

Έκφραση της μορφογενετικής πρωτεΐνης οστού 2 (BMP-2) σε καλοήθεις όγκους σιελογόνων αδένων

Παναγιώτης ΧΡΥΣΟΛΟΥΡΗΣ¹, Κωνσταντίνος ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗΣ², Αλεξάνδρα ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΥ³,
Σοφία ΤΣΕΛΕΝΗ-ΜΠΑΛΑΦΟΥΤΑ⁴

Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών
(Διευθυντής: Καθηγητής Ε. Πατσούρης)

Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) expression in benign salivary gland tumours

Panagiotis CHRYSSOLOUDRIS, Constantinos ALEXANDRIDIS, Alexandra SKLAVOUNOU,
Sofia TSELENI-BALAFOUTA

A' Pathologic Anatomy Laboratory, Athens Medical School
(Head: Professor E. Patsouris)

Κλινική μελέτη
Clinical study

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες οστού (BMPs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης, με συμμετοχή στην νεο-αγγειογένεση, τη μεταστατική συμπεριφορά των όγκων και τη ρύθμιση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της έκφρασης της BMP-2 σε καλοήθεις όγκους σιελογόνων αδένων.

Υλικό: Μελετήθηκαν 97 δείγματα καλοήθων όγκων παρωτίδας (46 κυσταδενολεμφώματα Warthin και 51 πλειόμορφα αδενώματα), που εξαιρέθηκαν σε διάστημα 10 ετών (2000-2010) στο ΓΝΑ «Ιπποκράτειο» από ασθενείς ηλικίας 21-80 ετών.

Μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση με ειδικό αντίσωμα για την ανίχνευση της BMP-2 με την ενζυμική μέθοδο αβιδίνης - βιοτίνης - υπεροξειδάσης.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε ενδοκυττάρια έκφραση της BMP-2 σε καλοήθεις όγκους σιελογόνων αδένων και μάλιστα ο βαθμός έκφρασής της στους όγκους Warthin ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι στα πλειόμορφα αδενώματα.

Συμπεράσματα: Η έκφραση της BMP-2 φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη και τον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς καλοήθων όγκων των σιελογόνων αδένων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μορφογενετικός παράγοντας οστού, αλληλεπιδράσεις επιθηλίου μεσεγχύματος, καλοήθεις όγκοι σιελογόνων αδένων.

SUMMARY: Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a significant role in the process of carcinogenesis, participating in neoangiogenesis, tumour metastatic behaviour and cancer stem cell regulation. However, their expression and role in the development of benign salivary gland tumours has so far been under-researched.

Aim: The aim of this study is to examine BMP-2 expression in benign salivary gland tumours.

Material: The material of this study included 97 specimens of benign parotid tumours (46 Warthin cystadenolymphomas and 51 pleomorphic adenomas) collected between 2000 and 2010 at the "Ippokrateion" General Hospital of Athens, from patients between 21 and 80 years old.

Method: BMP-2 expression was determined by immunohistochemical staining with a specific antibody, using the avidin-biotin-peroxidase enzymic method.

Results: Intra-cellular BMP-2 expression was observed in benign salivary gland tumours; it was significantly stronger in Warthin tumours than it was in pleomorphic adenomas.

Conclusions: BMP-2 expression appears to be a determining factor in the development and behavioural patterns of both benign and malignant tumours.

KEY WORDS: Bone morphogenetic protein (BMP), epithelial-mucosal transitions, benign salivary gland tumours.

¹ΣΠΠΧ, Επιστημονικός Συνεργάτης Κλινικής ΣΠΠΧ ΕΚΠΑ.

²Καθηγητής και Διευθυντής ΣΠΠΧ ΕΚΠΑ.

³Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Στοματολογίας ΕΚΠΑ.

⁴Καθηγήτρια του Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Αθηνών ΕΚΠΑ.

Παρελήφθη: 21/12/2012 - Έγινε δεκτή: 02/04/2013

Paper received: 21/12/2012 - Accepted: 02/04/2013

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Μορφογενετικές Πρωτεΐνες Οστού (BMPs, Bone Morphogenetic Proteins) είναι μέλη της οικογένειας του Αυξητικού Παράγοντα Μεταμόρφωσης βήτα (TGF-β, Transforming Growth Factor beta) και ανακαλύφθηκαν το 1965 από τον Marshall Urist (Urist, 1965). Οι BMPs υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα διαφόρων τύπων κυττάρων (όπως οστεοβλαστών, χονδροβλαστών, νευρικών και επιθηλιακών κυττάρων) ως διμερή προ-πρωτεΐνων που τέμνονται από πρωτεάσες πριν ενεργοποιηθούν. Μετά την έκκρισή τους από το κυτταρόπλασμα στον εξωκυττάριο χώρο υφίστανται άλλο ένα στάδιο επεξεργασίας από ρυθμιστικά μόρια (Noggin και Chordin) για να συνδεθούν στους ειδικούς υποδοχείς κινάσης σερίνης-θρεονίνης τύπου 1 και 2 των κυττάρων στόχων τους (Holley και συν. 1996, Piccolo και συν. 1996, Yamashita και συν. 1995) και να επιτελέσουν τη βιολογική τους δράση μέσω των ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μηχανισμών, κυρίως MAPK και SMAD, και σπανιότερα Notch και WNT (Zhang και Li, 2005, Herpin και Cunningham 2007, Marquis και συν. 2009).

