

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA METALOTIONEÍNA, ÓXIDO NÍTRICO SINTASE II E
ÓXIDO NÍTRICO EM NEOPLASIA CUTÂNEAS ASSOCIADAS A
RADIAÇÃO ACTÍNICA**

Aluno: Paulo César Borges Júnior

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Adriano Mota Loyola

UBERLÂNDIA – MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA METALOTIONEÍNA, ÓXIDO NÍTRICO SINTASE II E
ÓXIDO NÍTRICO EM NEOPLASIA CUTÂNEAS ASSOCIADAS A
RADIAÇÃO ACTÍNICA**

Aluno: Paulo César Borges Júnior

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Adriano Mota Loyola

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ESTUDO DA METALOTIONEÍNA, ÓXIDO NÍTRICO SINTASE II E
ÓXIDO NÍTRICO EM NEOPLASIA CUTÂNEAS ASSOCIADAS A
RADIÇÃO ACTÍNICA**

Aluno: Paulo César Borges Júnior

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: FOUED SALMEN ESPINDOLA

Examinadores: ADRIANO MOTA LOYOLA

VICENTE DE PAULA ANTUNES TEIXEIRA

Data da Defesa: 30/ 03 / 2004

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

(Orientador)

Uberlândia, ____ / ____ / ____

Dedico este trabalho aos pacientes voluntários que compreenderam a importância da pesquisa e autorizaram a coleta para o presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Á **Deus**, por tudo que fez e tem feito por min.

Aos meus pais **Paulo César Borges** e **Ilza Marques Borges**, meus mestres que com amor e carinho souberam me educar e me incentivar para que eu pudesse estar onde estou.

Aos meus irmãos **Leandro e Naira**, por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu orientador **Dr. Foued**, pela oportunidade de aprender mais.

Ao meu co-orientador **Dr. Adriano**, pelo incentivo, apoio e conselhos.

À **Dra. Paula**, pela disponibilidade e confiança na utilização do laboratório de captura de imagens.

Á **Silmara (FMRP/SP)**, pela ajuda na revelação dos blots.

Á **Ms. Danielle Reis**, pela ajuda na dosagem do óxido nítrico.

Aos médicos **Dr. Alceu, Dr. Ademir, Dr. Silval, Dr. Sindeval e Dr. Sanches**, que ajudaram na coleta e no diagnóstico do material biológico.

Aos técnicos e funcionários **Da. Maura, Ângela, Ignez, Paulo, e demais**, pela presteza e apoio.

Aos amigos de bancada **Aníbal, Carlos, Cibele, Daniela, Elisângela, Fabiana, Fátima, Ismair, Juliana Hubaide, Juliana Cobo, Juliana Meolo, Leonardo, Letícia, Lorena, Miguel, Mila, Nádia, Pablo, Renata Roland, Renata Santos, Romeu, Vanessa, Vivian, Viviane e Wilson**, pela boa convivência nos laboratórios.

Às amigas **Rosy Iara, Juliana Kuribayachi e Luciana Calábria**, por estarem sempre dispostas a me ajudarem, me ensinando, aconselhando e incentivando.

Á todos que torceram, lutaram e que, de alguma forma, me acompanharam para a realização deste trabalho.

Á CAPES, FAPEMIG (CDS 881-01) e CNPq (projeto 465888-00—3) pelo financiamento deste projeto.

INDICE

INTRODUÇÃO GERAL _____	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	22
CAPITULO I: <i>Expressão da metalotioneína em neoplasias cutâneas associadas à irradiação actínica</i> _____	39
Resumo _____	40
Abstract _____	41
Introdução _____	42
Material e Métodos _____	44
Resultados _____	46
Discussão _____	50
Referências Bibliográficas _____	53
CAPITULO II: <i>Óxido nítrico sintase II e óxido nítrico em neoplasias cutâneas associadas à radiação actínica</i> _____	59
Resumo _____	60
Abstract _____	61
Introdução _____	62
Material e Métodos _____	64
Resultados _____	66
Discussão _____	68
Referências Bibliográficas _____	70
CAPITULO III: <i>Ausência de correlação entre oxido nítrico, oxido nítrico sintase II e metalotioneína em carcinomas basocelulares</i> _____	73
Resumo _____	74
Abstract _____	75
Introdução _____	76
Material e Métodos _____	78
Resultados _____	82
Discussão _____	84
Referências Bibliográficas _____	85
CONCLUSÕES GERAIS _____	90
ANEXOS _____	92

INTRODUÇÃO GERAL

A metalotioneína (MT), proteína descrita na década de 50, tem sido estudada por suas propriedades associadas a detoxificação de substâncias genotóxicas, ao estoque e regulação dos níveis celulares de zinco e por uma provável função relacionada a apoptose.

Apesar de seu papel protetor para as células normais, a sua presença em células neoplásicas tem conferido ao tumor maior resistência ao tratamento anti-neoplásico, caracterizando-a, desta forma, como sinalizadora de maior agressividade tumoral. Este aspecto tem sido considerado importante na predição do comportamento tumoral.

Sua função na economia celular ainda é pouco conhecida. Contudo, tem sido proposta uma ação reguladora na disponibilização intracelular de metais, tais como zinco, elemento importante na regulação da conformação molecular e atividade funcional de diversas proteínas, entre as quais a proteína p53. A diminuição da concentração celular de zinco, causada pelo aumento da expressão da MT poderia causar alterações conformacionais na p53, ocasionando um fenótipo nulo, mas não mutante, desta última, com evidentes implicações nos processos de carcinogênese e progressão tumoral.

O óxido nítrico (NO) é uma das 10 menores moléculas no organismo, por isso ela é capaz de atravessar a membrana celular e influenciar enzimas e proteínas tanto no citossol quanto no núcleo, é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação, nos mecanismos de autoimunidade, e na apoptose. A síntese e formação do óxido nítrico são realizadas pela enzima - síntase do óxido nítrico (nitric oxide synthase - NOS). A função do NO é a defesa do organismo contra patógenos, no entanto uma superprodução de NO estaria relacionado ao aumento da angiogênese, um pré-requisito para o crescimento e a progressão tumoral.

Evidências recentes têm associado a MT a mecanismos de proteção a radiação ultravioleta e aos seus efeitos intracelulares a partir de modelos experimentais. Por outro lado, estas alterações parecem se refletir nas vias metabólicas do NO com efeitos sobre as funções da MT na economia celular.

Nosso trabalho tem por objetivo aprofundar no entendimento das relações entre a expressão e o conteúdo de MT, iNOS e NO em lesões de pele associadas à radiação actínica, no intuito de coletar indícios de uma possível participação deste circuito no processo de carcinogênese e progressão tumoral.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Lesões associadas à radiação actínica: Câncer de Pele

A carcinogênese cutânea tem sido bastante estudada quanto aos principais fatores físicos, químicos e biológicos potencialmente envolvidos no desenvolvimento tumoral.

O câncer de pele não melanoma é o tipo de câncer mais freqüente na população brasileira. Segundo as Estimativas sobre Incidência e Mortalidade por Câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), dos 402.190 novos casos previstos para o ano de 2003, o câncer de pele não melanoma será responsável pelo diagnóstico de 82.155 novos casos.

Porém, apesar da alta taxa de incidência, o câncer de pele não melanoma não consta como um dos dez tipos de câncer que mais matam. A facilidade do diagnóstico precoce é o principal fator que contribui para o baixo índice de mortalidade.

O carcinoma basocelular (CBC) é o mais freqüente dos cânceres de pele, correspondendo a cerca de 75% dos cânceres não melanoma diagnosticados. Nos Estados Unidos, a média é de 191 pessoas diagnosticadas por cem mil pessoas brancas.

Os fatores considerados etiológicos e/ou precipitantes dos cânceres cutâneos são vários, como predisposição genética; radiação ultravioleta (UV); radiação não ultravioleta, como raios-X e radiação gama, fatores hormonais, imunossupressão, agentes químicos e drogas citotóxicas, traumatismos, papilomavírus, queimaduras crônicas, cicatrizes, úlceras, fístulas, osteomielite crônica e albinismo. As lesões de lupus eritematoso e os granulomas de longa

duração, como da tuberculose, hanseníase e sífilis, podem desenvolver carcinomas baso e espinocelulares. A poroceratose de Mibelli, epidermolise bolhosa distrófica, líquen escleroso e atrófico, epidermodisplasia verruciforme e condiloma acuminado gigante de Buschke-Lowenstein podem levar ao aparecimento de carcinomas espinocelulares (CEC). No xeroderma pigmentoso o câncer surge precocemente e, em geral ainda na infância, aparecem como carcinomas baso e espinocelulares e melanomas. O nevo sebáceo de Jadassohn, que tem maior frequência na cabeça, pode anteceder carcinomas basocelulares e raramente espinocelulares, enquanto no tricoepitelioma múltiplo surgem apenas carcinomas basocelulares. Os agentes físicos, como o calor, provocam carcinoma nas pernas, como é o caso de indivíduos que ficam muito próximos de brasas acesas. A luz solar provoca câncer na pele exposta. A maior exposição ocorre quanto maior a altitude e menor a latitude, havendo uma correlação inversa entre o grau de pigmentação e a habilidade de bronzeamento (SILVA, 2000).

Um dos componentes mais nocivos da luz solar nocivos a pele são os raios ultravioletas. O espectro da luz ultravioleta está situado num comprimento de onda entre 200 e 400 nm. A região entre 400 e 320 nm, denominada região "da luz negra", é chamada UVA e é responsável pela pigmentação da pele ou bronzeado. A região entre 320 e 280 nm é denominada UVB, a região do eritema. A maioria dos efeitos biológicos e potencialmente danosos da radiação UV das fontes naturais situam-se nesta faixa. A região entre 280 e 220 nm é denominada UVC e é conhecida pelos seus efeitos bactericida e germicida. Os raios UVC são encontrados em lâmpadas germicidas e em alguns arcos de solda, mas não na luz solar na superfície da terra (MATSUI & DELEO, 1995) A região entre 220 e 170 nm é o comprimento de onda mais eficiente para a produção de ozônio. A UVR neste comprimento de onda é grandemente absorvida pelo ar.

Indiretamente, tanto a ultravioleta A quanto a B tem ação local e sistêmica no sistema imune, por efeito imunossupressor, e, em geral, os tumores induzidos por essas radiações são altamente antigênicos. Como efeito sistêmico induzem células supressoras tumor-específicas e, como local na pele, diminuem o número de células de Langerhans, com inatividade das remanescentes. Com isso, há alteração da função de apresentação do antígeno, bloqueio da ativação da função celular efetora, levando a um bloqueio da resposta imune. Estas ações podem ter

efeito direto na depressão da resposta imunológica ao tumor em desenvolvimento, facilitando, desta forma, sua progressão (SILVA, 2000).

A exposição da pele à luz ultravioleta solar é um problema crescente no mundo devido ao aumento da população no anel solar, ao aumento do número de férias desfrutadas nas áreas quentes do globo, à popularidade do banho solar, aos salões de bronzeamento, e esportes ao ar livre. O aumento da expectativa de vida na maioria dos países industrializados está aumentando a exposição solar da população ao longo da vida. (DE FRANZO, 1992).

A radiação ultravioleta é mais prejudicial em regiões de clima seco e ensolarado e o fotoenvelhecimento sempre precede o câncer. O efeito do sol é cumulativo, o da ultravioleta é maior quando aplicada em frações, e é proporcional à dose acumulada. A puvaterapia, tipo de tratamento que utiliza o efeito da ultravioleta após administração de psoraleno por via oral, pode provocar maior incidência de carcinomas baso e espinocelulares, por seu efeito mutagênico e imunossupressivo. Alguns antioxidantes protegem a pele contra carcinogenicidade da ultravioleta, talvez por prevenirem o efeito dos radicais livres. A cafeína e a teofilina também tem ação protetora, parecendo prevenir o erro no reparo durante a pós-replicação. O ácido retinóico, em concentração não tóxica e não irritativa, dependendo das circunstâncias, estimula ou inibe, e a mostarda nitrogenada e as nitrosouréias; em doses subcarcinogênicas usadas na psoríase e micose fungóide, aceleram a carcinogênese da ultravioleta. (JUCHEM *et al*, 1998)

Radiação solar (actínica) não ionizante, ao atingir a pele, pode ser absorvida, refletida ou refratada. A absorção dos fótons é feita por moléculas que recebem o nome de cromóforos. Os cromóforos podem estar na epiderme representados pela camada córnea, melanina, esteróides, ácido urônico, e tanto na epiderme quanto na derme, pelos ácidos nucleicos (DNA, RNA), lisossoma, membrana citoplasmática e outros. O resultado dessa absorção é nocivo à pele - e semimucosa de lábio -, e as alterações decorrentes das radiações com a matéria viva são conhecidas com o nome genérico de fotosensibilidade (CERNEA & HOJAIJ, 2000).

A fotocarcinogênese é uma das manifestações de processo fotobiológico muito maior, provocando respostas locais e sistêmicas, que podem ser diretas ou

indiretas. A ultravioleta B (UVB), tem ação fotocarcinogênica direta, levando a carcinomas baso e espinocelulares. Atua como indutora e promotora potente de neoplasias em camundongo, levando à alteração estrutural no DNA humano, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Provoca alterações mutagênicas, através da formação de dímeros de timina vinculados ao desenvolvimento de cânceres; os efeitos deletérios dos raios UVA envolvem a fotosensibilidade das células alvo e a geração de espécies reativas do oxigênio (GRUIJ, 2000). Para essas mutações existem mecanismos de proteção com reparo do DNA, pela excisão do defeito, reparo na pós-replicação e fotoreativação. O tumor surge quando há ausência ou deficiência nesse reparo (SILVA, 2000). A radiação UV resulta num aumento da produção de radicais do oxigênio, aumentando a fotoperoxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana, produzindo grandes quantidades de espécies reativas do oxigênio que estão implicadas na iniciação e progressão tumoral (HAGESAWA, *et al.* 1996).

O estresse oxidativo pode desempenhar diferentes papéis na patogênese dos cânceres de pele melanoma e não-melanoma (CBC e CEC). Nos não-melanomas há uma diminuição da defesa antioxidante, causada pela exposição crônica aos raios UV, contribuindo para a ocorrência de mutações e carcinogênese (SANDER *et al.*, 2003).

Predominantemente, o câncer de pele é conhecido por ser causado pela exposição crônica da pele aos raios UV do sol. Os três tipos de cânceres mais frequentemente relacionados à exposição solar são o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma maligno.

Os cânceres de pele não melanoma, CBC e CEC, somam aproximadamente 80% e 16% , respectivamente, de todos os cânceres de pele, ambos sendo derivados dos queratinócitos da camada basal da epiderme da pele (BOWDEN, 2004).

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno que se origina dos queratinócitos basais da epiderme e seus apêndices, possui malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos. Seus componentes celulares se assemelham às células indiferenciadas e imaturas do estrato basal do epitélio, apresentando um estroma característico. Ocorre mais comumente na pele da cabeça e pescoço, usualmente como lesões únicas.

Raramente é diagnosticado na palma das mãos e sola dos pés. Apresenta-se, histologicamente, como massas nodulares de células basalóides que se estendem para dentro da derme, podendo assumir diferentes padrões arquiteturais como sólido, glandular, queratótico, esclerodermiforme entre outros (ELDER *et al*, 1997)

CBC é o tumor mais comum afetando as pessoas de pele clara; mais raramente produz metástase (KRIPKE, 1993). Embora muitos dos CBCs sejam originados em áreas da pele que estão relativamente protegidas do sol, como o couro cabeludo e região retro-auricular, está amplamente aceito que a UVB é o principal fator etiológico na gênese do CBC (BALES, 1993).

Uma vez que o paciente tenha desenvolvido um tumor de pele, ele tem um maior risco de desenvolver outros tumores. Estudos recentes mostram que o risco estimado de desenvolver um ou mais novos tumores de pele são 35%, aos 3 anos e 50%, aos 5 anos. Os novos tumores de pele tendem a ser do mesmo tipo celular do tumor prévio (PATEL, 1992).

O carcinoma basocelular pode aparecer sem razões aparentes, é de crescimento lento e raramente emite metástase (BOWDEN, 2004), mas existem alguns fatores que influenciam seu aparecimento. O mais comum é na pele clara associada com exposição à luz solar forte, principalmente nos pacientes com *xeroderma pigmentosum* aos quais CBC e Carcinoma de células escamosas ou Carcinoma espinocelular (CEC) são comuns. Mas a exposição à luz solar não é suficiente para a produção de CBC, o que é enfatizado pela rara ocorrência no dorso das mãos e dedos. São muitos os fatores adicionais que predis põem uma pessoa a desenvolver CBC e CEC como numerosas doses de radiação (raios X) (SCHWARTZ *et al.*, 1995). Esse tipo de câncer é mais comum em adultos com picos de incidência por volta dos 40 anos. Porém, com a constante exposição de jovens aos raios solares a média de idade dos pacientes vem diminuindo (INCA, 2004)

SALDANHA *et al*, (2003) sugerem duas maneiras de classificar o CBC: uma baseada no crescimento histopatológico e outra na diferenciação celular. Aprofundando na classificação quanto ao padrão de crescimento histopatológico o CBC é dividido em BAIXO e ALTO risco. Os de alto risco seriam os caracterizados por crescimento de extensões subclínicas, excisão incompleta,

agressividade local, comportamento invasivo, ou reincidência. Os de baixo risco não apresentariam as características do anteriores e morfológicamente apresentam espaços entre os nódulos tumorais devido ao acúmulo de mucina. No entanto essa classificação é dificultada pelo fato do CBC geralmente demonstrar mais de um padrão de crescimento.

O carcinoma espinocelular cutâneo (CEC) é uma neoplasia maligna originária da transformação do queratinócito basal da epiderme, traduzido pela presença de massas celulares epidermóides atípicas. (GRANSTEIN, 1990). Apresenta histologicamente massas celulares epiteliais irregulares que proliferam declinantemente dentro da derme. O CEC normalmente se origina de uma lesão precursora denominada queratose actínica. Embora o CEC seja menos comum que o CBC, a relação entre exposição solar e neoplasia é mais direta no CEC que no CBC (KRIPKE, 1993). Os dois tipos de tumores não-melanomas, CBC e CEC, podem ser invasivos, mas o CEC possui maior potencial para emitir metástase (ELDER *et al*, 1997, BOWDEN, 2004) e tende a causar inflamação mais severa, ulcerações de maiores dimensões e crescimento mais rápido que o CBC (DEREN *et al*, 2003). Apesar das diferenças no crescimento, TILLI *et al*, 2003 demonstram que ambos tem baixo índice proliferativo.

