 microns each, it is possible to analyze rapidly hundreds of parameters in the same set of specimens. Analysis of many tumor markers can now be completed in a few weeks; Compared to traditional methods, analyzing one specimen at a time, might require several months.

The TMA technology can be used to identify diagnostic markers, parameters to predict aggressiveness of cancer, and other biological characteristics of tumor cells. The TMA is very useful in retrospective studies of thousands of tissue samples stored in histopathology laboratories for thousands of molecular markers.



Thermo Fisher Scientific  
Anatomical Pathology  
46360 Fremont Blvd.  
Fremont, CA 94538, USA  
Tel: 1-510-771-1360  
Fax: 1-510-771-1570  
<http://www.thermo.com/labvision>

   
Manufactured by  
Lab Vision Corporation

Thermo Fisher Scientific  
Anatomical Pathology  
5200 Rock Road, Autmoor  
Barnstaple, Devon WA7 1PS, UK  
Tel: 44-1928-562600  
Fax: 44-1928-562627  
[Labvision.uk@thermofisher.com](mailto:Labvision.uk@thermofisher.com)