Οι BMPs παρουσιάζουν τόσες πολλές διαφορετικές δράσεις, που έχει προταθεί ότι η ομάδα αυτή των αυξητικών παραγόντων θα έπρεπε να μετονομαστεί σε μορφογενετικές πρωτεΐνες σώματος (Body Morphogenetic Proteins) (Reddi, 2005). Πέρα από το γνωστό ρόλο τους στην μορφογένεση των οστών και των χόνδρων, τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί και ο ρόλος τους σε μεταβολικά νοσήματα, όπως στην παχυσαρκία και τον διαβήτη, σε αγγειακά νοσήματα όπως ασβέστωση των αγγείων, πνευμονική υπέρταση και οικογενή αιμορραγική τελαγγειεκτασία, αλλά και στην καρκινογένεση, με συμμετοχή σε διαδικασίες όπως η νεοαγγειογένεση, ο καθορισμός της μεταστατικής συμπεριφοράς και η ρύθμιση των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων (Meejung και Senyon, 2011). Γενικά, οι BMPs φαίνεται να ενέχονται στην παθοφυσιολογία αρκετών νόσων, όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση, νεφρικές νόσοι, η πνευμονική υπέρταση, η αρθρίτιδα και τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (Yanagita, 2005, Wordinger και Clark, 2007).

Η συσχέτιση της BMP-2 με την καρκινογένεση άρχισε να αναγνωρίζεται το 1992 όταν διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον καρκίνο του προστάτη, τις οστικές του μεταστάσεις και το βαθμό έκφρασης (δηλαδή παραγωγής και έκκρισης στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία) της BMP-2 (Bentley και συν. 1992). Η BMP-2 εκφράζεται επίσης σε καρκίνο του μαστού (Bobinac και συν. 2005) αλλά και σε μια σειρά από όγκους όπως γλοιόμα, καρκίνος ωοθηκών, αδενοκαρκίνωμα σιελογόνων αδένων, μεσοθηλίωμα, ορώδες και βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα, ινοσάρκωμα και παγκρεατικό καρκίνωμα και μάλιστα ως ευαίσθητος δείκτης. Επίσης, φαί-

INTRODUCTION

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the family of Transforming Growth Factor beta (TGF- β) and were discovered in 1965 by Marshall Urist (Urist, 1965). BMPs can be found in the cytoplasm of various cell types (such as in osteoblasts, chondroblasts, neural and epithelial cells) in the form of pre-protein dimmers cleaved by proteases before being activated. After their secretion from the cytoplasm in the extracellular space, they go through one more processing stage by regulatory molecules (Noggin and Chordin) in order to get attached to the special type 1 and 2 serine/threonine kinase receptors of their target cells (Holley et al. 1996, Piccolo et al. 1996, Yamashita et al. 1995) and engage in their biological activity via intra-cellular signalling mechanisms, mainly MAPK and SMAD, and less often Notch and WNT (Zhang and Li, 2005, Herpin and Cunningham 2007, Marquis et al. 2009).

BMPs are engaged in so many activities that it has been proposed to rename them as Body Morphogenetic Proteins (Reddi, 2005). Besides their well-known role in bone and cartilage morphogenesis, it was recently discovered that they also play a role in metabolic diseases, such as obesity and diabetes, vascular diseases, such as vascular calcification, lung hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia, as well as in carcinogenesis, participating in various processes such as neoangiogenesis, tumour metastatic behaviour and cancer stem cell regulation (Meejung and Senyon, 2011). Generally, BMPs appear to be involved in the pathophysiology of several diseases, including cancer, osteoporosis, kidney diseases, lung hypertension, arthritis, and cerebrovascular episodes (Yanagita, 2005, Wordinger and Clark, 2007).

BMP-2 began to be associated with carcinogenesis in 1992, when a correlation was found between prostate cancer, its bone metastases and the level of BMP-2 expression (i.e. its production and secretion in the extra-cellular matrix) (Bentley et al, 1992). BMP-2 is also expressed in breast cancer (Bobinac et al, 2005), as well as in a number of tumours, including glioma, ovary cancer, salivary gland adenocarcinoma, mesothelioma, serous and mucinous adenocarcinoma, fibrosarcoma, pancreatic carcinoma, and in fact as a sensitive index. Moreover, it appears that BMP-2 expression increases significantly in both small-cell and non-small-cell lung cancer (17 and 215.6 times higher than in healthy tissues, respectively) (Singh and Morris, 2010). Within the context of carcinogenesis, BMP-2 appears to play a role in both neoangiogenesis and the process of metastasis formation. BMP-2 appears to have angiogenic properties in melanomas (Rothhammer et al, 2007, Singh and Morris, 2010), vascular endothelial stem cells (Smadja et al, 2008) and lung tumours, in which it is associated with the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Langenfeld et al, 2004, Bieniasz

νεται η έκφρασή της να αυξάνεται σημαντικά τόσο στο μικροκυτταρικό όσο και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνευμόνων (17 και 25,6 φορές περισσότερο από ότι σε υγιείς ιστούς αντίστοιχα) (Singh και Morris, 2010).

Ο ρόλος της BMP-2 στην καρκινογένεση φαίνεται να αφορά τόσο στη νεοαγγειογέννεση όσο και στη διαδικασία της δημιουργίας μεταστάσεων. Η BMP-2 φαίνεται να έχει αγγειογεννητικές ιδιότητες σε μελανώματα (Rothhammer και συν. 2007, Singh και Morris, 2010), σε αρχέγονα κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων (Smadja και συν. 2008) και όγκους πνευμόνων όπου σχετίζεται με τον Αγγειακό Ενδοθηλιακό Αυξητικό Παράγοντα (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) (Langenfeld και συν. 2004, Bieniasz και συν. 2009). Όσον αφορά στη ανάπτυξη μεταστάσεων, η BMP-2 φαίνεται να αυξάνει την κινητικότητα και την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών προστάτη (Feeley και συν. 2006), ενώ η λειτουργική υπερέκφρασή της σε καρκινικά κύτταρα όγκων μαστού προάγει την διεισδυτικότητα και την αύξηση του μεγέθους του όγκου (Clement και συν. 2005). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται με αύξηση της κινητικότητας και της διεισδυτικότητας των κυττάρων από καρκίνο στομάχου (Kang και συν. 2010).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης μας είναι η διερεύνηση της έκφρασης της μορφογενετικής πρωτεΐνης οστού BMP-2 σε καλοίθεις όγκους της παρωτίδας και πιο συγκεκριμένα όγκους Warthin και πλειόμορφα αδενώματα.

ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της έρευνας αφορούσε συνολικά 97 όγκους παρωτίδος εξαιρεθέντες σε διάστημα 10 ετών, τη χρονική περίοδο 2000–2010, στο Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο» από την Ωτορινο-λαρυγγολογική κλινική, 46 εκ των οποίων αναγνωρίστηκαν στο παθολογοανατομικό εργαστήριο ως όγκοι Warthin και 51 ως πλειόμορφα αδενώματα. Από τις 46 περιπτώσεις όγκου Warthin, οι 38 ήταν σε άνδρες (82,6%) και οι 8 σε γυναίκες (17,4%). Από τις 51 περιπτώσεις πλειόμορφου αδενώματος, οι 18 ήταν σε άνδρες (35,3%) και οι 33 ήταν σε γυναίκες (64,7%) (Πίνακας 1). Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 21 έως και 80 έτη με μέσο όρο τα 52,43 έτη (57,7 για τους όγκους Warthin και 47,6 για τα πλειόμορφα αδενώματα) (Πίνακας 1).

ΜΕΘΟΔΟΣ

Από το αρχείο ανευρέθηκαν οι αντίστοιχοι κύβοι παραφίνης. Από κάθε μονιμοποιημένο και εγκλεισμένο σε κύβο παραφίνης κλινικό δείγμα έγινε λήψη τομών πάχους 4μμ με τη βοήθεια υπερμικροτόμου και τοπο-

et al, 2009). In terms of metastasis formation, BMP-2 appears to increase the motility and invasiveness of prostate cancer cell series (Feeley et al, 2006), while its functional over-expression in breast tumour cancer cells promotes the tumour's invasiveness and growth rate (Clement et al, 2005). A similar behaviour is observed in stomach cancer cells, with an increase in their motility and invasiveness (Kang et al, 2010).

AIM

The aim of this study is to examine BMP-2 expression in benign salivary gland tumours, and more precisely in Warthin tumours and pleomorphic adenomas.

MATERIAL

The material of this study included a total of 97 specimens of benign parotid tumours, which had been surgically removed at the Otorhinolaryngology Clinic of the "Ippokrateion" General Hospital of Athens over a period of ten years (2000-2010). Of them, 46 had been identified at Histopathology department as Warthin tumours, while the remainder 51 as pleomorphic adenomas. Of the 46 cases of Warthin tumour, 38 involved men (82.6%) and 8 women (17.4%). Of the 51 cases of pleomorphic adenomas, 18 involved men (35.3%) and 33 women (64.7%) (Table 1). The age of patients ranged between 21 and 80 years, with a mean age of 52.43 years (57.7 for the Warthin tumours and 47.6 for the pleomorphic adenomas) (Table 1).

METHODS

The relevant paraffin blocks were retrieved. From each fixed and paraffin-embedded clinical specimen, 4μm-

Πίνακας 1

Περιγραφικά στατιστικά δείγματος

	Όγκος Warthin	Πλειόμορφο αδένωμα
Ηλικία	57,6 έτη (μ.ο.)	47,6 έτη (μ.ο.)
Φύλο	Άνδρες	38 (82,4%)
	Γυναίκες	8 (17,6%)

Εύρος: 21-80 έτη. Συνολικός μ.ο. ηλικίας: 52,43 έτη

Table 1

Descriptive statistics of the sample

	Warthin tumour	Pleomorphic adenoma
Age	57,6 years (av.)	47,6 years (av.)
Sex	Males	38 (82,4%)
	Females	8 (17,6%)

Range: 21-80 years. Overall average age: 52,43 years

θέτηση αυτών σε αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλυμμένες με λυσίνη. Ακολούθησε αποπαραφίνωση, επανυδάτωση, επεξεργασία αποκάλυψης αντιγονικών θέσεων σε διάλυμα κιτρικού οξέως με pH 6 σε φούρνο μικροκυμάτων για 15'. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη πραγματοποιήθηκε με την ενζυμική μέθοδο συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC) (Hsu και Raine, 1981), επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα για ανίχνευση της BMP-2 (baF355BMP2,4, R&D) –μονοκλωνικό αντίσωμα αίγας σε αραίωση 1:150 με θετικούς μάρτυρες δείγματα θηλωδών καρκινωμάτων θυρεοειδούς με επώση σε ψυγείο για 30'. Η έκφραση της BMP-2 αξιολογήθηκε σε κάθε πλακίδιο με μια ημιποστοική κλίμακα βαθμολογίας 0-3. Η κλίμακα έκφρασης καθορίστηκε ως εξής: 0 στα δείγματα που εμφάνιζαν ασθενή χρώση σε <5% των κυττάρων κατά οπικό πεδίο (κ.ο.π.), 1 εάν εμφάνιζαν ασθενή χρώση σε 5 έως 75% των κυττάρων κ.ο.π. ή έντονη χρώση σε 5 έως 30% των κυττάρων, 2 αν 30 έως 75% των κυττάρων κ.ο.π. εμφάνιζαν έντονη χρώση ή >75% των κυττάρων ασθενή χρώση και 3 αν >75% των κυττάρων κ.ο.π. εμφάνιζαν έντονη χρώση (στην ανοσοϊστοχημική χρώση με το ειδικό για την BMP-2 αντίσωμα).