DEREN *et al*, relataram em 2003 um caso raro e atípico de CEC em que o paciente não apresentava nenhuma lesão predisponente. A lesão apresentou uma progressão rápida, causando a morte do paciente.

A carcinogênese é, sem sombra de dúvida, processo multifatorial induzido e modulado por inúmeros fatores endógenos e exógenos, muitos ainda a descobrir e confirmar, sendo seu estudo da maior importância para a prevenção do câncer.

2.2 - Metalotioneína (MT)

As metalotioneínas compõem uma classe de proteínas intracelulares não-enzimáticas identificadas há quase meio século pela sua capacidade de ligação ao cádmio (MARGOSHES & VALLEÉ, 1957; ANDREWS *et al*, 1984; HAMER, 1986; KÄGI & SCHÄFFER, 1988). Constituídas nos mamíferos por 61 ou 62 resíduos de aminoácidos, caracterizam-se pelo baixo peso molecular (6 KD a 7

KD), com presença marcante de cisteína (23% a 33%) e ausência de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Possuem também alto conteúdo de metais pesados (4 a 12 átomos por mol), ligados covalentemente a apoproteína pelos grupos sulfúricos (tióis) dos resíduos de cisteína. A ligação a metais bivalentes (principalmente ao zinco) e a outros compostos (como as espécies reativas do oxigênio) constitui a principal função biológica das MTs (HAMER, 1986; KÄGI & SCHÄFFER, 1988).

Têm sido identificados quatro tipos de metalotioneína, codificadas por quatro genes diferentes. Os genes MT-I e MT-II são expressos em todos os estágios do desenvolvimento em vários tipos celulares da maioria dos órgãos (ANDREWS *et al.*, 1984; NARTEY *et al.*, 1987b; PALMITER, 1998). O gene MT-III é expresso predominantemente em neurônios, mas também em células da glia e nos órgãos reprodutivos masculinos, com funções protetoras na patogênese de doenças neurodegenerativas (como as doenças de Alzheimer e de Parkinson) e na espermatogênese (EBADI *et al.*, 1996; HUSSAIN *et al.*, 1996; FISCHER e DAVIE, 1998; PALMITER, 1998). O gene MT-IV é expresso nas células de epitélio estratificado escamoso em diferenciação (QUAIFE *et al.*, 1994).

Sua presença tem sido relatada em vários tecidos do organismo humano adulto (ELMES *et al.*, 1987; NARTEY, *et al.* 1987a; NARTEY, *et al.* 1987b; CLARKSON *et al.*, 1984; SUZUKI *et al.*, 1991; GOYER, *et al.* 1992; VAN DER OORD *et al.*, 1993; BIER *et al.*, 1994; VAN DER OORD e DE LEY, 1994; EL RAFAEY *et al.*, 1997; SUNDELIN *et al.*, 1997; KATSURAGI, *et al.* 1997; DEMACHKI e BACCHI, 1998; EID *et al.*, 1998; COURTADE *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999).

Desde sua descrição, as funções da metalotioneína têm sido alvo de intensa investigação (FISCHER e DAVIE, 1998; PALMITER, 1998). Exercem, indubitavelmente, funções relacionadas à proteção tecidual, sendo por isso consideradas “governantas” (*housekeepers*) do ambiente celular (HAMER, 1986; MANUEL, *et al.* 1992; SCHMIDT & HAMER, 1986; DAFFADA & YOUNG, 1999). Entretanto, a importância de sua ação para a célula e o mecanismo molecular pelo qual essa função é exercida ainda não foram completamente elucidados (PALMITER, 1998). Três linhas de pesquisa são consideradas mais promissoras. O pensamento mais antigo refere-se à função de detoxificação de metais pesados

e de outros agentes potencialmente danosos, que seriam neutralizados ao se ligarem à proteína. Em uma segunda hipótese, a proteína funcionaria como reservatório intracelular de zinco, metal essencial nos mecanismos de reparo, transcrição e replicação do DNA, A MT transporta sete íons zinco, que são mantidos em dois domínios termodinamicamente estáveis e cineticamente “labile” os primeiros íons a serem doados são aqueles presentes no domínio N-terminal. (FENSELAU *et al.* 2001) A apoforma Tioneína nunca foi isolada como uma origem biológica, aparentemente sua formação é instantaneamente combinada com o zinco (FISCHER & DAVIE, 1998) Acredita-se que a MT possua propriedades de redução específicas, proporcionando um controle seletivo de liberação e captura do zinco.(PALMITER; 1998). A proteína seria então extremamente importante nos processos que impedem danos genéticos permanentes. Uma terceira possibilidade, ainda não muito bem investigada, afirma que a metalotioneína possui funções reguladoras no processo de apoptose, através da via relacionada ao fator de necrose tumoral (*Tumour Necrosis Factor*, TNF).

Estudos pioneiros demonstraram o aumento do conteúdo de metalotioneína em tecidos expostos ao cádmio, elemento altamente tóxico e não-essencial, sugerindo um papel primário na regulação e detoxificação deste metal (MARGOSHES & VALLE, 1957; PISCATOR, 1964; TAMURA, *et al.* 1999) bem como na absorção, transporte e metabolismo do zinco, do cobre e de outros metais pesados (PULIDO, *et al.* 1966; HAMER, 1986; NATH *et al.*, 1988; FOLCH *et al.*, 1998; ORLOWSKI & PIOTROWSKI, 1998; RODILLA *et al.*, 1998; MURATA *et al.*, 1999). O conteúdo tecidual da proteína pode ser também regulado pelos níveis celulares de hormônios, agentes citotóxicos, citocinas e por situações de estresse físico ou químico, reconhecidamente estimulantes da biosíntese de MT *in vivo* e *in vitro*, alcançando concentrações máximas dentro de 1 a 2 dias após a exposição ao agente indutor (HAMER, 1986; DUNN, *et al.* 1987; KATSURAGI, *et al.* 1997; DAFFADA & YOUNG, 1999; HERNÁNDEZ *et al.*, 2000).

Dada a grande afinidade de átomos metálicos, e dentre estes notavelmente o zinco, pelos resíduos de tiol (SH) encontrados na metalotioneína, DOUGLAS-JONES *et al.* (1995) sugeriram que a MT poderia remover átomos de zinco da p53, proteína que possui importantes funções no controle do ciclo celular e do

crescimento da célula, alterando sua conformação espacial. Em consequência, quando superexpressa, a MT poderia gerar um fenótipo nulo, mas não mutante, desse gene supressor tumoral, favorecendo a instabilidade genômica essencial nos mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral.

Por sua vez, a expressão da metalotioneína também tem sido associada à proteção celular contra a citotoxicidade da radiação ionizante e à captura de radicais livres, sugerindo um importante papel dessa proteína na proteção contra o estresse oxidativo (THORNALLEY & VASÁK, 1985; TEMPLETON & CHERIAN, 1991; CHUBATSU & MENEGHINI, 1993; EBADI *et al.*, 1994; 1996; QUESADA *et al.*, 1996). Porém CONRAD *et al.* (2000), estudando essa propriedade em camundongos MT +/+ e MT -/-, não encontrou diferença nos níveis de danos oxidativos ou na toxicidade induzida pelo stress oxidativo, discordando da hipótese de que a MT desempenha um papel *in vivo* na proteção celular contra stress oxidativo.

Tem sido demonstrado, *in vitro*, ser a metalotioneína eficiente captadora de íons hidroxila (OH⁻) livre (THORNALLEY & VASAK, 1985; HUSSAIN *et al.*, 1996; MIURA, *et al.* 1997; PITT *et al.*, 1997; KUMARI, *et al.* 1998). Desse modo, poderia efetuar uma função protetora para as células pela redução do dano produzido por radicais livres (PITT *et al.*, 1997; ELGOHARY *et al.*, 1998; WANG, *et al.* 1999). A ausência de um modelo experimental adequado, entretanto, impede momentaneamente a verificação *in vivo* desse mecanismo (PALMITER, 1998).

A metalotioneína também possui função na proliferação e diferenciação celular que ainda não foram esclarecidas, (APOSTOLOVA & CHERIAN, 2000) Pois observou-se maior expressão da MT em células que encontravam-se em proliferação, localizadas na periferia do tumor (CHERIAN *et al.*, 2003)

Sua principal função, entretanto, parece estar de fato relacionada à atuação como reservatório regulador das concentrações intracelulares de zinco, metal essencial à célula (notavelmente aos processos relacionados à síntese e reparo do material genético), liberando-o a outras proteínas quando a disponibilidade do metal é limitada ou quando as células são expostas a condições de oxidação (KRAKER *et al.*, 1985; FISCHER & DAVIE, 1998; JACOB, *et al.* 1998; JIANG, *et al.* 1998a; JIANG, *et al.* 1998b; SUHY *et al.*, 1999). Alguns autores sugerem que o zinco na dieta aumente a síntese de MT, a absorção

ocorre em uma pequena proporção no intestino através de dois mecanismos: transporte ativo e passivo. O mineral zinco está presente em todas as partes do corpo e tem múltiplas funções. Dessa linha de pensamento, emergem algumas outras possibilidades: a metalotioneína poderia proteger a célula ao servir como fonte de zinco para as enzimas de reparo do DNA, ou de outros danos teciduais provocados por tais agentes genotóxicos (THOMAS, *et al.* 1986; ZENG *et al.*, 1991a; ZENG, *et al.* 1991b; PRASAD, 1992; CHERIAN *et al.*, 1993; CHU, 1994); por outro lado, níveis excessivos poderiam ser prejudiciais, pois removeriam uma grande quantidade do metal, afetando a função de proteínas essenciais do ciclo celular, como por exemplo a p53, que pode ser inativada através de alteração conformacional provocada pela ausência de zinco (HAINAUT & MILNER, 1993; DOUGLAS-JONES *et al.*, 1997).

A participação da metalotioneína no processo de apoptose ainda não é bem conhecida, e foi recentemente proposta quando KONDO *et al.* (1995) e KONDO *et al.* (1997) verificaram o aumento da expressão de proteínas de genes de resposta ao dano do DNA e da apoptose em células que não expressavam a proteína. TSANGARIS e TZORTZATOU-STATHOPOULOU (1998) obtiveram resultados semelhantes. Tais estudos mostravam que a proteína inibia o fenômeno da apoptose. ABDEL-MAGEED e AGRAWAL (1998) mostraram que essa ação provavelmente era devida à indução e ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), que atua na via apoptótica relacionada ao TNF e inibe o suicídio celular (VAN ANTWERP *et al.*, 1996). Entretanto, SAKURAI *et al.* (1999) mostraram dados que indicam que a MT funcionaria como um regulador negativo da atividade do NF- κ B. Outros estudos são necessários para determinar qual é a participação da proteína no processo apoptótico.

Em função dessas propriedades, a metalotioneína tem sido alvo de estudo em Oncologia, dadas as suas funções biológicas diversas e sua possível correlação com a carcinogênese, quando teria um papel protetor (CHERIAN *et al.*, 1993; KOBAYASHI *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1998), e com o prognóstico em câncer humano, em que a superexpressão da proteína tem sido associada a comportamentos mais agressivos (ANDREWS *et al.*, 1987; NARTEY *et al.*, 1987b; KELLEY *et al.*, 1988; BAHNSON *et al.*, 1991; SCHMID *et al.*, 1993; HAERSLEV *et al.*, 1994; ÖFNER *et al.*, 1994; DOUGLAS-JONES *et al.*, 1995; GOULDING *et al.*,

1995; OSHIO *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1996; HISHIKAWA *et al.*, 1997; JASANI & SCHMID, 1997; KUO & LO, 1997; ROSSEN *et al.*, 1997; SUNDELIN *et al.*, 1997; DEMACHKI & BACCHI, 1998; HIURA *et al.*, 1998; SHUKLA *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999; MCCLUGGAGE *et al.*, 1999; CARDOSO *et al.*, 2002).

O controle da transcrição da indução da MT e as mudanças na sua localização, nuclear e citoplasmática, durante a proliferação e diferenciação celular, sugere que níveis alterados de MT podem ser esperados em qualquer situação onde há crescimento celular anormal, como no câncer, mas a razão para esse fato ainda não foi esclarecida. O padrão de marcação da MT em tumores humanos, não depende apenas do crescimento tumoral, e pode ser influenciado por vários fatores como o tipo de tumor, a origem celular, o tipo histológico, a razão entre a proliferação morfológica heterogênea e o grau de diferenciação, e ao estágio do tumor. Além do mais, a presença de subpopulações de microregiões de células heterogêneas com grau de crescimento e propriedades funcionais variáveis dentro do tumor, tornam difícil o estudo da expressão da MT. (CHERIAN *et al.*, 2003)

DEMACHKI e BACCHI (1998) relatam uma série de fatores endógenos e exógenos indutores da síntese da metalotioneína *in vitro* ou *in vivo* (por exemplo íons de metais pesados, hormônios, fatores de crescimento, agentes inflamatórios e citocinas, promotores tumorais e oncogenes, vitaminas, antibióticos e fatores ligados ao estresse), alguns deles, como o interferon e a dexametasona, utilizados em certos protocolos terapêuticos oncológicos. Tal fato desperta mais uma preocupação, pois o aumento dos níveis celulares de MT, se comprovada sua participação no desenvolvimento de resistência a oncoterapia, poderia comprometer a eficácia do tratamento, e, por conseguinte, o prognóstico.

SCHMIDT e HAMER (1986) mostraram diferenças na indução das isoformas do tipo MT-I segundo a origem embriológica da célula. Estimuladas por administração de cádmio, linhagens celulares de origem ectodérmica (células cultivadas de carcinoma mamário) e da mesoderme intermediária (células renais e de carcinoma cervical) ou lateral (células de linfoma) respondiam com superexpressão da isoforma MT-If; em células de origem endodérmica (células hepáticas normais ou neoplásicas, de carcinoma da bexiga ou colônico) e da mesoderme paraxial (fibroblastos, células de osteosarcoma, e de

carcinossarcoma mamário) a resposta acontecia por indução da isoforma MT-Ie, enquanto MT-If permanecia silenciosa. Controle epigenético, através de metilação do DNA poderia ser o responsável por essa expressão diferencial (JAHROUDI *et al.*, 1990). O tipo MT-II era sempre aumentado mediante a indução pelo cádmio, sem diferenças entre as linhagens.

JASANI e SCHMID (1997) discutiram o significado da superexpressão da MT em tumores humanos, avaliando a literatura direcionada à influência prognóstica e discutindo estes achados com o estudo SCHMIDT e HAMER (1986). Segundo aqueles autores, neoplasias malignas em que a superexpressão de MT relaciona-se a um pior prognóstico seriam aquelas derivadas de linhagens celulares ectodérmicas ou da mesoderme intermediária ou lateral (indução de isoformas MT-If e MT-II); em tumores derivados da endoderme ou da mesoderme paraxial o aumento da expressão da proteína (isoformas MT-Ie e MT-II) estaria relacionado a melhor prognóstico, justamente o oposto do caso anterior.

De fato, pesquisas sobre o grupo de tumores melhor estudado em relação à expressão da metalotioneína e sua influência prognóstica, os carcinomas ductais mamários, mostram que a superexpressão da proteína está relacionada a piores índices de sobrevida (FRESNO *et al.*, 1993; SCHMID *et al.*, 1993; HAERSLEV *et al.*, 1994; HAERSLEV *et al.*, 1995; OYAMA *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2000). Da mesma forma, outros trabalhos têm demonstrado resultados compatíveis à hipótese de JASANI e SCHMID para outros tumores de origem ectodérmica (ZELGER *et al.*, 1993; HIURA *et al.*, 1998), da mesoderme paraxial (UOZAKI *et al.*, 1997) e endodérmica (ÖFNER *et al.*, 1994; IOACHIM *et al.*, 1999). Outros pesquisadores, porém, encontraram resultados contraditórios (OHSHIO *et al.*, 1996; SIU *et al.*, 1998; HISHIKAWA *et al.*, 1999). É importante ressaltar o fato de que nem todos estes estudos foram realizados com adequada abordagem estatística de sobrevida (ALTMAN *et al.*, 1995).

Extrapolando os achados de SCHMIDT e HAMER (1986), o CBC e o CEC – derivado de linhagens celulares ectodérmicas (GILBERT, 1995) – seria um dos tipos de neoplasia maligna em que a superexpressão total de MT é devida as isoformas MT-If e MT-II. Em seqüência, a hipótese de JASANI e SCHMID (1997) implicaria em um pior prognóstico para as lesões que superexpressarem a proteína.

SUNDELIN *et al.* (1997) demonstraram a presença de metalotioneína em fragmentos de mucosa normal e de carcinoma epidermóide bucais. Todas as amostras de tecido normal mostraram positividade limitada às camadas de células basais e parabasais. Cerca de 90% (22 de 24 amostras) dos tumores também foram positivos para a marcação da proteína, mas esta agora se localizava na periferia das pérolas córneas em tumores bem diferenciados; os autores relataram também que havia evidência de invasão pioneira pelas células positivas. Baseados nos achados de que a metalotioneína restringe-se a células não-apoptóticas (aquelas das camadas basal e parabasal) e na afirmação de que a proteína poderia inibir a via de transdução de sinais apoptóticos relacionada ao NF-kB (via do TNF), os autores sugeriram que a proteína protegeria as células das camadas basais e parabasais normais e periféricas tumorais contra sinais apoptóticos, o que não aconteceria com as células das camadas superiores normais e centrais tumorais, as quais não expressam a proteína.

Recente estudo de MURAMATSU *et al.* (2000) confirmou alguns achados de SUNDELIN *et al.* (1997), tais como a marcação em mucosa normal limitada às camadas basais e parabasais do epitélio (acrescentando que usualmente a marcação limitava-se ao núcleo) e às células periféricas não queratinizadas das pérolas de queratina em tumores bem diferenciados. Nas lesões que se apresentavam pouco diferenciadas, houve expressão focal da proteína, particularmente nas áreas mais invasivas. Descrição interessante para a marcação nas neoplasias foi denominada “em mosaico”, nome devido à variação na reatividade (intensidade de coloração) de negativa a intensa em uma mesma área do tumor, havendo também marcação citoplasmática isolada e ou combinada à nuclear. Ainda nesse estudo, os autores pesquisaram a expressão da metalotioneína nos casos tratados e não-tratados por quimioterapia e em tumores bem ou pobremente diferenciados a histopatologia, não encontrando qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

LOACHIM *et al.* (1999) estudaram CEC de laringe encontraram positividade para a expressão de MT tanto nos casos *in situ* como nos casos infiltrativos concluindo que a MT deva ter um papel no desenvolvimento da doença maligna na laringe já na fase inicial da carcinogênese.

CARDOSO *et al* (2002) avaliaram retrospectivamente a expressão imuno-histoquímica da metalotioneína em 60 casos de carcinomas epidermóides bucais, observando, por testes estatísticos uni e multivariados de análise de sobrevivência, que a superexpressão da MT nestas neoplasias estava associada a pior prognóstico para os pacientes.

SUGITA *et al.* (2001) usaram a expressão da MT em pacientes com melanoma como indicador de prognóstico observou o maior número de reações positivas ocorrerem nas neoplasias de nível IV e V.

MURAMATSU *et al.* (2000) encontraram marcação positiva de MT em todos tumores de carcinoma epidermóide da região oral e faríngeal examinados, com grande variação na distribuição e na intensidade de marcação.

O carcinoma baso celular aparece também como um dos mais frequentes efeitos da ação carcinogénica da radiação actínica na pele. ROSSEN *et al* (1997) tem observado que 92% dos casos de carcinoma baso celular apresentam uma diminuição ou ausência de imunorreatividade para MT. KOBAYASHI *et al.* (1994) demonstraram experimentalmente que havia indução de MT em animais para proteger o tecido e as células contra a radiação UV *in vitro* e *in vivo*. REEVE *et al.* (2000) também demonstraram que a exposição a radiação UVB induzia a uma forte expressão da MT epidermal em camundongos normais. Houve aumento da resistência da pele a UVB, devido às atividades da MT induzida em camundongos pelo tratamento com Cd²⁺. (HANADA *et al.*, 1998a, 1998b, 2000).

Por fim, CHERIAN *et al.* (2003), consideraram importante a aparente ausência de dados sobre a expressão da metalotioneína em vários tumores. Afirmaram ainda que a expressão da MT em relação ao tipo celular, ao fenótipo e à resistência a drogas desses tumores também permanece por ser esclarecida. Propõem que seriam interessantes estudos para a definição do papel da MT na progressão tumoral e metástase, bem como na definição do tipo celular e no estadiamento de tumores que podem ou não expressar a proteína.

Vale ressaltar, que não há ausência de dados significativos na literatura mundial objetivando observar a expressão da MT em cânceres associados à radiação actínica. Tão pouco conseguimos identificar estudos considerando as fases pré-malignas da transformação neoplásicas dos tecidos submetidos ao mesmo tipo de agressão.

2.3 - Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. A síntese e formação do óxido nítrico apresenta a reação química em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a NG-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adeninadinnucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{2+} sendo necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000)

Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). As NOS são dependentes de O_2 , NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas cNOS e iNOS, respectivamente. Todas três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III) (NGUYENT, *et al.* 1992).

A cNOS ou Isoforma I (155 K-Da) está presente no cérebro, pode ser chamada também de bNOS (brain NO synthase) ou nNOS (neuronal NO synthase). A eNOS ou Isoforma III (140 K-Da) é expressa constitutivamente nas células endoteliais podendo também ser chamada cNOS ou EC-NOS (endothelial constitutive NO synthase). Essas são de baixo débito, estando envolvidas em processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo, controle imediato da pressão arterial. (BRUCH-GERHARZ *et al.* 1998, LEE *et al.* 2003).

A iNOS ou Isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida nos macrófagos e outras células em resposta a estresse severo, lipopolissacárides bacterianos e/ou citocinas (STUEHR *et al.*, 1991). Esta isoenzima também pode ser chamada de macNOS

(macrophage NO synthase), é uma enzima cálcio independente de peso molecular de 130 K-Da. Vários autores consideram que qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso está relacionado com o envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (BRUCH-GERHARZ *et al.* 1998, LEE *et al.* 2003).

A iNOS está envolvida na proliferação celular, a expressão do iNOS em células tumorais do cérebro depende do seu potencial de proliferação tumoral (KATO *et al.*, 2003), no crescimento celular e no controle do ciclo celular. O papel da iNOS ou NO no câncer é multidimensional, e pode ser tanto um promotor quanto um inibidor tumoral. O NO pode agir da seguinte maneira: quando produzido em altas concentrações teria atividade anti-tumoral (mediador da apoptose) e em baixas concentrações por um longo período de tempo promoveria o crescimento tumoral (promoção da angiogênese) (JENKIS *et al.*, 1995). A presença do iNOS e a geração de NO durante a PDT (terapia foto-dinâmica que consiste no tratamento de tecidos tumorais com luz visível, resultando numa cascata de eventos oxidativos que levam a morte celular) sugere que o NO está envolvido na mediação da apoptose (ALI, 2003). YOUNG-JIM *et al.*, (2002) também relacionam o envolvimento do NO na apoptose. Já foi demonstrado que durante a inflamação crônica, a exposição prolongada do meio ao NO pode iniciar e aumentar a carcinogênese no homem (WINK *et al.*, 1998). Achados confirmados por LEE *et al.*, (2003) que observaram um aumento na expressão do iNOS associado a promoção do carcinoma do pulmão.

JENKINS, *et al.* (1995) demonstraram que raios UVA e UVB da radiação solar levam a uma superexpressão do mRNA de iNOS. O papel do NO também é importante na carcinogênese pois é um mediador na formação de nitrosaminas carcinogênicas, provoca danos ao DNA, leva a uma nova vascularização, vasodilatação e ativação de metalloproteases (THOSEN & MILES. 1998). A

expressão da iNOS tem sido associada a promoção de angiogênese em tumores e correlacionada com a produção de metástases (JENKINS *et al*, 1995).

A angiogênese tumoral é essencial para o crescimento tumoral, aparentemente também tem papel importante na transição da hiperplasia a um crescimento invasivo ou em estágios mais avançados: na disseminação do tumor. O CBC e o CEC variam quanto as suas propriedades, embora ambos sejam invasivos o CBC não tem capacidade de metastizar e o CEC possui esse potencial. CHIN *et al*, (2003) demonstraram que não houve diferenças entre os cânceres não-melanoma quanto a vascularização do estroma, no entanto foram encontrados vasos na massa tumoral do CEC e nenhum na massa tumoral do CBC, Sugerindo que a angiogênese no estroma está relacionada ao comportamento invasivo, enquanto o potencial para metástase está relacionado a presença de microvasos na massa de células tumorais. (CHIN *et al.*, 2003)

A angiogênese é um pré-requisito para a progressão tumoral, e esta relacionada a produção de metástase, a angiogênese no CBC foi demonstrada em humanos *in vivo*, e essa manifestação pode ser devido aos danos provocados pela exposição da pele aos raios UVB, foi comprovado que o CBC possui uma massa vascular maior que a queratose actínica que possui natureza não invasiva (NEWELL *et al*, 2003), Outros achados demonstraram que a massa vascular da queratose actínica e do CEC inicial é igual à da pele normal; já no CEC mais diferenciado essa massa vascular apresenta-se aumentada, demonstrando uma maior angiogênese. (STRIETH *et al*, 2000). Tem sido mostrado experimentalmente que a exposição crônica a radiação UVB induz a angiogênese na pele de camundongos. (YANO *et al*, 2002)

VURAL *et al*. (2001) não encontraram diferença significativa dos níveis de NO em plasma sanguíneo entre queratose actínica e controles ou entre queratose actínica e CBC; mas os níveis de NO no plasma de pacientes com CBC foram significativamente maiores em comparação aos casos controle.

O NO está relacionado à patogenia da hiperproliferação celular, na inflamação e na mediação imune de doenças na pele e também no câncer de pele. A duração e a intensidade de produção do NO é que determina a sua ação, que pode ser um sinalizador molecular ou uma molécula com propriedades citotóxicas e imunorregulatórias. A produção primária do NO está associada a

regulação do tonus vascular e proteção tecidual. No entanto o excesso de NO, por longo período, leva a célula a providenciar resposta protetora, o que geralmente está associada com a doença. O NO pode formar pontes covalentes com moléculas alvo: quelantes de metais, como várias metaloproteínas, ativando ou inativando essas enzimas ou proteínas, o que afetaria diferentes tipos de respostas celulares (BRUCH-GERHARZ *et al.* 1998). O NO pode gerar mutações no gene da p53, conseqüentemente neoplasias com células iNOS positiva, apresentam expressão de proteína mutante da p53 (KATO, 2003).

Uma produção elevada de NO leva a uma citotoxicidade, essa toxicidade do NO é devido o resultado da reação do NO com o radical livre superóxido (O_2^-), produzindo um poderoso oxidante, o peroxinitrato ($ONOO^-$). O que o torna particularmente tóxico é a sua notável estabilidade como ânion em pH alcalino, ao contrário do NO que é altamente instável. (BECKMANS & KOPPENOL., 1996). O NO pode danificar diretamente o DNA pela desaminação de bases purinas e pirimidinas, resultando em mutações e quebra das fitas do DNA. (NGUYENT *et al.* 1992).

Nem todas as células são igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos do NO, e pouco se sabe sobre os meios de defesa contra o NO e seus metabólitos tóxicos, tanto nas células produtoras quanto nas células alvos de sua ação. Uma hipótese seria que uma superexpressão de MT reduziria a sensibilidade da célula quanto aos danos provocados pela produção de NO (SCHWARZ *et al.*, 1995). O NO aeróbico pode nitrozilar os grupos tióis da MT *in vitro* (KRÖNCKE *et al.*, 1994) e a ligação da MT com o cádmio é liberada pela exposição ao NO *in vitro* (MISRA *et al.* 1996) Essas observações implicam que o NO age como quelante de metais dos grupos sulfidrilas da MT, assim permitindo a liberação do zinco ou cádmio da MT, esses metais livres estimulariam a expressão do gene da MT, levando assim a um maior nível de MT induzida (KATAKAI *et al.* 2001, SPAHL *et al.* 2003). Outro mecanismo de liberação do metal pelo NO seria pela destruição de ligações entre o zinco e os grupos tióis (ARAVINDA *et al.* 1999).

A iNOS deve ter um papel na carcinogênese pois no tumor é derivada das células tumorais, e não dos macrófagos, como demonstrado em carcinomas de tireóide em estudos de CHOE *et al.* (2003).

LEE *et al.*, (2003), demonstraram por análises de western blot e exames de imunohistoquímica, que a expressão de iNOS é significativamente maior em tecidos tumorais do pulmão quando comparados a tecidos não-tumorais, assim como um aumento da atividade do NO, observado por um significativo aumento da concentração de nitrito. MARROGI *et al* (2000) também estudando tipos de câncer do pulmão observou um nível alto de iNOS em células do carcinoma de pulmão e no adenocarcinoma, mas não no câncer de células escamosas (CEC).

BRENNAN *et al.* (2000), estudando imunohistoquimicamente a expressão de NOS II e NOS III em 48 casos de CBC de cabeça e pescoço, demonstraram que ambas enzimas estavam com a expressão reduzida quando comparados à pele normal, e que a produção de NO também estava reduzida no tumor, esse mecanismo ainda não foi esclarecido, mas pode ser uma explicação ao fato desse tipo de tumor raramente metastatizar.

Complementando o estudo, KAGOURA *et al*, (2001) estudaram a expressão de NOS II em câncer de pele, encontrando apenas um caso de CBC positivo para NOS II dos 16 casos estudados, enquanto que para o CEC: 12 dos 16 casos observados foram positivos, concluindo que a expressão do NOS II deve refletir a proliferação das células tumorais e que a heterogeneidade na distribuição da NOS II entre os cânceres de pele deve correlacionar com a variedade natural dos comportamentos biológicos das células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGEED, A. B. e AGRAWAL, K. C. *Activation of nuclear factor kappa-B: potential role in metallothionein mitogenic response.* **Cancer Res.**, v. 58, n. 11, p. 2335-2338, 1998.
- ALI, S.M.; OLIVO, M.; *Nitric oxide mediated photo-induced cell death in human malignant cells.* **Intern. J. Oncology**, v.22, p. 751-756, 2003.
- ALTMAN, D. G.; DE STAVOLA, B. L.; LOVE, S. B. e STPNIEWSKA, K. A. *Review of survival analysis published in cancer journals.* **Br. J. Cancer**, v. 72, p. 511-518, 1995.
- ANDREWS, G. K.; ADAMSON, G. D. e GEDAMU, L. *The ontogeny of the expression of murine metallothionein: comparison with the alpha-fetoprotein gene.* **Dev. Biol.**, v. 103, n. 2, p. 294-303, 1984.
- ANDREWS, P. A.; MURPHY, M. P. e HOWELL, S. B. *Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells.* **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 19, n. 2, p. 149-154, 1987.
- APOSTOLOVA, M.D.; CHERIAN, M.G.; *Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation,* **Cell. Mol. Biol.** (Noisy-le-grand) v. 46 p. 347-356, 2000.
- ARAVINDA KUMAR, C.T.; CEULEMANS, J. e DELEY, M. *Nitric oxide induces Zn²⁺ release from metallothionein by destroying zinc-sulphur clusters without concomitant formation of s-nitrosothiol.* **Biochem. J.**, v.344, p. 253-258, 1999
- BAHNSON, R. R.; BANNER, B. F.; ERNSTOFF, M. S.; LAZO, J. S.; CHERIAN, M. G.; BANERJEE, D. e CHIN J. L. *Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder.* **J. Urol.**, v. 146, n. 6, p. 1518-1520, 1991.
- BALES, ES et al. *Characterization of Molecular Defects in Xeroderma Pigmentosum Group C.* **Nat - Genet.**; v. 5, n. 4, p. 413-417, 1993.
- BECKMANS, J.S.; KOPPENOL, W.H. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly.* **Am. J. Physiol**, v. 271, p. 1424-1437, 1996
- BIER, B.; DOUGLAS-JONES, A.; TÖTSCH, M.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; BÖCKLER, W.; JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal breast tissue and benign and*

- malignant breast lesions. Breast Cancer Res. Treat.*, v. 30, n. 3, p. 213-221, 1994.
- BOWDEN, G.T.; *Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-b-light signaling, Nature Reviews*, v.4, p. 23-35, 2004.
- BRENNAN, P.A.; UNAR, T.; BOWDEN, J.; HOBKIRK, A.; SPEDDING, A.V.; CONROY, B.; ZAKI, G. e MACPHERSON, D.W. *Nitric oxide syntase expression is downregulated in basal cell carcinoma of dthe head and neck. British journal of oral and maxillofacial surgery*, v.38, p.633-636, 2000.
- BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. *Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease – a review, Arch. Dermatol. Res.* V. 290, p. 643-651, 1998.
- CARDOSO, S. V.; BARBOSA, H.M.; CANDELLORI I.M.; LOYOLA, A.M.; AGUIAR, M.C.F. *sPrognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. Virchows Arch*, v. 441, p. 174-178, 2002.
- CERNEA, C. R. e HOJIAIJ, F. C. *Fatores prognósticos*. In: PARISE JR, O. (Ed.) *Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos*. 1^a. Edição. São Paulo, p. 101-106, 2000.
- CHERIAN, M. G.; HUANG, P. C.; KLAASEN, C. D.; LIU, Y. P.; LONGFELLOW, D. G. e WAALKES, M. P. *National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis – Meeting report. Cancer Res.*, v. 53, p. 922-925, 1993.
- CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BOON-HUAT BAY; *Metalloyhioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis, Mutation Research*, v. 533, p. 201-209, 2003.
- CHIN, C.W.; FOSS, A.J.; STEVENS, A.; LOWE, J. *Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin carcinomas explain their differences in clinical behaviour. J. Pathol.* v. 200 pt. 3 p. 308-313, 2003.
- CHOE, W.; KIN, S.; HWANG, T.S.; LEE, S.S.; *Expression of inducible nitric oxide synthase in thyroid neoplasms: Immunohistochemical and molecular analysis. Pathology International*, v. 53, p. 434 – 439, 2003.
- CHUBATSU, L. S. e MENEHINI, R. *Metallothionein protects DNA from oxidative damage. Biochem. J.*, v. 291, pt. 1, p. 193-198, 1993.

- CHU, G. *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair.* **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 2, p. 787-790, 1994.
- CLARKSON, J. P.; ELMES, M. E.; JASANI, B. e WEBB, M. *Demonstration of immunoreactive metallothionein in human liver and ileum.* **J. Pathol.**, v. 142, suppl. A-44, 1984
- CONRAD, C.C.; GRABOWSKI, D.T.; WALTER, C.A.; SABIA, M.; RICHARDSON, A.; *Using MT /⁻ mice to study MT and oxidatuve stress.* **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 3, p. 447 -462, 2000.
- COURTADE, M.; CARRERA, G.; PATERNAIN, J. L.; MARTEL, S.; CARRE, PC.; FOLCH, J. e PIPY, B. *Metallothionein expression in human lung and its varying levels after lung transplantation. Toulouse Lung Transplantation Group.* **Chest**, v. 113, n. 2, p. 371-378, 1998.
- DAFFADA, A. A. I. e YOUNG, S. P. *Coordinated regulation of ceruloplasmin and metallothionein mRNA by interleukin-1 and cooper in HepG2 cells.* **Febs Lett.**, v. 457, n. 2, p. 214-218, 1999.
- DEMACHKI, S. e BACCHI, C. E. *Metalotioneínas e neoplasias humanas.* **J. Bras. Patol.** v. 34, n. 1, p. 48-54, 1998.
- DE FRANZO, AJ. *Principles and Management of Injuries from Chemical and Physical Agents.* In: GEORGIAD, GS et al. *Textbook of Plastic, Maxillofacial of Reconstructive Surgery.* Willian & Wilkins. p. 259-262, 1992.
- DEREN, M.D.O.; TUNCEL, M.D.A.; GENÇAGA, M.D.S.; GOKHAN, M.D.A.; ERDOGAN, M.D.B. *Disseminated Squamous Cell Carcinoma of the Skin,* **Dermatology Surgery**, v. 29, p. 1241-1243, 2003.
- DOUGLAS-JONES, A. G.; SCHMID, K. W.; BIER, B.; HORGAN, K.; LYONS, K.; DALLIMORE, N. D.; MONEYPENNY, J. e JASANI, B. *Metallothionein expression in duct carcinoma of the breast.* **Human Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 217-222, 1995.
- DUNN, M. A.; BLALOCK, T. L. e COUSINS, R. J. *Metallothionein.* **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 185, n. 2, p. 107-119, 1987.
- EBADI, M. e IVERSEN, P. L. *Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy.* **Gen. Pharmacol.**, v. 25, n. 7, p. 1297-1310, 1994.