Για τη διερεύνηση συσχέτισης μεταξύ του βαθμού έκφρασης της BMP-2 και του τύπου του όγκου χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Fisher's exact. Σε δεύτερο στάδιο, για να συνεκτιμηθεί τυχόν επίδραση της ηλικίας και του φύλου στην παραπάνω συσχέτιση, χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης για διατάξιμα δεδομένα (ordinal logistic regression) και εκτιμήθηκε ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratio, OR) καθώς και το σχετικό 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI). Διαφορές στην ηλικία μεταξύ των δυο ομάδων ασθενών ελέγχθηκαν με t-test ενώ για το φύλο χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος x². Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας α=5% και ήταν αμφίπλευροι.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την επιδημιολογική ανάλυση παρατηρήσαμε στο υλικό μας στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία και στο φύλο σε σχέση με τον τύπο του όγκου. Έτσι, μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών (68%) και πιο ηλικιωμένοι (μέση ηλικία 57.6 έτη) ήταν οι ασθενείς με όγκο Warthin.

Όσον αφορά τα ευρήματα από την την ανοσοϊστοχημική χρώση, τόσο οι όγκοι Warthin όσο και τα πλειόμορφα αδενώματα εκφράζουν την BMP-2 και μάλιστα ενδοκυττάρια. Όσον αφορά στους όγκους Warthin, παρατηρήσαμε, με βάση την κλίμακα βαθμονόμησης της έκφρασης της BMP-2, ένα δείγμα που κατατάχθηκε στην κατηγορία 0, 4 δείγματα στην κατηγορία 1, 18 στην 2 και 22 στην κατηγορία 3 (σύνολο 45 δείγματα) και όσον αφορά τα πλειόμορφα αδενώματα 26 στην

thick sections were obtained using an ultramicrotome and placed on microscope slides covered with lysine. This step was followed by deparaffinisation, rehydration and antigen retrieval in a pH 6 citric acid solution, placed in a microwave oven for 15'. The immunohistochemical study involved the use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) enzymic method (Hsu and Raine, 1981), incubation in room temperature for 30 minutes and immunohistochemical staining with BMP-2 specific antibodies (baF355BMP2,4, R&D) – monoclonal goat antibody diluted at 1:150, with positive controls thyroid papillary carcinoma specimens incubated for 30' in a fridge. In each slide, BMP-2 expression was evaluated on a semi-quantitative rating scale of 0 to 3. This expression scale involved the following ratings: 0 for specimens whose staining was weak in <5% of the cells per field of view; 1 for those whose staining was weak in 5% to 75% of the cells per field of view, or strong in 5% to 30% of the cells; 2 for those whose staining was strong in 30% to 75% of the cells, or weak in >75% of the cells; and 3 for those whose staining was strong in >75% of the cells (in the immunohistochemical staining with the BMP-2 specific antibody).

In order to investigate the correlation between the level of BMP-2 expression and type of tumour, the Fisher's exact test was used. At a second stage, in order to find out whether the patient's age and sex have any impact on the above correlation, ordinal logistic regression models were used, while the corresponding odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (CI) were also evaluated. Any differences in terms of age between the two groups of patients were examined by t-test, while x² test was used for their sex. These tests were carried out on a α=5% level of significance and were bilateral.

RESULTS

In the epidemiological analysis, it was discovered that there is a statistically significant difference in the patient's age and sex in relation to the tumour's type. Thus, a higher percentage of men (68%) of older ages (mean age of 57.6) were Warthin tumour patients. Regarding the findings of the immunohistochemical staining, both Warthin tumours and pleomorphic adenomas express BMP-2, and in fact intra-cellularly. Among the Warthin tumours, we identified one specimen that was classified as category 0 on our BMP-2 expression rating scale; 4 specimens that were classified as category 1; 18 as category 2; and 22 as category 3 (in a total of 45 specimens). Among the pleomorphic adenomas, we identified 26 specimens that were classified as category 0; 13 as category 1; 9 as category 2; and 2 as category 3 (in a total of 50 specimens) (Table 2). Statistical analysis results: A statistically significant correlation was found between the tumour's type and BMP-

Πίνακας 2

Στατιστική μελέτη σύγκρισης του βαθμού έκφρασης της BMP-2 σε κυσταδενολεμφώματα Warthin και πλειόμορφα αδενώματα

	Warthin	Πλειόμορφο αδένωμα	p-value*	OR (95% CI)**
	N (%)	N (%)		
BMP				
0	1 (2,2)	26 (52,0)	< 0,001	69,3 (18,2 - 264,3)
1	4 (8,9)	13 (26,0)		
2	18 (40,0)	9 (18,0)		
3	22 (48,9)	2 (4,0)		
Σύνολο	45 (100,0)	50 (100,0)		

*Fisher's exact **Warthin vs Pleomorphic, ελέγχοντας για ηλικία και φύλο (ordinal logistic regression)

Table 2

Statistical comparative study of the level of BMP-2 expression in Warthin cystadenomas and pleomorphic adenomas

	Warthin	Πλειόμορφο αδένωμα	p-value*	OR (95% CI)**
	N (%)	N (%)		
BMP				
0	1 (2.2)	26 (52.0)	< 0.001	69.3 (18.2 - 264.3)
1	4 (8.9)	13 (26.0)		
2	18 (40.0)	9 (18.0)		
3	22 (48.9)	2 (4.0)		
Total	45 (100.0)	50 (100.0)		

*Fisher's exact **Warthin vs Pleomorphic, adjusted for age and sex (ordinal logistic regression)

κατηγορία 0, 13 στην 1, 9 στην 2 και 2 στην κατηγορία 3 (σύνολο 50 δείγματα) (Πίνακας 2).

Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του τύπου όγκου με τον βαθμό έκφρασης της BMP-2 καθώς διαπιστώθηκε ότι σε όγκους Warthin, η BMP-2 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε πλειόμορφα αδενώματα. Μετά από διόρθωση (adjustment) για φύλο και ηλικία εκτιμήθηκε ότι σε ασθενείς με όγκο Warthin τα κύτταρα του όγκου είχαν περίπου 69 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα (odds) να εκφράζουν την BMP-2 σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τους ασθενείς με πλειόμορφο αδένωμα (OR 69,3) (Πίνακας 2, Γράφημα 1). Επομένως, ο βαθμός έκφρασης της BMP-2 στους όγκους Warthin φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερος από ότι στα πλειόμορφα αδενώματα (Πίνακας 3).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρατηρήσαμε σημαντική έκφραση της BMP-2 σε αμφότερους τους όγκους με στατιστικά σημαντικά υψηλότερη έκφραση στους όγκους Warthin σε σχέση με πλειόμορφα αδενώματα. Αυτό το εύρημα καλύπτει το βιβλιογραφικό και ερευνητικό κενό προηγουμένων μελετών, όπου έχει παρατηρηθεί υψηλή έκφραση BMP-2 σε πλειόμορφα αδενώματα αλλά όχι και σε άλλους όγκους σιελογόνων αδένων, αν και έχει μελετηθεί σε

2 expression level, as it was discovered that BMP-2 expression is stronger in Warthin tumours than it is in pleomorphic adenomas. After adjustments for age and sex, it was found that in Warthin tumour patients the tumour's cells were 69 times likelier (odds) to express BMP-2 than they were in patients with pleomorphic adenomas (OR 69.3) (Table 2, Graph 1). Thus, the level of BMP-2 expression in Warthin tumours appears to be significantly higher than in pleomorphic adenomas (Table 3).

Πίνακας 3

Βαθμός έκφρασης της BMP-2 σε όγκους Warthin και πλειόμορφα αδενώματα

TumorType	0	1	2	3
Warthin	1	4	18	22
Pleomorphic	21	13	9	2

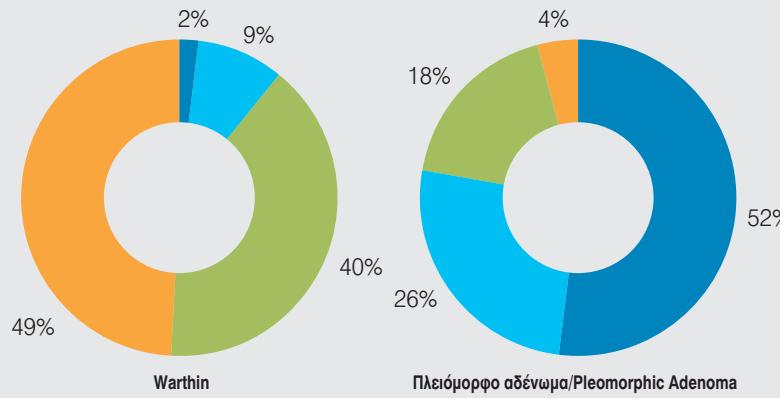
Table 3

BMP-2 expression level in Warthin tumours and pleomorphic adenomas

TumorType	0	1	2	3
Warthin	1	4	18	22
Pleomorphic	21	13	9	2

Γράφημα 1/Graph 1

Κατανομή όγκων παρωτίδος του δείγματος της μελέτης ανάλογα με το βαθμό έκφρασης της BMP-2 από τα κύτταρα των όγκων /Parotid tumour distribution of the study's sample according to the level of BMP-2 expression by tumour cells



σχέση με κακοήθεις όγκους (κυσταδενοκαρκίνωμα, αδενοκαρκίνωμα, μυοεπιθηλιακά καρκινώματα, βασικοκυτταρικά καρκινώματα) (Zhao και συν. 1998) αλλά όχι σε σχέση με άλλους καλοήθεις όγκους όπως ο όγκος Warthin. Έρχεται επίσης σε αντίθεση με την αρχική ερευνητική υπόθεση της μελέτης αυτής, καθώς η υπόθεση μας ήταν ότι τα πλειόμορφα αδενώματα, με τη πιο επιθετική συμπεριφορά τους όπως την επέκτασή τους σε γειτονικούς ιστούς με την προσεκβολή ψευδοποδίων, θα παρουσιάζαν υψηλότερη έκφραση της BMP-2 σε σχέση με τα κυσταδενολεμφώματα. Θα μπορούσε πάντως να θεωρηθεί πως η υψηλότερη έκφραση BMP-2 σε όγκους Warthin σε σχέση με τα, δυνητικά κακοήθη, πλειόμορφα αδενώματα επεκτείνει τα όσα μέχρι τώρα έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία, όπου δεν παρατηρείται σημαντική έκφραση BMP-2 σε κακοήθεις όγκους σιελογόνων αδένων. Επιπλέον, τα πλειόμορφα αδενώματα παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση BMP-2 από φυσιολογικό ιστό σιελογόνων αδένων (Kusafuka και συν. 1998) αλλά και πάλι λείπουν στοιχεία για σύγκριση με όγκους Warthin. Όπως αναφέρθηκε, στα πλειόμορφα αδενώματα έχει διαπιστωθεί η έκφραση BMP-2, σε αντίθεση με άλλους όγκους των σιελογόνων αδένων (Zhao και συν. 1998). Τα πλειόμορφα αδενώματα εκφράζουν BMP-2 σε μεγαλύτερο βαθμό από φυσιολογικό ιστό σιελογόνων αδένων που συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση κολλαγόνου τύπου 2 ή σχηματισμό χόνδρινου ιστού. Ανοσοϊστοχημικά, η BMP-2 ανευρίσκεται κυρίως στα τροποποιημένα μυοεπιθηλιακά κύτταρα γύρω από τις περιοχές με χόνδρινο ιστό και τη βασική μεμβράνη (Kusafuka και συν. 1998). Η έκφρασή της σε πλειόμορφα αδενώματα συμφωνεί με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, στα οποία όμως προστίθεται η ακόμα ισχυρότερη έκφραση της BMP-2 σε όγκους Warthin. Έχει επίσης αναφερθεί και πιοσοτική σχέση ανάμεσα στην έκφραση BMP-2 και το σχηματισμό χόνδρινου ιστού, αν και έχει παρατηρηθεί έκφραση BMP-2 και σε πλειόμορφα αδενώματα όπου δεν διαπιστώνεται παρου-