- EBADI, M.; LEUSHEN, M. P.; EL-RAFAEY, H.; HAMADA, F. M. e ROJAS, P. *The antioxidant properties of zinc and metallothionein. Neurochem. Int.*, v. 29, n. 2, 1996.
- EID, H.; GÉCZI, L.; BODROGI, I.; INSTITORIS, E. e BAK, M. *Do Metallothionein affect the response to treatment in testis cancers? J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 124, n. 1, p. 31-26, 1998.
- ELDER, D.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; JOHNSON JR. B.; **Lever's Histopathology of the skin**; eighth edition, Lippincott. Raven pp. 1073, 1997.
- ELGOHARY, W. G.; SIDHU, S.; KREZOSKI, S. O.; PETERING, D. H. e BYRNES, R. W. *Protection of DNA in HL-60 cells from damage generated by hydroxyl radicals produced by reaction of H₂O₂ with cell iron by zinc-metallothionein. Chem. Biol. Interact.*, v. 115, n. 2, p. 85-107, 1998.
- ELMES, M. E.; CLARKSON, J. P. e JASANI, B. *Histological demonstration of immunoreactive metallothionein in rat and human tissues. EXS.*, v. 52, p. 533-537, 1987.
- EL RAFAEY, H.; EBADI, M.; KSZIYNSKI, C. A.; SWEENEU, J.; HAMADA, F. M. e HAMED, A. *Identification of metallothionein receptors in human astrocytes, Neurosci. Lett.*, v. 231, n. 3, 131-134, 1997.
- FENSELAU C., FABRIS D., HATHOUT Y., *Stoichiometry in zinc ion transfer from metallothionein to zinc finger peptides. Inter. J. of Mass Spectrometry*, v. 204, n. 16, 2001.
- FISCHER E. H. e DAVIE, E. W. *Recent excitement regarding metallothionein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, n. 7, p. 3333-3334, 1998.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. *Óxido nítrico: osimples mensageiro percorrendo a complexidade, Metabolismo, sínteses e funções. Rer. Ass. Méd. Brasil*, v.46, n.3, p. 265-271, 2000.
- FOLCH, J.; ORTEGA, A.; CABRÉ, M. e PATERNÁIN, J. L. *Urinary levels of metallothioneins and metals in subjects from a semi-industrialized area in Terragona province of Spain. Biol. Trace Elem. Res.*, v. 63, n. 2, p. 113-121, 1998.
- FRESNO, M.; WU, W.; RODRIGUEZ, J. M. e NADJI, M. *Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study. Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, v. 423, n. 3, p. 215-219, 1993.

- GILBERT, S. F. *Biologia do Desenvolvimento*. 2^a. Edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 578, 1995.
- GONCHAROVA, E. I. e ROSSMAN, T. G. *A role for metallothionein and zinc in spontaneous mutagenesis*. **Cancer Res.**, v. 54, n. 20, p. 5318-5323, 1994.
- GOULDING, H.; JASANI, B.; PEREIRA, H.; REID, A.; GALEA, M.; BELL, J. A.; ELSTON, C. W. *Metallothionein expression in human breast cancer*. **Br. J. Cancer**, v. 72, n. 4, p. 968-972, 1995.
- GOYER, R. A.; HAUST, M. D.; CHERIAN, M. G. *Cellular localization of metallothionein in human term placenta*. **Placenta**, v. 13, n. 4, p. 349-355, 1992.
- GRANSTEIN, R.D. *Photoimmunology*. **Semin. Dermatol.** Mar; v. 9, n. 1, p.16-24, 1990.
- GREEN, H.J., HUGSON, R.L., ORR, G.W., RANNEY, D.A. *Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in prograssive exercise*. **J Appl Physiol.**v.54, p. 1032-1038, 1983.
- GRUIJ, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB*. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 356-366, 2000.
- HAERSLEV, T.; JACOBSEN, G. K.; NEDERGAARD, L.; ZEDELER, K. *Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases*. **Pathol. Res. Pract.**, v. 190, n. 7, p. 675, 681, 1994.
- HAERSLEV, T.; JACOBSEN, G. K. e ZEDELER, K. *The prognostic significance of immunohistochemically detectable metallothionein in primary breast carcinomas*. **APMIS**, v. 103, n. 4, 1995.
- HAGESAWA, T.; KANEKO, F.; NIWA, Y. *Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin serum and liver following UVB irradiation in mice*. **Life Sci**. v.50, p. 1893-1903, 1996.
- HAINAUT, P. e MILNER, J. *A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor supressor protein p53*. **Cancer Res.**, v. 53, n. 8, p. 1739-1742, 1993.
- HAMER, D. H. *Metallothionein*. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 913-951, 1986.
- HANADA, K.; SAWAMURA, D.; TAMAI, K.; BABA, T.; HASHIMOTO, I.; MIURA, N. e NAGANUMA, A. *Novel function of metallothionein in*

- photoprotection: metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet B injury in the skin. J. Invest. Dermatol.*, v. 111, n. 4, p. 582-585, 1998a.
- HANADA, K.; SAWAMAURA, D.; HASHIMOTO, I.; KIDA, K.; NAGANUMA, A. Epidermal proliferation of skin in metallothionein-null mice, **J. Invest. Dermatol**, v. 110, n. 3, p. 259-262, 1998b.
- HANADA, K. *Photoprotective role of MT in UV-injury MT-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B. Jornal Dermatological Science*, v. 23, s. 1, p. 51-56, 2000
- HERNÁNDEZ, J, CARRASCO, J; GIRALT, M.; BLUETHMANN, H.; LEE, D. K.; ANDREWS, G. K. e HIDALGO, J. *Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and interleukin-6. Citokyne*, v. 12, n. 6, p. 791-796, 2000.
- HISHIKAWA, Y.; ABE, S.; KINUGASA, S.; YOSHIMURA, H.; MONDEN, N.; IGARASHI, M.; TACHIBANA, M. e NAGASUE, N. *Overexpression of metallothionein correlates with chemoresistance to cisplatin and prognosis in esophageal cancer. Oncology*, v. 54, n. 4, p. 342-347, 1997.
- HISHIKAWA, Y.; LOJI, T.; DHAR, D. K.; KINUGASA, S.; YAMAGUCHI, M. e NAGASUE, N. *Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br. J. Cancer*, v. 81, n. 4, p. 712-720, 1999.
- HIURA, T.; KHALID, H.; TOKUNAGA, Y.; YASUNAGA, A. e SHIBATA, S. *Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival. Cancer*, v. 83, n. 11, p. 2361-2369, 1998.
- HUSSAIN, S.; SLIKKER, W. J. e ALI, S. F. *Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. Neurochem. Int.*, v. 29, n. 2, p. 145-152, 1996.
- IOACHIM, E. E.; GOUSSIA, A. C.; AGNANTIS, N. J.; MACHERA, M.; TSIANOS. E. V. e KAPPAS, A. M. *Prognostic evaluation of metallothionein expression in human colorectal neoplasms. J. Clin. Pathol.*, v. 52, n. 12, p.876-879, 1999.

- JACOB, C.; MARET, W. e VALLEE, B. L. *Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3488-3494, 1998.
- JAHROUDI, N.; FOSTER, R.; PRICE-HAUGHEY, J.; BEITEL, G. e GEDAMU, L. *Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes.* **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 11, p. 6506-6511, 1990.
- JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Significance of metallothionein overexpression in human tumors.* **Histopathology**, v. 31, n. 3, p. 211-214, 1997.
- JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THONSEN, L.L. et al. *Roles of nitric oxide in tumor growth.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4392-4396, 1995.
- JIANG, L. J.; MARET, W. e VALLEE, B. L. *The ATP-metallothionein complex.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 16, p. 9146-9149, 1998a.
- JIANG, L. J.; MARET, W. e VALLEE, B. L. *The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3483-3488, 1998b.
- KÄGI, J. H. e SCHÄFFER, A. *Biochemistry of metallothionein.* **Biochemistry**, v. 27, n. 23, p. 8509-8515, 15, 1988.
- KAGOURA, M.; MATSUI, C.; TOYODA, M.; MOROHASHI, M. *Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancers.* **J. Cutaneous Pathology**, v.28, n.9, p. 476-481, 2001.
- KATAKAI, K.; LIV, J.; NAKAJINA, K.; KEEFER, L.K.; WOOLKES, M.P. *Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc band to MT,* **Toxicology Letters**, v. 119, p. 103-108, 2001.
- KATO, S.; ESUMI, H.; HIRANO, A.; KATO, M.; ASAYAMA, K. OHAMA, E.; *Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein.* **Acta Neuropathol.** V.105, p.333-340, 2003.
- KATSURAGI, H.; HASEGAWA, A. e SAITO, K. *Distribution of metallothionein in cigarette smokers and non-smokers in advanced periodontitis patients.* **J. Periodontol.**, v. 68, n. 10, p. 1005-1009, 1997.

- KELLEY, S. L.; BASU, A.; TEICHER, B. A.; HACKER, M. P.; HAMER, D. H. e LAZO, J. S. *Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs.* **Science**, v. 241, n. 4874, p. 1813-1815, 1988.
- KOBAYASHI, S.; HIROTA, Y.; SAYATO-SUZUKI, J.; TAKEHAMA, M.; NISHIMURA, H.; NISHIMURA, N. e TOHYAMA, C. *Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts.* **Photochem. Photobiol.**, v. 59, n. 6, p. 650-656, 1994.
- KONDO, Y.; RUSNAKI, J. M.; HOYUT, D. G.; SETTINERI, C. E.; PITT, B. R. e LAZO, J. S. *Enhanced apoptosis in metallothionein-null cells.* **Mol. Pharmacol.**, v. 52, n. 2, p. 195-201, 1997.
- KONDO, Y.; WOO, E. S.; MICHALSKA, A. E.; CHOO, K. H. e LAZO, J. S. *Metallothionein-null cells have increased sensitivity to anticancer drugs.* **Cancer Res.**, v. 55, n. 10, p. 2021-2023, 1995.
- KRIPKE, M.L. *Carcinogenesis: Ultraviolet Radiation.* In: FITZPATRICK, TB et al. **Dermatology in General Medicine.** McGraw Hil.; p. 797-804, 1993.
- KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; SCHMIDT, T.; ZENKE, F.T.; DASTING, I.; WESENER, J.R.; BETTERMANN, H.; BREUNING, K.D.; BACHOFEN, V. *Nitric oxide destroys zinc-sulfur cluster inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC 9.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V. 200, p. 1105-1110, 1994.
- KUMARI, M. V.; HIRAMATSU, M. e EBADI, M. *Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II.* **Free Radic. Res.**, v. 29, n. 2, p. 93-101, 1998.
- KUO, T. e LO, S. K. *Immunohistochemical metallothionein expression in thymoma: correlation with histological types and cellular origin.* **Histopathology**, v. 30, n. 3, p. 243-248, 1997.
- LEE, T.W.; CHEN, G.G.; XU, H.; YIP, J.H.Y.; CHAK, E.C.W.; MOK, T.S.K. e YIM, A.P.C. *Differential expression of inducible nitric oxide syntase and peroxisome proliferators-activated receptor gamma in non-small cell lung carcinoma.* **European Journal of cancer.** V. 39, p. 1296-1301, 2003.
- LOACHIN, E.; ASSIMAKOPOULOS, D.; PESCHOS, D.; ZISSI, A.; SKEVAS, A.; AGNANTIS, N.J. *Immunohistochemical expression of MT in benign*

- pre-malignant and malignant epithelium of the larynx: correlation with p53 and proliferative cell nuclear antigen. Pathol. Res. Pract.* V. 195, p. 809-814, 1999.
- MANUEL, Y.; THOMAS, Y. e PELLEGRINI, O. Metallothionein and tissue damage. **IARC Sci. Publ.**, v. 118, p. 231-237, 1992.
- MATSUI, M. S. & DELEO, V. A.; *Photocarcinogenesis by ultraviolet A and B. in Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance* (ed. Mukhtar, H.; CRC Press, Boca Raton).p. 21–30, 1995.
- MARGOSHES, J. H. e VALLEE, B. L. A. A cadmium protein from equine kidney cortex. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 69, p. 4813-4814, 1957.
- MARROGI, A.J.; TRAVIS, W.D.; WELSH, J.A.; et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. **Clin. Cancer Res.** V. 6, p. 4739-4744, 2000.
- MCCLUGGAGE, W. G.; MAXWELL, P.; HAMILTON, P. W. e JASANI, B. High metallothionein expression is associated with features predictive of aggressive behavior in endometrial carcinoma. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 51-55, 1999.
- MISRA, R.R.; HOCHADEL, J.F.; SMITH, G.T.; COOK, J.C.; WAALKES, M.P.; WINK,D.A. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. **Chem. Res. Toxicol.** V. 9, p. 326-332, 1996.
- MIURA, T.; MURAOKA, S. e OGISO, T. Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. **Life Sci.**, v. 60, n. 21, p. 301-309, 1997.
- MURAMATSU, Y.; HASEGAWA, Y.; FUKANO, H.; OGAWA, T.; NAMUBA, M.; MOURI, K.; FUJIMOTO, Y.; MATSUURA, H.; TAKAI, Y. e MORI, M. Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 257-264, 2000.
- MURATA, M.; GONG, P.; SUZUKI, K. e KOIZUMI, S. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. **J. Cell Physiol.**, v. 180, n. 1, p. 105-113., 1999.

- NARTEY, N. O.; CHERIAN, M. G. e BANERJEE, D. *Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development. Pathology*, v. 19, n. 3, p. 233-238, 1987b.
- NARTEY, N.; CHERIAN, M. G. e BANERJEE, D. *Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. Am. J. Pathol.*, v. 129, n. 1, p. 177-182, 1987a.
- NATH, R.; KAMBADUR, R.; GULATI, S.; PALIWAL, V. K. e SHARMA, M. *Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. Crit. Rev. Food Science Nutr.*, v. 27, n. 1, 1988.
- NEWELL, B.; BEDLOW, A.J.; CLIFF, S. DRYADALE, S.B.; STANTON, A.W.B.; MORTIMER, P.S.; *Comparison of the microvasculature of basal cell carcinoma and actinic keratosis using intravital microscopy and immunohistochemistry. Br. J. Dermatology*, v.149, p. 105-110, 2003.
- NGUYENT; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L. et al. *DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 3030-3034, 1992
- ÖFNER, S.; MAIER, H.; RIEDMANN, B.; BAMMER, T.; RUMER, A.; WINDE, G.; BÖCKER, W.; JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal adenocarcinoma: correlation with tumor stage and patient survival. Virchows Arch.*, v. 425, n. 5, p. 491-497, 1994.
- OSHIO, G.; IMAMURA, T.; OKADA, N.; WAN, Z.; YAMAKI, K.; KYOGOKU, T.; SUWA, H.; YAMABE, H. e IMAMURA, M. *Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 122, n. 6, p. 351-355, 1996.
- ORLOWSKI, C. e PIOTROWSKI, J. K. *Metal composition of human hepatic and renal metallothionein. Biol. Trace Elem Res.*, v. 65, n. 2, p. 133-141, 1998.
- OYAMA, T.; TAKE, H.; HIKINO, T.; LINO, Y. e NAKAJIMA, T. *Immunohistochemical expression of metallothionein in invasive breast cancer in relation to proliferative activity, histology and prognosis. Oncology*, v. 53, n. 2, p. 112-117, 1996.

- PALMITER, R. D. *The elusive function of metallothionein*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 15, p. 8428-8430, 1998.
- PATEL, N.P. et al. *Properties of Topical Sunscreen Formulations*. **J. Dermat. Surg. Onc.**; v.18, p. 316-319, 1992.
- PISCATOR, M. *On cadmium in normal human kidneys together a report on the isolation of metallothionein for livers of cadmium-exposed rabbits*. **Nord. Hyg.**, v. 45, p. 76-82, 1964.
- PITT, B. R.; SCHWARZ, M.; WOO, E. S.; YEE, E.; WASSARLOOS, K.; TRAN, S.; WANG, W.; MANNIX, R. J.; WATKINS, S. A.; TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; KAGAN, V. E. e LAZO, J. S. *Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 4, p. 856-865, 1997.
- PRASAD, A. S. *Role of metallothionein in human health*. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, n. 3, p. 357-358, 1992.
- PULIDO, P.; KÄGI, J. H. e VALLEE, B. L. *Isolation and some properties of human metallothionein*. **Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 1768-1777, 1966.
- QUAIFE, C. J.; FINDLEY, S. D.; ERICKSON, J. C.; FROELICK, G. J.; KELLEY, E. J.; ZAMBROWICK, B. P. e PALMITER, R. D. *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7250-7259, 1994.
- QUESADA, A. R.; BYRNES, R. W.; KREZOSKI, S. O. e PETERING, D. H. *Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 2, p. 241-250, 1996.
- REEVE, V.E.; NISHIMURA, N.; BOSNIC, M.; MICHALSKA, A.E.; CHOO, K.H.A. *Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice*. **Immunology**, v. 100, n.3, p. 399-404, 2000.
- RODILLA, V.; MILES, A. T.; JENNER, W. e HAWKSWORTH, G. M. *Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction*. **Chem. Biol. Interact.**, v. 115, n. 1, p. 71-83, 1998.

- ROSSEN, K.; HAERSLEV, T.; HOU-JENSEN, K. e JACOBSEN, G. K. *Metallothionein expression in basaloid proliferations overlying dermatofibromas and in basal cell carcinomas*. **Br. J. Dermatol.**, v. 136, n. 1, p. 30-34, 1997.
- SAKURAI, A.; HARA, S.; OKANO, N.; KONDO, Y.; INOUE, I. e IMURA, N. *Regulatory role of metallothionein in NF-kappa-B activation*. **FEBS Lett.**, v. 455, n. 1, p. 55-58, 1999.
- SALDANHA, G.; FLETCHER, A.; SLATER, D.N. *Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update*, **Br. J. Dermatology**, v.148, p. 195-202, 2003.
- SANDER, C.S.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J.J.; *Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer*. **Brit. J. Dermatology**, v. 148, p. 913-922, 2003.
- SCHMID, K. W.; ELLIS, I. O.; GEE, J. M. W.; DARKE, B. M.; LEES, W. E.; KAY, J.; CRYER, A.; STARK, J. M.; HITTMAIR, A.; ÖFNER, D.; DÜNSER, M.; MARGREITER, R.; DAXENBICHLER, G.; NICHOLSON, R. I.; BIER, B.; BÖCKER, W. e JASANI, B. *Presence and possible significance of immunohistochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast*. **Virchows Arch. A Pathol. Anat.**, v. 422, n. 2, p. 153-159, 1993.
- SCHMIDT, C. J. e HAMER, D. H. *Cell specificity and an effect of ras on human metallothionein gene expression*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 10, p. 3346-3350, 1986.
- SCHWARZ, M.A.; LAZO, J.S.; YALOWICH, J.C.; ALLEN, W.P.; WHITMORE, M.; *Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA damaging effects of nitric oxide*. **Pharmacology**, v. 92, p. 4452-4456, 1995.
- SILVA, M.A.; *Carcinogênese no cancer da pele*. **Dermatologia atual**, v.6, n. 2, p. 13-17, 2000.
- SIU, L. L.; BANERJEE, D.; KHURANA, R. J.; PFLUEGER, R.; TANNOCK, I. F. e MOORE, M. J. *The prognostic role of p53, metallothionein, p-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma*. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, n. 3, p. 559-565, 1998.

- SHUKLA, V. K.; ARRYA, N. C.; PITALE, A.; PANDEY, M.; DIXIT, V. K.; REDDY, C. D. e GAUTMAM, A. *Metallothionein expression in carcinoma of the gallbladder*. **Histopathology**, v. 33, n. 2, p. 154-157, 1998.
- SPAHL, D.U.; BERENDJI-GRUN, D.; SUSCHEK, C.V. ; KOLB-BACHOFEN, V.; K.D. KRONCKE, K.D. *Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: Nuclear metallothioneintranslocation and intranuclear Zn²⁺ release*. **PNAS**, v. 100, n.24, p.13952-13957, 2003
- SUGITA, K.; YAMAMOTO, O.; ASCHI, M. Immunohistochemical analysis of MT expression in malignant melanoma in Japanese patients. *The Am. J. Dermatopathology*, v. 23, n.1, p. 29-35, 2001.
- SUHY, D. A.; SIMON, K. D.; LINZER, D. I. H. e O'HALLORAN, T. V. *Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extrem zinc deprivation*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 14, p. 9183-9192, 1999.
- SUNDELIN, K.; JADNER, M. NORBERG-SPAACK, L.; DAVIDSON, Å. e HELLQUIST, H. B. *Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue*. **Eur. J. Cancer**, v. 33, n. 11, p. 1860-1864, 1997.
- SUZUKI, T.; UEYAMA, T.; OHMA, C.; YAMANAKA, H.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, K. e KIMURA, M. *Immunohistochemical study of metallothionein in normal and benign prostatic hyperplasia of human prostate*. **Prostate**, v. 19, n. 1, p. 35-42, 1991.
- STUEHR DJ, CHO HJ, KWON NS, WEISE MF, NATHAN CF. *Purification and characterization of the cytokine-inducedmacrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containingflavoprotein*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 7773-7777, 1991.
- STRIETH, S., HARTSCHUH, W., PILZ, L., FUSENIG, N.E. *Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinoma of human skin*. **Br J Cancer**; v. 82, p.591–600, 2000.
- TAMURA, Y.; WY SOCKI, G. P. e CHERIAN, M. G. *Immunohistochemical localization of metallothionein in the developing cadmium-injected rats*. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 1, p. 49-53, 1999.

- TEMPLETON, D. M. e CHERIAN, M. G. *Toxicological significance of metallothionein*. **Methods Enzimol.**, v. 205, p. 11-24, 1991.
- THOMAS, J. P.; BACHOWSKI, G. J. e GIROTI, A. W. *Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 884, n. 3, p. 448-461, 1986.
- THONSEN, L.L. e MILES, D.W. *Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from human tumors*. **Cancer Metastasis Rev.** v. 17, p. 107-118, 1998.
- THORNALLEY P. J. e VASÁK, M. *Possible role for metallothionein against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 827, n. 1, p. 36-44, 1985.
- TILLI, C.M.L.J.; RAMAEKERS, F.C.S.; BROERS, J.L.V.; HUTCHISON, C.J.; NEUMANN, H.A.M.; *Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma*. **British J. Dermatology**, v. 148, p. 102-109, 2003.
- UOZAKI, H.; HORIUCHI, H.; ISHIDA, T.; IMAMURA, T. e MACHINAMI, R. *Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis*. **Cancer**, v. 79, n.12, p. 2336-2344, 1997.
- VAN ANTWERP, D. J.; MARTIN, S. J.; KAFRI, T.; GREEN, D. R. e VERMA, I. M. *Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappa-B*. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 787-789, 1996.
- VAN DER OORD, J. J.; SUNARDHI-WIDYAPUTRA, S. ; VAN DAMME, B. e DE LEY, M. *Monoclonal antibody to liver metallothionein: a novel marker for myoepithelial cells*. **Pathol. Res. Pract.**, v. 189, n. 10, p. 1187-1190, 1993.
- VAN DER OORD, J. J. e DE LEY, M. *Distribution of metallothionein in normal and pathological human skin*. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 286, n. 1, p. 62-68, 1994.
- VURAL, P.; ERZENGIN, D.; CANBAZ, M.; SELÇUKI, D. *Nitric oxide and endothelin-1,2 in actinic keratosis and basal cell carcinoma: changes in nitric oxide/endothelin ratio*. **Int. J. Dermatology**, v. 40, p. 704-708, 2001.

- WANG, G. W.; SCHUSCHKE, D. A. e KANG, Y. J. *Metallothionein-overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H₂O₂ toxicity*. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 1, pt. 2, p. 167-175, 1999.
- WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W. e MITCHELL, J.B. *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer*. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 711-721, 1998.
- YAMAMOTO, M.; TSUJINAKA, T.; SHIZAKI, H.; DOKI, Y.; TAMURA, S.; INOUE, M.; HIRAO, M. e MONDEN, M. *Metallothionein expression correlates with the pathological response of patients with esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation therapy*. **Oncology**, v. 56, n. 4, p. 332-337, 1999.
- YANO, K., OURA, H., DETMAR, M. *Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage*. **J Invest Dermatol**; v.118, p.800–805, 2002.
- YOUNG-JIN L., SUNG-EUN C., JEE-HO C., KYOUNG-JEH S.,JAE-HYON B., SANG-HWAN D., DONG-SUP L. *Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of acute herpes zoster*. **J. Dermatological Sci.** v. 29, p. 201-205, 2002.
- ZELGER, B.; HITTMAIR, A.; SCHIR, M.; ÖFNER, D.; FRITSCH, P. O.; BÖCKER, W.; JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma*. **Histopathology**, v. 23, n. 3, p. 257-263, 1993.
- ZENG, J.; HEUCHEL. R.; SCHAFFNER, W. e KÄGI, J. H. *Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc-finger containing factor Sp1*. **FEBS Lett.**, v. 279, n. 2, p. 310, 312, 1991a.
- ZENG, J.; VALLEE, B. L. e KÄGI, J. H. *Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 22, p. 9984-9988, 1991b.
- ZHANG, R.; ZHANG, H.; WEI, H. e LUO, X. *Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis*. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 19, n. 1-2, p. 95-97, 2000.

- ZHANG, X. H.; JIN, L.; SAKAMOTO, H. e TAKENAKA, I. *Immunohistochemical localization of metallothionein in human prostate cancer*. **J. Urol.**, v. 156, n. 5, p. 1679-1681, 1996.
- ZHANG, X. H.; SATOH, M.; NISHIMURA, N.; SUZUKI, J. S.; SONE, H.; AOKI, Y. e TOHYAMA, C. *Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene*. **Cancer Res.**, v. 58, n. 18, p. 4044-4046, 1998.
- ZHANG, X. H. e TAKENAKA, I. *Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal carcinoma*. **Br. J. Urol.**, v. 81, n. 1, p. 9-13, 1998.

**CAPÍTULO I:
EXPRESSÃO DA METALOTIONEINA
EM NEOPLASIAS CUTÂNEAS
ASSOCIADAS À IRRADIAÇÃO
ACTÍNICA**

RESUMO

O carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular cutâneo (CEC) são os cânceres de pele mais freqüentes na população brasileira. Têm sua patogenia vinculada aos efeitos genotóxicos e mutagênicos da exposição à radiação actínica, em especial aos raios ultravioletas na faixa 290 a 320 nm de comprimento de onda. As metalotioneínas (MT) são proteínas de baixo peso molecular com alta afinidade para metais pesados, cuja função intra celular está associada a detoxificação de metais pesados e radicais livres. Sua ação protetora à agressão actínica tem sido mostrada recentemente em modelos experimentais. Por outro lado, sua sobreexpressão em diferentes tipos de tumores tem sido associada a maior agressividade e pior prognóstico. A proposta deste estudo foi avaliar a expressão de MT em neoplasias cutâneas associadas à irradiação actínica. Foram utilizados para este fim 18 casos de CBC, cinco casos de CEC e seis fragmentos de pele normal não agredida. Para esta análise, empregamos a técnica da streptavidina-biotina-peroxidase e o anticorpo primário anti-MT. Os resultados obtidos mostraram que na pele normal, a marcação foi situada na camada basal do epitélio. Esta marcação estendeu-se a camadas suprabasais nos epitélios das peles normais agredidas pela luz solar, próximas ao tumor. Seis casos de CBC (33%) foram negativos, enquanto que todos os casos de CEC foram imunoreativos para MT. Apenas um caso de CEC (20%) apresentou fraca expressão, comparados a 8 casos de CBC (44%). No entanto, 80% dos casos de CEC (4/5) apresentaram forte marcação, contrapondo-se a 22% de CBC com o mesmo padrão de marcação (4/18). A média de ID para o CBC foi de $0,69 \pm 0,48$ enquanto que para o CEC foi de $1,55 \pm 0,77$. Os resultados mostram que a expressão de MT é mais significativamente associada ao CEC, sugerindo uma associação mais estreita com a agressividade tumoral.

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) are the most frequent skin cancer in Brazilian people. Its pathogeny is linked to the genetic effects of actinic radiation exposure, specially to the ultraviolet rays ranging from 290 to 320 nm wavelength. Metallothionein (MT) are low molecular weight proteins with high affinity for heavy metal, whose intracellular function is related to heavy metals and free radical detoxification. MT's actinic aggression protective action have been showed in others studies. On the other hand, its overexpression in different kind of tumors have been related to major aggressiveness and worst prognostic. The proposal of this study was to evaluate the expression of MT in skin cancer associated to actinic radiation. Eighteen BCC cases, five SCC and six normal skin fragments were used for this purpose. To analyze, we used the streptavidin – biotin – peroxidase technique and anti-MT primary antibody. The results showed that in the normal skin the marking situated in the epithelium basal layer. This marking extended to suprabasal layer of exposed to sun light skin (ES), near the tumor. Six cases of BCC (33%) was absent MT immunoreactivity, while all of SCC showed strong MT immunostaining . Only one SCC case (20%) and eight BCC case (44%) showed low MT expression. However, 80% of SCC cases (4/5) had intense staining, while only 22% of BCC cases (4/18) showed the same staining pattern. The average of ID for BCC was $0,69 \pm 0,48$, and for SCC was $1,55 \pm 0,77$. The results demonstrate that MT expression is related to SCC, suggesting a closely association with aggressive tumor.

INTRODUÇÃO

O câncer de pele tem sua patogenia vinculada a exposição crônica da pele a irradiação actínica. Os três tipos de câncer mais freqüentemente associados à exposição solar são o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular (definidos como câncer de pele não melanoma) e o melanoma maligno ⁶.

O câncer de pele não melanoma é o tipo de câncer mais freqüente na população brasileira. Segundo as estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), dos 402.190 novos casos previstos para o ano de 2003, o câncer de pele não melanoma será responsável pelo diagnóstico de 82.155 novos casos.

A radiação ultravioleta B (UVB), de comprimento de onda de 290 a 320nm, tem ação fotocarcinogênica direta. Atua como potente indutora e promotora de carcinogênese em camundongo, levando à alteração estrutural no DNA humano, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Provoca alterações mutagênicas pela formação de dímeros de timina as quais estão implicadas no desenvolvimento de tumores, em conjunção com falhas nos mecanismos de reparo do DNA ¹⁷.

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno que se origina dos queratinócitos células basais da epiderme e seus apêndices. Possui malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos. Seus componentes celulares se assemelham às células indiferenciadas e imaturas do estrato basal. Ocorre basicamente na face, usualmente como lesões únicas. Aproximadamente 40% dos pacientes que tiveram CBC terão um ou mais casos dentro de 10 anos ¹³.

O carcinoma espinocelular cutâneo (CEC) é uma proliferação maligna do queratinócito da epiderme, constituído por células epidermóides atípicas, cuja microarquitetura lembra aspectos da epiderme ¹⁶. O CEC pode se originar "de novo" ou a partir de uma lesão precursora como a queratose actínica. Embora o CEC seja menos comum que o CBC, a relação entre exposição solar e neoplasia é mais direta no CEC que no CBC ³⁰. Os dois tipos de tumores não-melanoma,

CBC e CEC podem ser invasivos, mas apenas o CEC possui grande potencial para emitir metástase ¹³.

A metalotioneína (MT), proteína descrita na década de 50, tem sido estudada por suas propriedades associadas a detoxificação de substâncias genotóxicas (metais pesados e espécies reativas do oxigênio), à estocagem e regulação dos níveis celulares de zinco e por uma provável função de inibição da apoptose ¹⁹⁻²⁶. Caracterizam-se pelo baixo peso molecular (6 KD a 7 KD), sendo constituídas nos mamíferos por 61 ou 62 resíduos de aminoácidos, com presença marcante de cisteína (23% a 33%) e ausência de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Possuem também alto conteúdo de metais pesados (4 a 12 átomos por mol), ligados covalentemente a apoproteína pelos grupos sulfúricos (tióis) dos resíduos de cisteína.

Em função dessas propriedades, a metalotioneína tem sido alvo de estudo em oncologia, dadas as suas funções biológicas diversas e sua possível correlação com a carcinogênese, quando teria um papel protetor ⁸⁻²⁸⁻⁵¹, e com o prognóstico em câncer humano, em que a superexpressão da proteína tem sido associada a comportamentos mais agressivos ¹⁻³⁵⁻²⁷⁻³⁻⁴⁰⁻¹⁸⁻³⁶⁻¹²⁻¹⁵⁻³⁷⁻⁵¹⁻²³²⁵⁻³¹⁻³⁹⁻⁴⁴⁻¹¹⁻²⁴⁻⁴²⁻⁴⁷⁻³³⁻⁷.

Nas neoplasias malignas derivadas de linhagens celulares ectodérmicas, da mesoderme intermediária e lateral, a superexpressão de MT relaciona-se a um pior prognóstico; em tumores derivados da endoderme ou da mesoderme paraxial o aumento da expressão da proteína estaria relacionado a melhor prognóstico ²⁵.

Poucos trabalhos têm procurado estudar o papel da MT em modelos de agressão actínica, seu papel na carcinogênese actínica e o significado de sua expressão tumoral. Recentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a presença de MT induzida pelo Cd⁺⁺ aumenta a resistência a irradiação actínica, pela observação da diminuição de células apoptóticas e de células marcadoras da agressão solar (*sunburn cells*)²⁰⁻²¹⁻²²⁻²⁸⁻³⁸. Todavia, pouco se conhece sobre sua expressão em cânceres associados a irradiação actínica ³⁹.

Desta forma, o objetivo desse trabalho é estudar a expressão imuno-histoquímica da MT em CBC e CEC e comparar os dados obtidos com a análise da imuno-histoquímica em fragmentos de pele normal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para esta pesquisa, 18 casos de CBC sólido e cinco casos de CEC, obtidos através de biópsias excisionais indicadas para diagnóstico das lesões, e seis fragmentos de pele normal não expostas à radiação solar, obtidos por meio de cirurgias plásticas de redução de abdômen. Todo material foi coletado com autorização prévia dos pacientes, por meio da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Para a evidenciação imuno-histoquímica da MT foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram obtidos cortes histológicos de três micrômetros de espessura a partir de fragmentos teciduais das lesões, fixados em formalina e incluídos em parafina, montados em lâminas de vidro, previamente recobertas com organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os cortes foram desparafinados em duas passagens por soluções de xilol, realizadas à temperatura ambiente e à 37°C por 20 e 30 minutos, respectivamente. Os cortes histológicos foram hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%) e submetidos à solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol, para remoção do pigmento formólico. Após uma lavagem rápida em banhos de água destilada, os cortes foram submetidos a tratamento com tampão EDTA (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid), 1 M, em ambiente de microondas, à potência máxima, em três ciclos de cinco minutos cada, com dois minutos de descanso à temperatura ambiente entre cada ciclo, para recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados.

Após resfriamento, alcançando o equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena. Previamente à incubação do anticorpo primário, os cortes foram imersos por 10 minutos em solução bloqueadora de biotina endógena (Dako, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, foram lavados em água corrente por 5 minutos e incubados com o anticorpo monoclonal anti-MT (Clone E9, Dako, Carpinteria, CA, USA) em diluição de 1:300, por 18 horas. Seguindo-se a lavagem com tampão PBS, foi incubado com anticorpo secundário biotilado (kit

StrAviGen® MultiLink para fosfatase alcalina, Biogenex, San Ramon, CA, USA) na diluição de trabalho de 1:800 e o complexo estreptavidina-biotina (Dako, Carpinteria, CA, USA), em diluição de 1:300, ambos em câmara úmida, por 30 minutos. Entre essas etapas, os cortes foram lavados por solução de tampão PBS, pH 7,4, em três banhos de 10 minutos.