DISCUSSION

Significant BMP-2 expression was observed in both tumours, with Warthin tumours displaying statistically significantly higher expression than pleomorphic adenomas. This finding fills in a gap in the literature and research of previous studies, in which high BMP-2 expression had been observed in pleomorphic adenomas, but not in any other salivary gland tumours, even though it had been studied in relation to a number of malignant tumours (cystadenocarcinoma, adenocarcinoma, myoepithelial carcinomas, basal cell carcinomas) (Zhao et al. 1998), but not in relation to any other benign tumours, such as the Warthin tumour. This finding also contradicts the initial research hypothesis of our study, i.e. that pleomorphic adenomas, with their more aggressive behaviour (e.g. their tendency to expand into adjacent tissues by means of pseudopods), would display higher BMP-2 expression than cystadenolymphomas. It could however be argued that the higher BMP-2 expression of Warthin tumours compared to – potentially malignant – pleomorphic adenomas is a finding that complements what has previously been reported in the relevant literature, where no significant BMP-2 expression is observed in malignant salivary gland tumours. Moreover, pleomorphic adenomas display higher BMP-2 expression than normal salivary gland tissue (Kusafuka et al, 1998), however there is still a lack of data for comparisons with Warthin tumours. As mentioned above, BMP-2 expression has been observed in pleomorphic adenomas, but not in other salivary gland tumours (Zhao et al. 1998). Pleomorphic adenoma expresses a higher level of BMP-2 than normal salivary gland tissue, which is accompanied by increased type 2 collagen expression or cartilage tissue formation. Immunohistochemically, BMP-2 is mostly found in the modified myoepithelial cells around cartilage tissue areas and the basement membrane (Kusafuka et al, 1998). Its expression in pleomorphic adenomas is confirmed by the findings of our research, which

σία κόνδρινου ιστού στο παρασκεύασμα (Zhao και συν. 1998). Πιθανολογείται ότι η έκφραση BMP-2 επάγει την παραγωγή κολλαγόνου τύπου 2 και άλλων παραγόντων όπως γλυκοζαμινογλυκάνες που αποτελούν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας των κονδροειδών σχηματισμών στα πλειόμορφα αδενώματα (Zhao και συν. 1998). Αναφέρεται επίσης πως οι BMPs που εκκρίνονται από κύτταρα των πλειόμορφων αδενώματων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του κονδροειδούς στοιχείου του όγκου προκαλώντας τη μετατροπή των μυοεπιθηλιακών κυττάρων σε κονδροκύτταρα (Hatakeyama και συν. 1994). Στα πλειόμορφα αδενώματα επίσης, ο σχηματισμός κονδρικού ιστού συσχετίζεται με υπερέκφραση του BMP από τα νεοπλασματικά μυοεπιθηλιακά κύτταρα (Kusafuka και συν. 2001). Οι BMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μορφογένεση οστίτη και κόνδρινου ιστού *in vivo*, επάγοντας τη διαφοροποίηση των μεσεγκυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες ή κονδροβλάστες. Έτσι, είναι πιθανό η έκφραση BMPs από τα κύτταρα του όγκου στα πλειόμορφα αδενώματα να προάγει το σχηματισμό οστίτη ή κόνδρινου ιστού σε αυτά από διαφοροποίηση νεόπλαστων μυοεπιθηλιακών κυττάρων σε κονδροκύτταρα όπως προκύπτει από πειράματα όπου διαπιστώνεται η έκφραση BMPs στα πλειόμορφα αδενώματα, αν και σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων (Yue και συν. 2000). Η μορφογενετική πρωτεΐνη εκ κόνδρινου ιστού I (CDMP1, cartilage-derived morphogenetic protein 1), που έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό κόνδρου σε επίμυες κατά την ανάπτυξη, εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικό ιστό σιελογόνων αδένων όσο και σε πλειόμορφα αδενώματα, σε αντίθεση με την CDMP2, και μάλιστα από τα κυβοειδή νεόπλαστα μυοεπιθηλιακά κύτταρα γύρω από τις περιοχές κόνδρινου ιστού του αδενώματος (Kusafuka και συν. 2003). Επιπλέον, και άλλες BMPs, όπως η BMP-6 έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζεται σε πλειόμορφα αδενώματα των μειζώνων σιελογόνων αδένων, αλλά όχι και των ελασσόνων, όπως της υπερώας, ενώ εντοπίζεται κυρίως στα κενοτοπιώδη κύτταρα του κόνδρου και στα έσω κύτταρα των πόρων των αδενο-πορωδών δομών των πλειόμορφων αδενώματων (Kusafuka και συν. 1999). Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να καταδεικνύει τη σχέση της BMP-6 με τη διαφοροποίηση των έσω κυττάρων των πόρων και των πορωδών και αδενοειδών σχηματισμών γενικότερα στα πλειόμορφα αδενώματα. Επίσης, ασθενής έκφραση παρατηρείται και στα νεόπλαστα μυοεπιθηλιακά κύτταρα των μυξοειδών περιοχών των όγκων, που πιθανόν σχετίζεται με την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Kusafuka και συν. 1999). Όσον αφορά στους περιορισμούς της έρευνας διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον τύπο του όγκου και την ηλικία αλλά και με το φύλο, καθώς μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών (68%) και πιο ηλικιωμένοι ήταν οι ασθενείς με όγκο Warthin αλλά δεν αναλύθηκε η

however indicates even stronger BMP-2 expression in Warthin tumours.