A revelação da reação foi desenvolvida a partir de solução cromógena contendo 12 mg de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 120 ml de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, passada em filtro duplo. Após a filtração, adicionou-se 1,2 ml de peróxido de hidrogênio a 10 volumes, incubando-se os cortes nessa solução durante três minutos. Em seqüência, os cortes foram lavados em água corrente, por cinco minutos e então, contra-corados pela hematoxilina de Mayer, por 3 minutos. Seguiu-se desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanizados em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Foram utilizados controles positivos, empregando-se fragmentos de carcinomas lobular e ductal de glândulas mamárias, conhecidamente positivos para MT. O controle negativo foi obtido a partir de omissão do anticorpo primário.

Para a análise da imuno-marcação da MT nas massas tumorais, todos os cortes foram examinados com aumento de 40x (aumento original). Em cada lâmina foram considerados 50% dos campos, incluídos de forma aleatória. O procedimento consistiu da verificação da percentagem de área tumoral corada pela marcação com MT⁵. Para esse fim, foi utilizado um “software” para análise de imagens (HL-Image++97I, Western Vision – Flash Bus MV Lite, Plus, Pro, USA), produzidas por microscopia de luz visível (Olimpus BH2, Japan) e capturadas por câmera de vídeo (Sony, CCD IRIS, Japan), utilizando o recurso “Image Thresholding”⁴⁻¹⁰.

Estabeleceu-se um índice qualitativo de intensidade e quantitativo de percentual de marcação tumoral, a partir dos quais formulou-se um índice semi-quantitativo de intensidade e distribuição da marcação (ID). Foram considerados para o índice qualitativo os parâmetros de intensidade de marcação fraca, moderada e forte, baseados no padrão de marcação identificado na pele normal considerado como moderado. Assim, para a obtenção do ID, a marcação fraca

teve o seu percentual de área corada multiplicada por um, a marcação moderada teve seu valor multiplicado por dois, e aquela considerada forte teve o valor da área marcada multiplicada por três. No final, obteve-se uma escala de ID cujo valor máximo foi três. Casos nos quais o ID foi menor ou igual a 0,3 foram considerados negativos; aqueles que alcançaram ID foi maior que 0,3 e menor que 1 foram considerados de expressão FRACA da MT, e aqueles com índice maior ou igual a 1 foram considerados de expressão FORTE³³⁻¹². As médias de cada grupo foram comparadas levando-se em conta o índice ID, e também considerando apenas a área de marcação, desconsiderando a intensidade encontrada. A área de marcação no epitélio da pele não exposta foi comparado com o epitélio adjacente a área tumoral, para a comparação entre os epitélios sortearam-se quatro laminas de PN e quatro laminas de câncer não melanoma. Em cada caso foram avaliados cinco campos também sorteados procuramos assim identificar se houve diferença de marcação entre a pele exposta (PE) e não exposta, considerada pele normal (PN).

As comparações entre as médias do índice de marcação, e entre as médias do percentual da área imunopositiva para MT foram feitas pelo teste *t* de Student, para as medidas que apresentaram normalidade, considerando o intervalo de confiança de 95%. Foram considerados significativos estatisticamente os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas no programa PROPHET, versão 2.0.

RESULTADOS

Pôde-se notar marcação da MT em toda camada basal da epiderme nos fragmentos de PN e nos casos de PE. Nas PE, todavia, a marcação também foi visualizada em camadas parabasais. Além disto, identificamos marcação celular na periferia do folículo sebáceo, nos folículos pilosos, em ductos sudoríparos, na periferia das glândulas sebáceas, coincidente com células mioepiteliais, nos músculos elevadores do pelo e em fibroblastos do estroma (Figura 1).

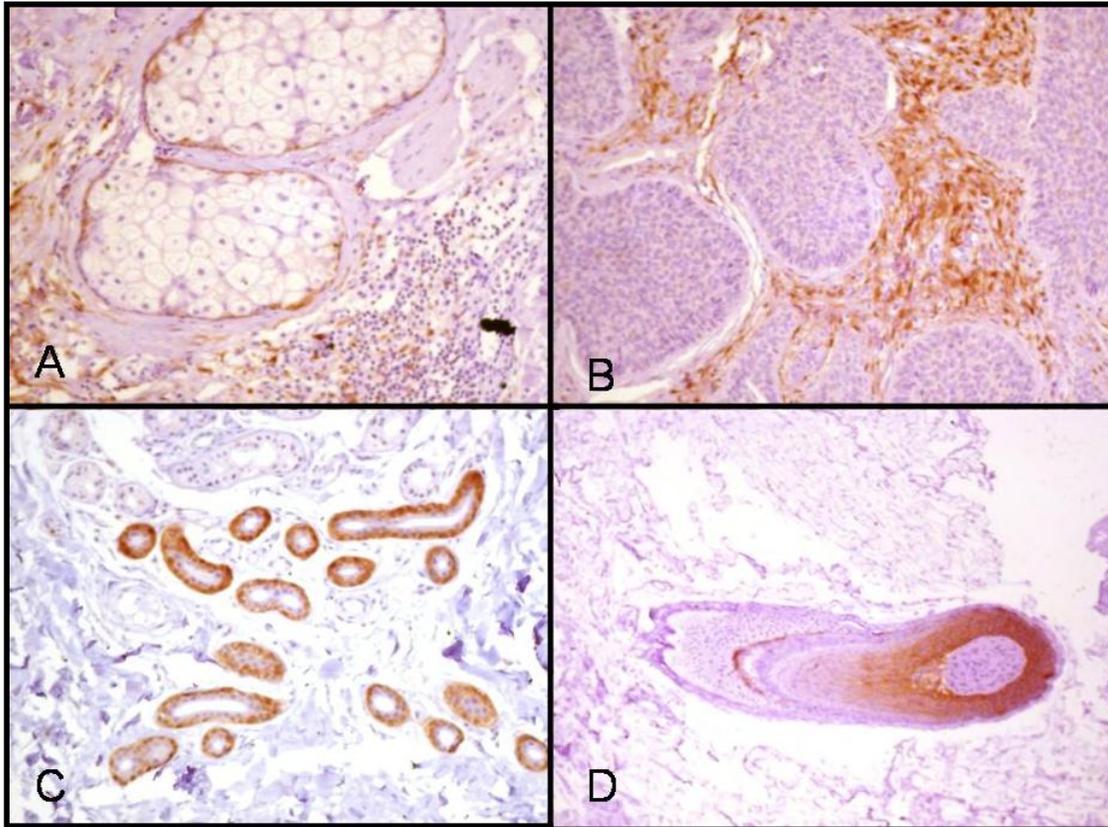


Figura 1. Imunolocalização da MT nas estruturas de pele: A) células mioepiteliais que circundam as glândulas sebáceas; B) fibroblastos estromais; C) ductos sudoríparos; (*Streptavidina-biotina-peroxidase*; 20 x, *aumento original*), D) folículo piloso (*Streptavidina-biotina-peroxidase*, 10x, *aumento original*).

A expressão da MT, nos casos de câncer, foi encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma, mostrando heterogeneidade de sua localização no tumor e nas células do estroma. Em geral, predominou o padrão em mosaico (Figura 2) refletindo desde ausência até forte expressão em um mesmo tumor. Nenhuma marcação foi encontrada nos casos usados para controle negativo.

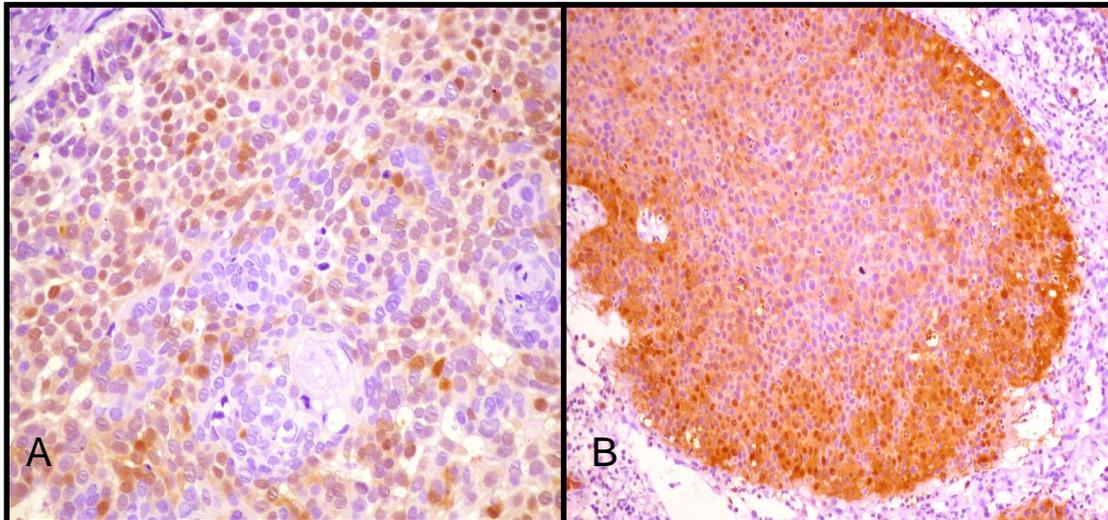


Figura 2. Imunolocalização da MT em CBC (A) (*Streptavidina-biotina-peroxidase*; 40 x, *aumento original*) e CEC (B) (*Streptavidina-biotina-peroxidase*; 20 x, *aumento original*). Pode-se observar, em ambos os tumores, uma heterogeneidade de imunomarcção para MT, refletindo o padrão em mosaico

Observou-se que 33% (6/18 casos) dos CBC sólidos foram negativos para MT e nenhum caso de CEC foi negativo para a expressão da MT. Quarenta e quatro por cento (8/18 casos) dos CBC apresentaram expressão FRACA para MT, enquanto apenas 20% dos CEC (1/5) teve esse padrão de marcação. Os casos de expressão FORTE representaram 22% (4/18) dos CBC e 80% (4/5) dos CEC.

Analisando estatisticamente a expressão da MT a partir dos valores obtidos com o índice ID em CBC sólido e CEC, constatamos que a marcação da MT no CEC foi significativamente maior que no CBC ($p < 0,05$). A média de ID do CBC foi de $0,69 \pm 0,48$ enquanto que a média do ID do CEC foi de $1,55 \pm 0,77$, conforme mostra a Figura 3.

Avaliando apenas o percentual da área de marcação (D), pôde-se observar que a expressão da metalotioneína continuava sendo significativamente maior nos casos de CEC ($p < 0,05$). A média percentual de marcação no CEC foi de $0,57 \pm 0,17$, e no CBC foi de $0,35 \pm 0,12$, conforme mostra a Figura 4.

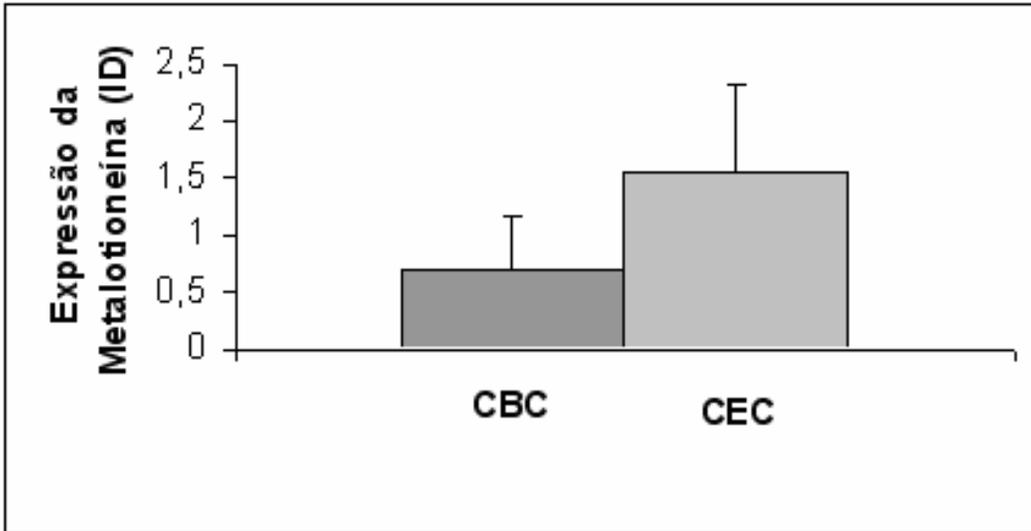


Figura 3. Expressão da Metalotioneína (ID) em Carcinoma Basocelular (CBC) e Carcinoma Espinocelular (CEC) a partir dos valores obtidos pelo ID. Observa-se uma maior expressão de MT no CEC, comparativamente ao CBC ($p = 0,0055$).

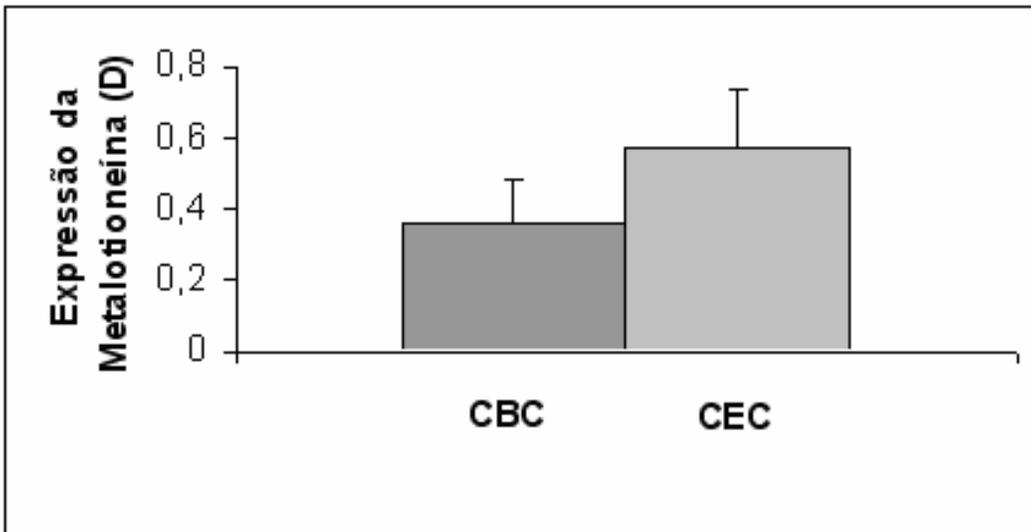


Figura 4. Expressão da Metalotioneína (D) em Carcinoma Basocelular (CBC) e Carcinoma Espinocelular (CEC) a partir dos valores percentuais de marcação tumoral. Observa-se uma maior expressão de MT no CEC, comparativamente ao CBC ($p < 0,05$).

O teste t demonstrou que a expressão de MT é significativamente diferente entre os epitélios de PN e PE ($p < 0,05$). A PN apresentou média igual a $0,21 \pm 0,02$, enquanto a PE apresentou média igual a $0,24 \pm 0,02$ (Figura 5).

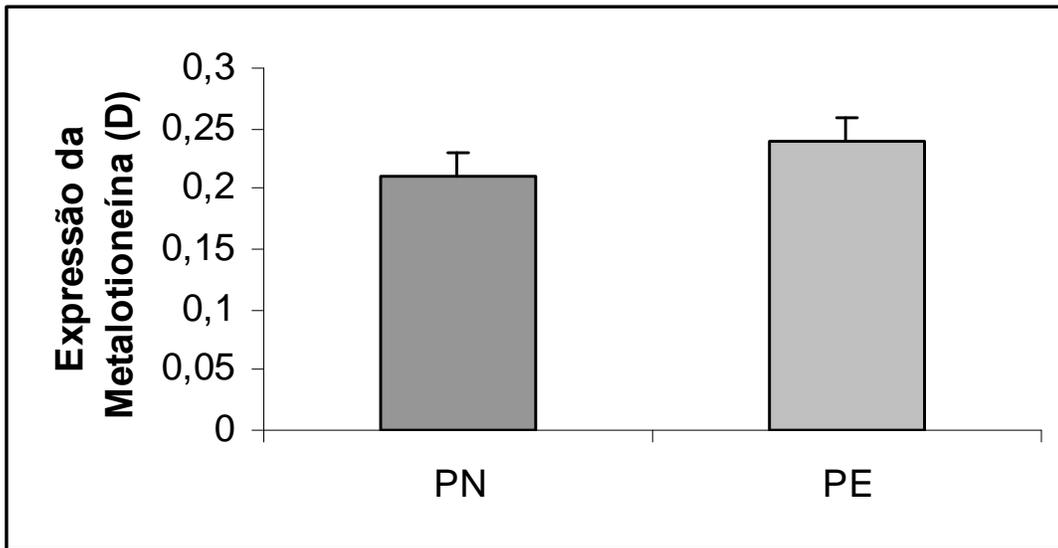


Figura 5. Expressão da Metalotioneína a partir dos percentuais de marcação (D) em pele normal (PN) que foi significativamente diferente daquela encontrada para a pele normal exposta (PE) ($p = 0,0252$).

DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se marcação característica tanto na pele agredida pela radiação solar próxima a neoplasia (PE), quanto na pele não exposta normal (PN). As marcações ocorreram em toda camada basal da epiderme, na periferia do folículo sebáceo, nos folículos pilosos, em células dos ductos sudoríparos da derme, nas células mioepiteliais que circundam as glândulas, nos músculos elevadores do pelo e em fibroblastos do estroma⁴³⁻³⁹. A diferença foi que, na pele agredida, houve um discreto aumento, significativo, na expressão da MT. Admitimos que este padrão de marcação esteja refletindo, em algum grau, uma estimulação da MT nos queratinócitos pela irradiação solar diretamente ou vinculado a mecanismos que envolvam a resposta inflamatória nestas áreas³⁸. Esta hipótese mereceria melhor apreciação desde que não houve, nesta

investigação, uma preocupação em avaliar nos casos ensaiados a resposta inflamatória quer qualitativa ou quantitativamente.

Tanto o aumento quanto a redução da MT já foram reportados em tumores humanos ⁴⁷⁻³²⁻³⁴⁻³⁹. Tanto em um como em outro caso, os mecanismos envolvidos nesta variação de expressão não são muito bem entendidos. Todavia, a superexpressão tem sido associada ao aumento do metabolismo da célula tumoral, aumento na proliferação celular, na ativação de oncogenes ou resposta protetora para danos ao DNA ⁴⁵.

O padrão de marcação da MT em tumores humanos, não depende apenas do crescimento tumoral, e pode ser influenciado por vários fatores como o tipo de tumor, a origem celular, o tipo histológico, a razão entre a proliferação morfológica heterogênea, o grau de diferenciação e o estágio do tumor. A presença de subpopulações de células heterogêneas com graus de crescimento e propriedades funcionais variáveis dentro do tumor, poderia explicar o padrão em mosaico usualmente relatado, também verificado em nossos casos, independentemente do tipo de lesão examinada ³⁴⁻⁷⁻⁹.

Considerando o índice ID estabelecido nesse trabalho, a maioria dos casos de CBC 12 casos (67%) mostraram positividade para expressão de MT (33% de casos negativos). No entanto, destes casos, a expressão considerada fraca foi observada em oito. Somando estes casos aos 6 negativos, verificamos que 14 casos (70%) apresentaram marcação de negativa a fraca. Estes dados estão próximos daqueles obtidos por ROSSEN (1997) que encontrou diminuição ou ausência de imunorreatividade em 92% de seus casos. Essa baixa expressão de MT no CBC sólido pode estar relacionada ao comportamento mais brando desse tumor, refletindo, possivelmente, uma menor fração de proliferação celular ou mesmo uma menor integridade do genoma e, conseqüentemente, o seu prognóstico ²⁻⁴⁰⁻³⁰.

Todos os casos de CEC analisados demonstraram superexpressão de MT. Análises estatísticas demonstraram que a expressão da MT era significativamente maior no CEC, em conformidade com sua expressão em carcinomas de outras localidades como por exemplo: esôfago ⁴⁷, laringe ³², boca e faringe ³⁴. Esses dados refletem aqueles encontrados para as neoplasias originadas de linhagens celulares ectodérmicas, relacionadas a um pior prognóstico ⁴¹⁻¹⁴. Nossos dados

não nos permitem avançar na avaliação do significado prognóstico da MT no CEC. Todavia estas lesões são, usualmente, mais agressivas que o CBC, explicando a diferença de expressão entre as duas lesões.

Neste sentido, tem sido discutido o papel da MT nos mecanismos de controle da proliferação celular. Sabe-se que a MT tem grande afinidade a metais, e dentre estes notavelmente o zinco, que se liga aos resíduos de tiol (SH⁻) da molécula de MT. Desta forma, a MT agiria como um reservatório intra-celular natural de Zn, participando na modulação da atividade funcional da proteína p53, intimamente associada a presença daquele metal. Em consequência, quando superexpressa, a MT poderia seqüestrar uma maior quantidade de Zn, o que geraria uma alteração conformacional da proteína p53, gerando um fenótipo nulo, mas não mutante. Neste caso, o controle da proliferação celular dependente de p53 poderia estar prejudicado, agravando possível deficiência deste controle em outros clones celulares em que p53 se encontra mutada. O resultado final seria maior instabilidade genômica, associada a maior fração de proliferação celular no tumor, mecanismos intimamente associados a progressão tumoral e a sua agressividade ¹². Além disto, superexpressão da MT pode também estar relacionada à inibição da apoptose, favorecendo a sobrevivência da célula e sua incorporação na fração de proliferação celular tumoral ²⁹.

Neste ponto, poderíamos sugerir também que o aumento de marcação para MT na pele normal exposta a radiação (próxima ao tumor) estaria refletindo sua possível participação nas fases iniciais da carcinogênese cutânea pelo mecanismo dependente de p53, já exposto.

REFERÊNCIAS

1. ANDREWS, G. K.; ADAMSON, G. D. e GEDAMU, L. *The ontogeny of the expression of murine metallothionein: comparison with the alpha-fetoprotein gene.* **Dev. Biol.**, v. 103, n. 2, p. 294-303, 1984.
2. APOSTOLOVA, M.D.; CHERIAN, M.G.; *Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation,* **Cell. Mol. Biol.** (Noisy-le-grand) v. 46 p. 347-356, 2000.
3. BAHNSON, R. R.; BANNER, B. F.; ERNSTOFF, M. S.; LAZO, J. S.; CHERIAN, M. G.; BANERJEE, D. e CHIN J. L. *Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder.* **J. Urol.**, v. 146, n. 6, p. 1518-1520, 1991.
4. BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; WALDEMARIN, K.C.A.; *Morphometry of the celular nuclei as diagnosis method of the histocytoma, transmissible veneral tumor (TVT) abd mastocytoma in dog, 1st International Conference on Bioinformatics and computational Biology,* Ribeirão Preto, 2003.
5. BRENNAN, P.A.; UNAR, T.; BOWDEN, J.; HOBKIRK, A.; SPEDDING, A.V.; CONROY, B.; ZAKI, G. e MACPHERSON, D.W. *Nitric oxide syntase expression is downregulated in basal cell carcinoma of dthe head and neck.* **British journal of oral and maxillofacial surgery**, v.38, p.633-636, 2000.
6. BOWDEN, G.T.; *Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-b-light signaling,* **Nature Reviews**, v.4, p. 23-35, 2004.
7. CARDOSO, S. V.; BARBOSA, H.M.; CANDELLORI I.M.; LOYOLA, A.M.; AGUIAR, M.C.F. *sPrognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma.* **Virchows Arch**, v. 441, p. 174-178, 2002.
8. CHERIAN, M. G.; HUANG, P. C.; KLAASEN, C. D.; LIU, Y. P.; LONGFELLOW, D. G. e WAALKES, M. P. *National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis – Meeting report.* **Cancer Res.**, v. 53, p. 922-925, 1993.

9. CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BOON-HUAT BAY; *Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis*, **Mutation Research**, v. 533, p. 201-209, 2003.
10. COSTA, L.F.; CESAR, R.M.; *Shape Analysis and Classification; Theory and Practice*. CRC Press. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. p248-251/660. 2001.
11. DEMACHKI, S. e BACCHI, C. E. *Metalotioneínas e neoplasias humanas*. **J. Bras. Patol.** v. 34, n. 1, p. 48-54, 1998.
12. DOUGLAS-JONES, A. G.; SCHMID, K. W.; BIER, B.; HORGAN, K.; LYONS, K.; DALLIMORE, N. D.; MONEYPENNY, J. e JASANI, B. *Metallothionein expression in duct carcinoma of the breast*. **Human Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 217-222, 1995.
13. ELDER, D.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; JOHNSON JR. B.; **Lever's Histopatology of the skin**; eighth edition, Lippincott. Raven pp. 1073, 1997.
14. GILBERT, S. F. *Biologia do Desenvolvimento*. 2^a. Edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 578 p.
15. GOULDING, H.; JASANI, B.; PEREIRA, H.; REID, A.; GALEA, M.; BELL, J. A.; ELSTON, C. W. *Metallothionein expression in human breast cancer*. **Br. J. Cancer**, v. 72, n. 4, p. 968-972, 1995.
16. GRANSTEIN, RD. *Photoimmunology*. **Semin. Dermatol.** 1990 Mar; 9(1):16-24.
17. GRUIJ, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB*. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 356-366, 2000.
18. HAERSLEV, T.; JACOBSEN, G. K.; NEDERGAARD, L.; ZEDELER, K. *Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases*. **Pathol. Res. Pract.**, v. 190, n. 7, p. 675, 681, 1994.
19. HAMER, D. H. *Metallothionein*. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 913-951, 1986.
20. HANADA, K.; SAWAMURA, D.; TAMAI, K.; BABA, T.; HASHIMOTO, I.; MIURA, N. e NAGANUMA, A. *Novel function of metallothionein in photoprotection: metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance*

- against ultraviolet B injury in the skin. J. Invest. Dermatol.*, v. 111, n. 4, p. 582-585, 1998a.
21. HANADA, K.; SAWAMAURA, D.; HASHIMOTO, I.; KIDA, K.; NAGANUMA, A. Epidermal proliferation of skin in metallothionein-null mice, **J. Invest. Dermatol**, v. 110, n. 3, p. 259-262, 1998b.
 22. HANADA, K. *Photoprotective role of MT in UV-injury MT-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B. Jornal Dermatological Science*, v. 23, s. 1, p. 51-56, 2000.
 23. HISHIKAWA, Y.; ABE, S.; KINUGASA, S.; YOSHIMURA, H.; MONDEN, N.; IGARASHI, M.; TACHIBANA, M. e NAGASUE, N. *Overexpression of metallothionein correlates with chemoresistance to cisplatin and prognosis in esophageal cancer. Oncology*, v. 54, n. 4, p. 342-347, 1997.
 24. HIURA, T.; KHALID, H.; TOKUNAGA, Y.; YASUNAGA, A. e SHIBATA, S. *Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival. Cancer*, v. 83, n. 11, p. 2361-2369, 1998.
 25. JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Significance of metallothionein overexpression in human tumors. Histopathology*, v. 31, n. 3, p. 211-214, 1997.
 26. KÄGI, J. H. e SCHÄFFER, A. *Biochemistry of metallothionein. Biochemistry*, v. 27, n. 23, p. 8509-8515, 15, 1988.
 27. KELLEY, S. L.; BASU, A.; TEICHER, B. A.; HACKER, M. P.; HAMER, D. H. e LAZO, J. S. *Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. Science*, v. 241, n. 4874, p. 1813-1815, 1988.
 28. KOBAYASHI, S.; HIROTA, Y.; SAYATO-SUZUKI, J.; TAKEHAMA, M.; NISHIMURA, H.; NISHIMURA, N. e TOHYAMA, C. *Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts. Photochem. Photobiol.*, v. 59, n. 6, p. 650-656, 1994.
 29. KONDO, Y.; RUSNAKI, J. M.; HOYUT, D. G.; SETTINERI, C. E.; PITT. B. R. e LAZO, J. S. *Enhanced apoptosis in metallothionein-null cells. Mol. Pharmacol.*, v. 52, n. 2, p. 195-201, 1997.

30. KRIPKE, ML. *Carcinogenesis: Ultraviolet Radiation*. In: FITZPATRICK, TB et al. **Dermatology in General Medicine**. McGraw Hill. 1993; 797-804.
31. KUO, T. e LO, S. K. *Immunohistochemical metallothionein expression in thymoma: correlation with histological types and cellular origin*. **Histopathology**, v. 30, n. 3, p. 243-248, 1997.
32. LOACHIN, E.; ASSIMAKOPOULOS, D.; PESCHOS, D.; ZISSI, A.; SKEVAS, A.; AGNANTIS, N.J. *Immunohistochemical expression of MT in benign premalignant and malignant epithelium of the larynx: correlation with p53 and proliferative cell nuclear antigen*. **Pathol. Res. Pract.** V. 195, p. 809-814, 1999.
33. McCLUGGAGE, W. G.; MAXWELL, P.; HAMILTON, P. W. e JASANI, B. *High metallothionein expression is associated with features predictive of aggressive behavior in endometrial carcinoma*. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 51-55, 1999.
34. MURAMATSU, Y.; HASEGAWA, Y.; FUKANO, H.; OGAWA, T.; NAMUBA, M.; MOURI, K.; FUJIMOTO, Y.; MATSUURA, H.; TAKAI, Y. e MORI, M. *Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses*. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 257-264, 2000.
35. NARTEY, N. O.; CHERIAN, M. G. e BANERJEE, D. *Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and citoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development*. **Pathology**, v. 19, n. 3, p. 233-238, 1987b.
36. ÖFNER, S.; MAIER, H.; RIEDMANN, B.; BAMMER, T.; RUMER, A.; WINDE, G.; BÖCKER, W.; JASANI, B. e SCHMID, K. W. *Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal adenocarcinoma: correlation with tumor stage and patient survival*. **Virchows Arch.**, v. 425, n. 5, p. 491-497, 1994.
37. OHSHIO, G.; IMAMURA, T.; OKADA, N.; WAN, Z.; YAMAKI, K.; KYOGOKU, T.; SUWA, H.; YAMABE, H. e IMAMURA, M. *Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 122, n. 6, p. 351-355, 1996.

38. REEVE, V.E.; NISHIMURA, N.; BOSNIC, M.; MICHALSKA, A.E.; CHOO, K.H.A. *Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice.* **Imunology**, v. 100, n.3, p. 399-404, 2000.
39. ROSSEN, K.; HAERSLEV, T.; HOU-JENSEN, K. e JACOBSEN, G. K. *Metallothionein expression in basaloid proliferations overlying dermatofibromas and in basal cell carcinomas.* **Br. J. Dermatol.**, v. 136, n. 1, p. 30-34, 1997.
40. SCHMID, K. W.; ELLIS, I. O.; GEE, J. M. W.; DARKE, B. M.; LEES, W. E.; KAY, J.; CRYER, A.; STARK, J. M.; HITTMAIR, A.; ÖFNER, D.; DÜNSER, M.; MARGREITER, R.; DAXENBICHLER, G.; NICHOLSON, R. I.; BIER, B.; BÖCKER, W. e JASANI, B. *Presence and possible significance of immunohistochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast.* **Virchows Arch. A Pathol. Anat.**, v. 422, n. 2, p. 153-159, 1993.
41. SCHMIDT, C. J. e HAMER, D. H. *Cell specificity and an effect of ras on human metallothionein gene expression.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 10, p. 3346-3350, 1986.
42. SHUKLA, V. K.; ARRYA, N. C.; PITALE, A.; PANDEY, M.; DIXIT, V. K.; REDDY, C. D. e GAUTMAM, A. *Metallothionein expression in carcinoma of the gallblader.* **Histopathology**, v. 33, n. 2, p. 154-157, 1998.
43. SUGITA, K.; YAMAMOTO, O.; ASCHI, M. *Immunohistochemical analysis of MT expression in malignant melanoma in Japanese patients.* **The Am. J. Dermatopathology**, v. 23, n.1, p. 29-35, 2001.
44. SUNDELIN, K.; JADNER, M. NORBERG-SPAACK, L.; DAVIDSON, Å. e HELLQUIST, H. B. *Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue.* **Eur. J. Cancer**, v. 33, n. 11, p. 1860-1864, 1997.
45. TASHIRO-ITOH, T.; ICHIDA, T.; MATSUDA, Y.; SATOH, T.; SUGIYAMA, M.; et al. *Metallothionein expression and concentrations of copper and zinc are associated with tumor differentiation in hepatocellular carcinoma.* **Liver**, v. 17, p. 300-306, 1997.

46. TILLI, C.M.L.J.; RAMAEKERS, F.C.S.; BROERS, J.L.V.; HUTCHISON, C.J.; NEUMANN, H.A.M.; *Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. British J. Dermatology*, v. 148, p. 102-109, 2003.
47. YAMAMOTO, M.; TSUJINAKA, T.; SHIZAKI, H.; DOKI, Y.; TAMURA, S.; INOUE, M.; HIRAO, M. e MONDEN, M. *Metallothionein expression correlates with the pathological response of patients with esophageal cancer undergoing preoperative chemoradiation therapy. Oncology*, v. 56, n. 4, p. 332-337, 1999.
48. ZHANG, X. H.; JIN, L.; SAKAMOTO, H. e TAKENAKA, I. *Immunohistochemical localization of metallothionein in human prostate cancer. J. Urol.*, v. 156, n. 5, p. 1679-1681, 1996.
49. ZENG, J.; HEUCHEL, R.; SCHAFFNER, W. e KÄGI, J. H. *Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc-finger containing factor Sp1. FEBS Lett.*, v. 279, n. 2, p. 310, 312, 1991a.
50. ZENG, J.; VALLEE, B. L. e KÄGI, J. H. *Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, n. 22, p. 9984-9988, 1991b.

CAPÍTULO II
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE II E
ÓXIDO NÍTRICO EM NEOPLASIAS
CUTÂNEAS ASSOCIADAS À
RADIAÇÃO ACTÍNICA

RESUMO

O carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC), são os tipos mais comuns de câncer de pele. São tumores invasivos e têm sua patogenia relacionada à radiação actínica. A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é a uma proteína responsável pela produção de óxido nítrico (NO), cuja indução pode estar relacionada à exposição solar. Sua expressão e conseqüente produção de NO sugerem um papel na carcinogênese e progressão tumoral. Nosso trabalho utilizou 18 casos de CBC sólido, sete casos de CEC, e seis casos de pele normal (PN) para estudo da iNOS; e para o estudo da produção de NO foram utilizados 16 casos de CBC sólido, seis casos de CEC, e seis fragmentos de PN, não expostas à radiação solar. Avaliou-se a expressão da iNOS por técnica de Western Blot, e dosou-se o NO pelos resíduos de nitrito e nitrato, obtidos pela reação de Greiss. Os resultados foram analisados estatisticamente segundo as médias dos valores obtidos por meio do teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%. Encontramos a expressão de iNOS, significativamente menor em CBC sólido quando comparado a expressão encontrada a PN ($p = 0,029$). Para o CEC observamos resultado inverso, sendo a expressão de iNOS significativamente maior no tumor que na PN ($p = 0,025$). Quando comparamos CBC e CEC também observamos um superexpressão da iNOS em CEC ($p = 0,0001$). Quanto à produção de NO, os valores encontrados não apresentaram diferenças significativas entre os tumores estudados. Esses dados nos levam a pensar que a superexpressão da iNOS estaria relacionada a tumores de pele mais agressivos. Possivelmente, os valores de NO nestas lesões não parecem estar vinculados a atividade de iNOS.