Additionally, it has been reported that there is a quantitative relationship between BMP-2 expression and cartilage tissue formation, even though BMP-2 expression has also been identified in pleomorphic adenomas in which no cartilage tissue is found in the resected specimen (Zhao et al. 1998). It is speculated that BMP-2 expression induces the production of type 2 collagen and other factors such as glycosaminoglycans, which are among the components of the extracellular matrix of cartilage formations in pleomorphic adenomas (Zhao et al. 1998). It is also reported that BMPs secreted from pleomorphic adenoma cells play a significant role in the formation of the tumour's cartilaginous component, causing myoepithelial cells to differentiate into chondrocytes (Hatakeyama et al. 1994). Moreover, in pleomorphic adenomas, the formation of cartilage tissue is associated with BMP over-expression from the neoplastic myoepithelial cells (Kusafuka et al. 2001).

BMPs play a significant role in the *in vivo* morphogenesis of bone and cartilage tissue, leading to the differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts or chondroblasts. Thus, it is likely that BMP expression from tumour cells in pleomorphic adenomas promotes the formation of bone and cartilage tissue in them, through the differentiation of neoplastic myoepithelial cells into chondrocytes, as has been observed in experiments where BMP expression is identified in pleomorphic adenomas, despite the small number of specimens involved (Yue et al. 2000). Cartilage-derived morphogenetic protein I (CDMP1), which had been reported to play a significant role in cartilage formation in rats during development, is expressed in both normal salivary gland tissue and pleomorphic adenomas, in contrast to CDMP2, and, more precisely, its expression originates from the cuboidal neoplastic myoepithelial cells around the cartilage tissue areas of the adenoma (Kusafuka et al. 2003). Moreover, it has been observed that other BMPs, such as BMP-6, are also over-expressed in pleomorphic adenomas of the major salivary glands, but not of the minor ones, such as those of the palate, while they are mostly found in the lacunae of the cartilage and the inner cells of the pores in the adeno-porous structures of pleomorphic adenomas (Kusafuka et al. 1999).

This finding could indicate a relationship between BMP-6 and the differentiation of the inner cells in the pores and, generally, the porous and adenomatous formations of pleomorphic adenomas. Moreover, a weak expression is also observed in the neoplastic myoepithelial cells of the myxoid areas of tumours, which is probably associated with the production of extracellular matrix (Kusafuka et al. 1999).

Regarding the limitations of this study, a correlation was discovered between the type of tumour and the

έκφραση BMP-2 σε σχέση με την ηλικία ή το φύλο, παρά ταύτα τα δεδομένα αυτά λήφθηκαν υπόψη στην ανάλυση και τα αποτελέσματα της σύγκρισης της έκφρασης BMP-2 στους δύο τύπους όγκων διορθώθηκαν ως προς την ηλικία και το φύλο. Επίσης, δεν μελετήθηκε η έκφραση της BMP-2 σε σχέση με τα κλινικά χαρακτηριστικά των όγκων (μέγεθος, επιθετικότητα, υποτροπή, προέλευση από μειζονες ή ελάσσονες σιελογόνους αδένες).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επίδραση της έκφρασης της BMP-2 στην ανάπτυξη και στον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς των καλοίθων όγκων της παρωτίδος ελάχιστα έχει μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Με βάση τη μελέτη μας καταδεικνύεται σαφής παραγωγή BMP-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα σε κυσταδενολέμφωμα Warthin καθώς και σε πλειόμορφα αδενώματα. Επίσης, από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προκύπτει σαφής διαφορά στο βαθμό έκφρασης της BMP-2 ανάμεσα στον όγκο Warthin και στο πλειόμορφο αδενώμα, με τα κύτταρα των πλειόμορφων αδενωμάτων να έχουν 69 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα (odds) υψηλότερης έκφρασης BMP-2 από ότι κύτταρα των όγκων Warthin. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να μην επιβεβαιώνουν την αρχική ερευνητική υπόθεση πως ο βαθμός έκφρασης BMP-2 θα ήταν μεγαλύτερος στα πλειόμορφα αδενώματα που παρουσιάζουν πιο επιθετική συμπεριφορά ως προς την επέκτασή τους στους γύρους ιστούς με την προεκβολή ψευδοποιδίων σε σχέση με τους όγκους Warthin.

Κρίνεται απαραίτητη η συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα ελέγχων σε άλλους καλοίθεις και κακοήθεις όγκους των παρωτίδων και των σιελογόνων αδένων γενικότερα ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος της BMP-2 και της σχέσης του βαθμού έκφρασής της με την βιολογική συμπεριφορά των όγκων αυτών, καθώς και περαιτέρω μελέτες για αναγνώριση του ρόλου της στην μορφογένεση και διαφοροποίηση των όγκων σε μοριακό επίπεδο και της συσχέτισής της με αυξημένη κινητικότητα και διεισδυτικότητα των κυττάρων των όγκων στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης στρώματος – υποστρώματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

- Bentley H, Hamdy FC, Hart KA, Seid JM, Williams JL, Johnstone D, Russell RG: Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J of Cancer* 66(6):1159–63, 1992
- Bieniasz M, Oszajca K, Eusebio M, Kordiak J, Bartkowiak J, Szemraj J.: The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 in lung cancer patients. *Lung Cancer*. 66(3):319–26, 2009

patient's age and sex, as a higher percentage of men (68%) of older ages were Warthin tumour patients. BMP-2 expression was not analysed in relation to the age or sex, however this data was taken into account for the analysis, and the results of the comparison of BMP-2 expression between the two types of tumours were adjusted for age and sex. Finally, BMP-2 expression was not studied in relation to other clinical features of the tumours (size, aggressiveness, recurrence, origin from the major or minor salivary glands).

CONCLUSIONS

The impact of BMP-2 expression on the development and determination of the biological behavior of benign parotid tumour is an under-researched topic in the international literature.

Our study indicates a clear production of BMP-2 by the neoplastic cells in Warthin cystadenomas and pleomorphic adenomas. Moreover, the findings of our study point to a clear difference in the level of BMP-2 expression between Warthin tumours and pleomorphic adenomas, with the cells of pleomorphic adenomas being 69 times likelier (odds) to have stronger BMP-2 expression than Warthin tumour cells. These results do not seem to confirm our initial research hypothesis that the level of BMP-2 expression would be higher in pleomorphic adenomas, which have a more aggressive behavior in terms of their expansion into adjacent tissues by means of pseudopods, than it would be in Warthin tumours

It is necessary to evaluate these results against the results of similar studies on other benign or malignant tumours of the parotids and salivary glands in general, in order to clarify the role of BMP-2 and the relationship between its level of expression and the biological behaviour of these tumours. It is also necessary to investigate its role in the morphogenesis and differentiation of tumours at a molecular level, as well as its association with increased levels of motility and invasiveness of tumour cells within the interaction of the tissue levels.

- Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Spanjol J, Dordevic G, Mustac E, Fuckar Z.: Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croatian Medical Journal* 46(3):389–96, 2005
- Clement JH, Raida M, Sanger J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Hoffken K, Wolft S, Harris AL: Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 27:401–407, 2005

- Feeley BT, Krenek L, Liu N, Hsu WK, Gamradt SC, Schwarz EM, Huard J, Lieberman JR.: Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 38:154–166, 2006
- Hatakeyama S, Satoh M, Yoshimura N, Otsu T.: Immunocytochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) in salivary gland pleomorphic adenoma. *J of Oral Pathol & Med*, 23(5):232-6, 1994
- Herpin A, Cunningham C.: Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *The FEBS Journal* 274(12):2977–85, 2007
- Holley SA, Neul JL, Attisano L, Wrana JL, Sasai Y, O'Connor MB, De Robertis EM, Ferguson EL: The *Xenopus* dorsalizing factor noggin ventralizes *Drosophila* embryos by preventing DPP from activating its receptor. *Cell*. 23:86(4):607-17, 1996
- Hsu SM, Raine L: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29(11):1349-53, 1981
- Kang MH, Kim JS, Seo JE, Oh SC, Yoo YA.: BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. *Experimental Cell Research* 316:24–37, 2010
- Kusafuka K, Luyten FP, De Bondt R, Hiraki Y, Shukunami C, Kayano T, Takemura T.: Immunohistochemical evaluation of cartilage-derived morphogenic protein-1 and -2 in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Virchows Archiv* 442(5):482-90, 2003
- Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Fujiwara M, Takemura T.: Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas. *Virchows Archiv* 432(3):247-53, 1998
- Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T.: Immunohistochemical localization of members of the transforming growth factor (TGF)-beta superfamily in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *J of Oral Pathol and Med* 30(7):413-20, 2001
- Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T.: Immunohistochemical localization of the bone morphogenetic protein-6 in salivary pleomorphic adenomas. *Pathology International* 49(12):1023-7, 1999
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J: The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24(9):1445–54, 2003
- Marquis ME, Lord E, Bergeron E, Drevelle O, Park H, Cabana F, Senta H, Faucheu N: Bone cells-biomaterials interactions. *Frontiers in Bioscience* 14:1023–67, 2009
- Meejung K, Senyon C: BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep.* 44(10): 619–634, 2011
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM: Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*. 23:86(4):589-98, 1996
- Reddi AH.: BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 16:249–250, 2005
- Rothhammer T, Bataille F, Spruss T, Eissner G, Bosserhoff AK.: Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene*. 26:4158–4170 2007
- Singh A, Morris RJ.: The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 21:299–310
- Smadja DM, Bieche I, Silvestre JS, Germain S, Comet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen JP, Emmerich J, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P.: Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 28:2137–2143, 2008
- Urist MR.: Bone: formation by autoinduction. *Science*. 12:150(3698):893-9, 1965
- Wordinger RJ, Clark AF.: Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)* 232(8):979-92, 2007
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K: Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *The Journal of Cell Biology* 130(1):217-26, 1995
- Yanagita M.: BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(3):309-17, 2005
- Yue W, Yang L, Dong S, Yan W, Zhu F: The expression and mechanism study of BMP in pleomorphic adenoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi (West China Journal of Stomatology)* 18(2):91-3, 2000
- Zhang J, Li L: BMP signaling and stem cell regulation. *Developmental Biology* 284(1):1–11, 2005
- Zhao M, Takata T, Ogawa I, Takekoshi T, Nikai H: Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and type II collagen in pleomorphic adenoma of salivary glands. *J of Oral Pathol and Med* 27(7):293-6, 1998

Διεύθυνση επικοινωνίας:
Παναγιώτης Χρυσολόυρης
 Μαυροματαίων 16,
 106 82 Αθήνα,
 Τηλ: 2108223751, 2108225975
 e-mail: xrysolour@yahoo.gr

Address:
Panagiotis Chryssolouris
 Mavromateon 16,
 106 82 Athens, Greece,
 Tel: 2108223751, 2108225975
 e-mail: xrysolour@yahoo.gr