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) are the most frequent skin cancer in Brazilian people. They are invasive tumors and its pathogeny is linked to actinic radiation. The nitric oxide synthase induced enzyme (iNOS) is a protein responsible to produce nitric oxide (NO), whose prompt can be related to sun exposure. Your expression and consequent NO production may play a role in carcinogenesis and tumor progression. We used eighteen BCC cases, seven SCC cases and six normal skin (NS) to study iNOS expression, and sixteen BCC cases, six SCC cases and six NS fragments not exposed to sun light to study NO production. The iNOS expression was evaluated by Western Blot technique, and the NO production was dosed by nitrite and nitrate residues, obtained by using Greiss reaction. The results were statistically analyzed according to the average of the obtained values by the Student test t , with confidence interval of 95%. BCC iNOS expression was lower than NS ($p = 0,029$). SCC iNOS expression was higher than NS ($p = 0,025$) and BCC ($p = 0,0001$). NO production did not showed significant difference in the tumors studied. The results suggests that iNOS superexpression is associated with more aggressive skin tumors. The NO production may not be correlated with the iNOS activity.

INTRODUÇÃO

O câncer de pele tem sua patogenia vinculada a exposição crônica da pele a radiação actínica. Os três tipos de câncer mais freqüentemente relacionados à exposição solar são o carcinoma basocelular (CBC), o carcinoma espinocelular (CEC) - cânceres de pele não melanoma - e o melanoma maligno. O carcinoma basocelular aparece como um dos mais freqüentes efeitos da ação carcinogénica da radiação actínica na pele ².

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno que se origina das células basais da epiderme e seus apêndices, possui malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos. Seus componentes celulares se assemelham às células indiferenciadas e imaturas do estrato basal, apresentando um estroma característico. Ocorre basicamente na face, usualmente como lesões únicas ⁹.

O carcinoma espinocelular cutâneo (CEC) é uma neoplasia maligna do queratinócito da epiderme, constituído por células epidérmicas atípicas, cuja microarquitetura lembra aspectos da epiderme ¹¹. O CEC pode se originar "de novo" ou de uma lesão precursora como a queratose actínica. CBC e CEC podem ser invasivos, mas apenas o CEC possui grande potencial para emitir metástase ⁹. Embora o CEC seja menos comum que o CBC, a relação entre exposição solar e neoplasia é mais direta no CEC que no CBC ¹⁶.

O óxido nítrico (NO) é uma das 10 menores moléculas no organismo, capaz de atravessar a membrana celular e influenciar enzimas e proteínas tanto no citossol quanto no núcleo. É importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação, nos mecanismos de autoimunidade e na apoptose. A síntese e formação do óxido nítrico é realizada pela enzima - síntase do óxido nítrico (nitric oxide synthase - NOS). A função do NO é a defesa do organismo contra patógenos, no entanto uma superprodução de NO estaria relacionado ao aumento da angiogênese, um pré-requisito para o crescimento e a progressão tumoral ¹⁰.

A iNOS ou Isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacárides bacterianos e/ou citocinas²¹. Esta isoenzima também pode ser chamada de macNOS (macrophage NO synthase). É uma enzima cálcio independente de peso molecular de 130 KDa. Vários autores consideram que qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes⁵⁻¹⁸.

A iNOS está envolvida na proliferação¹⁵ e crescimento celular e no controle do ciclo celular. Jenkins, Charles e Thonsen demonstraram que raios UVA e UVB da radiação solar levam a uma superexpressão do mRNA de iNOS.

O papel da iNOS/NO no câncer é multidimensional, e pode ser tanto um promotor, promovendo a angiogênese²⁰ quanto um inibidor tumoral, mediando a apoptose¹. Já foi demonstrado que durante a inflamação crônica, a exposição prolongada do meio ao NO pode iniciar e aumentar a carcinogênese no homem²³. O papel do NO na carcinogênese pode ser devido a formação de nitrosaminas carcinogênicas, que provocam danos ao DNA, induz a neovascularização, vasodilatação e ativação de metaloproteases²⁰. O papel da iNOS na carcinogênese é reforçado pelo estudo de CHOE et al (2003) que demonstraram em carcinomas de tiróide que a iNOS é derivada das células tumorais, e não dos macrófagos.

O objetivo desse trabalho é estudar pela técnica de Western Blot, a expressão da iNOS, bem como a concentração de nitrito e nitrato (como prova da produção de NO), determinada pela reação de Greiss, em CBC e CEC e fragmentos de pele normal (PN).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para esta pesquisa, 18 casos de CBC sólido, sete casos de CEC, e seis casos de pele normal para estudo da iNOS. Para o estudo da produção de NO, foram utilizados 16 casos de CBC sólido, seis casos de CEC, e seis fragmentos de pele normal (PN), não expostas à radiação solar, obtido por meio de pele retirados do abdômen através de cirurgia plástica. Os casos de CBC e CEC foram obtidos através de biópsias excisionais de pacientes com indicação prévia das mesmas para confirmação de diagnóstico e tratamento das lesões, após o consentimento livre e esclarecido do paciente.

Alíquotas (pré-pesadas) das amostras dos tecidos foram homogeneizadas por 3 minutos, em gelo, em tampão de extração⁶ contendo Hepes 40mM pH 7.7, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 0.1 mM e PMSF 0.5 mM, utilizando-se um homogeneizador (OMINUTOSUTOSI-MIXER, Waterbury, CT> USA) com microsonda.

As amostras dos homogeneizados foram então centrifugadas a 40.000 x g a 4^oC (Hitachi rotor 27). Das amostras do sobrenadante foi feita a precipitação de proteínas com TCA 50% e uma nova centrifugação a 15000 x g a 4^oC, e os sedimentos obtidos do precipitado foram ressuspensos em tampão da amostra (Tris- HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 1%; bromofenol blue 0,025%, e 10µl de 2-mercaptoetanol) numa concentração de 5µg/µl. A seguir, as amostras foram fervidas à 100^oC e estocadas a -20^oC. A concentração de proteína total nas frações foi determinada pelo método de Bradford (1976) tendo como padrão a soro albumina bovina (BSA). O sobrenadante foi usado para dosagem de nitrito/nitrato.

A análise do perfil de polipeptídios foi feita usando o sistema descontínuo descrito por Laemmli & Favre (1973) e o sistema de placas de vidro descrito por Studier (1973). A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita em placas de vidro de dimensões de 11x 9x 0,06 cm, utilizando géis com gradiente de 5-16%.

As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas

eletroforéticamente a 80mA por 5 horas, para membrana de nitrocelulose, utilizando-se como tampão de transferência Tris- HCl 25mM, glicina 190mM , metanol 20%, e a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,2% em ácido tricloroacético 3% por 5 minutos e lavada, em seguida, com água deionizada.

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% e TBS-T) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS-T, três ciclos de 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário para NOS II (clone 54, BD Transduction Laboratories, CA. USA) em diluição de 1:2500 por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram lavadas em TBS-T, 3 ciclos de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugados com peroxidase por 1 hora. A reatividade dos anticorpos foi detectada pelo sistema de quimiluminescência segundo o kit ECL e protocolo do fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech Uppasola, Sweden): a membrana foi incubada com solução de detecção (solução A e B 1:1) por 1 minuto e colocada dentro de um cassete de revelação. O filme de raios-X foi colocado sobre a membrana com tempo de revelação variando entre 1 a 10 minutos em câmara escura. O filme foi então mergulhado em solução reveladora (Kodak) por 1 minuto, lavado em água e mergulhado em solução fixadora (KodaK) por 1 minuto. então revelado. As bandas identificadas no filme foram analisados e quantificadas quanto as suas densidades ópticas no programa Image Máster VDS software, versão 2.0 (Amersham Pharmacia Uppasola, Sweden) obtendo o índice de densidade ótica (IOD).

A concentração de nitrito e nitrato foi determinada pela reação de Greiss, sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5%; N-(1-naphthyl)ethylenediaminotose (NEED) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% ¹². Foram utilizadas placas com 96 poços de fundo chato (*Nunc-Maxsorp*, Rochester, NY, USA) onde foi depositado 50µl de cada amostra em duplicata, com a subsequente detecção do nitrito e nitrato com 50µl de reagente de Greiss. A curva padrão de nitrito foi feita usando solução estoque de NaNO₂ 1M e água milli-Q. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de absorvância a 540nm.

Os resultados de produção de NO em μM e de expressão da iNOS indicado pelo índice de densidade óptica (IOD) foram convertidos a uma média e as comparações entre médias foram feitas pelo teste t de student para as medidas que apresentaram normalidade, considerando o intervalo de confiança de 95%. Foram considerados significativos estatisticamente valores em que $p < 0,05$. A análise estatística foi conduzida utilizando o *software* PROPHET, versão 2.0.

RESULTADOS

Os valores obtidos com a dosagem de nitrito e nitrato, como prova da produção de NO, foram bastante heterogêneos em todos os casos estudados. Contudo, a média dos valores de produção de ambos os grupos foram bem aproximada. Enquanto os casos de CEC e PN apresentaram média igual a $2,439 \mu\text{M}$ de NO, com os seguintes desvio padrão: $\pm 3,00$ para o CEC e $\pm 1,19$ para a PN, os casos de CBC apresentaram média de $2,425 \mu\text{M}$ de NO $\pm 2,05$; como mostra a Figura 1.

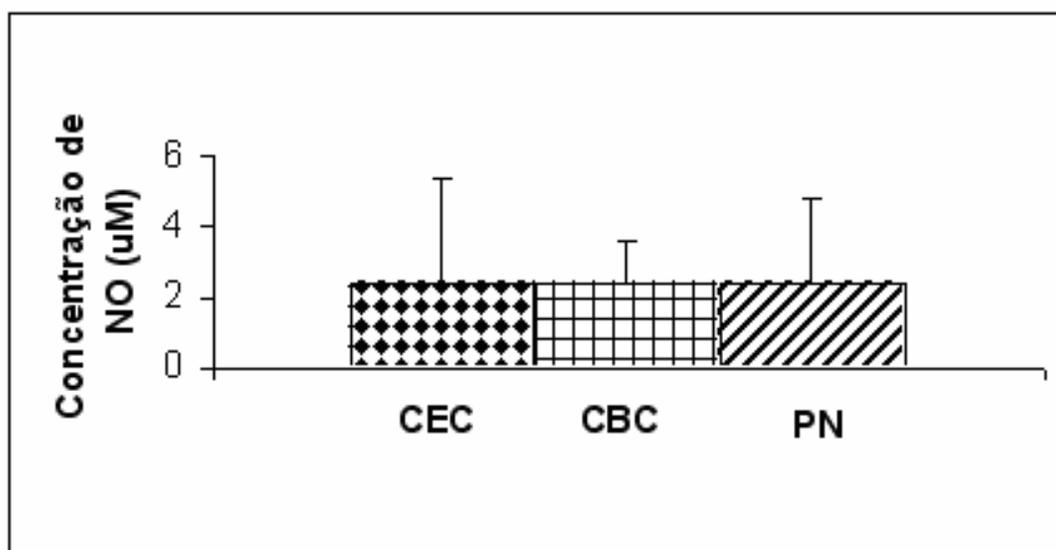


Figura 1. Concentrações de óxido nítrico (NO) em carcinomas espinocelulares (CEC), carcinoma basocelulares (CBC) e pele normal (PN).

A diferença entre os valores obtidos não foi estatisticamente significativa; como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Valores estatísticos para o teste *t* e a significância (*p*) para a produção de óxido nítrico em carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma baso celular (CBC) e pele normal (PN).

CASOS	t	p
CBC/CEC	0,012	0,9906
CBC/PN	0,015	0,9883
CEC/PN	0	0,9999

Com relação a expressão da iNOS, foram avaliados os valores obtidos pela análise dos índices de densidade óptica (IOD). A média apresentada pelos casos de CBC sólido foi igual a $77,80 \pm 47,46$, os casos de CEC apresentaram média igual a $214,29 \pm 77,09$. Dos 18 casos de CBC sólido, 16 (88,9%) apresentaram IOD menor que o valor da média obtida com os seis casos de pele normal que foi igual a $126,62 \pm 31,45$. Já dos sete casos de CEC, seis (85,7%) apresentaram índice maior que 126,62; como mostra a Figura 2

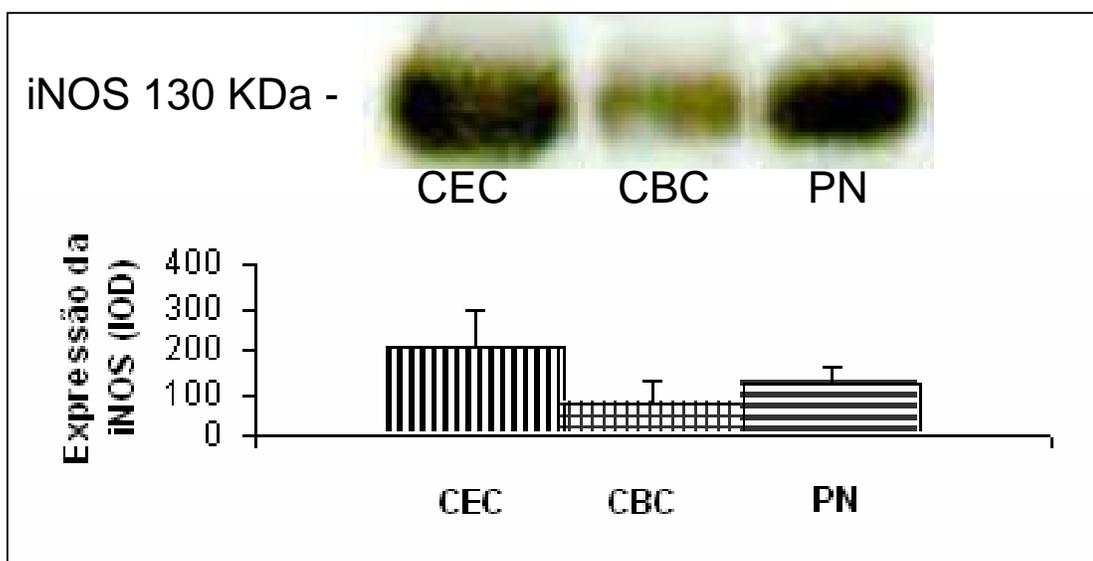


Figura 2. Valores dos índices de densidade ótica (IOD) da enzima óxido nítrico sintase II (iNOS) em carcinomas espinocelulares (CEC) carcinomas basocelulares (CBC) e pele normal (PN).

Analisando estatisticamente os valores obtidos, observamos que houve diferença significativa entre os todos os casos. A expressão de iNOS no CEC foi significativamente maior que na PN ($p = 0,025$); o mesmo ocorreu quando comparamos a relação CBC sólido e pele normal, onde a expressão de iNOS foi significativamente menor no CBC ($p = 0,029$) ou quando comparamos a relação CBC sólido e CEC, em que a expressão de iNOS foi significativamente menor no CBC comparado ao CEC ($p = 0,0001$), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Valores estatísticos para o teste *t* e a significância (*p*) para a expressão de óxido nítrico sintase II em carcinomas espinocelulares (CEC), carcinomas basocelulares (CBC) e pele normal (PN).

CASOS	t	p
CBC/CEC	5,404	0,0001 ***
CBC/PN	2,336	0,029 *
CEC/PN	2,594	0,025 *

DISCUSSÃO

O NO e outros radicais do oxigênio têm sido envolvidos na carcinogênese. Entretanto, o papel do NO no câncer de pele não-melanoma ainda não foi esclarecido. No presente estudo, demonstramos aumento da expressão de iNOS

no CEC e diminuição da expressão no CBC quando comparados a expressão de iNOS na pele normal. Entretanto não encontramos diferenças significativas na produção do NO.

LEE et al. (2003) demonstraram por análises de western blot e testes imunohistoquímicos, que a expressão de iNOS e a concentração de NO são significativamente maiores em tecidos tumorais do pulmão quando comparados a tecidos não-tumorais. MARROGI *et al* (2000) estudando tipos de câncer do pulmão também observaram altos níveis de iNOS em células do carcinoma de pulmão e no adenocarcinoma, mas não no carcinoma de células escamosas (CEC). Esses dados nos levam a pensar que a superexpressão da iNOS está relacionada a tumores mais agressivos, compatível com a superexpressão da iNOS no CEC, mas não no CBC sólido.

BRENNAN et al. (2000), estudando imunohistoquimicamente a expressão de iNOS e eNOS em 48 casos de CBC de cabeça e pescoço, demonstraram que ambas enzimas estavam com a expressão reduzida quando comparados à pele normal, e que a produção de NO também estava reduzida no tumor. Complementando os achados, KAGOURA et al, (2001) estudaram a expressão de iNOS em câncer de pele, encontrando apenas um caso de CBC positivo para iNOS dos 16 casos estudados, enquanto que, para o CEC, 12 dos 16 casos observados foram positivos.

Em nosso estudo a expressão da iNOS, nos casos de CBC sólido, foi significativamente menor que a encontrada em pele normal (88,9% dos casos) e isso pode ser uma explicação ao fato de que esse tipo de tumor raramente produz metástases.

Os dados da expressão de iNOS em CEC sugerem que a expressão do iNOS deve refletir a proliferação das células tumorais e que a heterogeneidade na distribuição da iNOS entre os cânceres de pele deve correlacionar com a variedade natural dos comportamentos biológicos das células tumorais. O CBC e o CEC variam quanto ao seu comportamento biológico. Embora ambos sejam invasivos, o CBC não tem capacidade de metastizar⁹. Esta propriedade do CEC pode estar relacionada a angiogênese induzida pelo iNOS/NO. CHIN *et al* (2003), demonstraram que não houve diferenças entre os cânceres não-melanoma quanto a vascularização do estroma circunjacente. No entanto, foram encontrados

vasos na massa tumoral do CEC e nenhum na massa tumoral do CBC, sugerindo que a angiogênese no estroma está relacionada ao comportamento invasivo, enquanto o potencial para metástase está relacionado a presença de microvasos na massa de células tumorais⁷.

VURAL et al. (2001) não encontraram diferença significativa dos níveis de NO em plasma sanguíneo entre queratose actínica e controles ou entre queratose actínica e CBC, mas os níveis de NO no plasma de pacientes com CBC foram significativamente maiores em comparação aos casos controle, sugerindo uma função no crescimento celular dos tumores de pele.

Os achados referentes as concentrações de NO não fizeram ressonância nos achados de iNOS. Este fato foi interessante, já que, no tumor, a principal responsável pelas concentrações de NO é a iNOS⁸. Este fato nos levou as seguintes possibilidades: pode ter ocorrido um erro na estocagem da amostra ou no desenvolvimento da técnica para detecção de NO ou iNOS, o NO presente não tenha sido induzido nos tumores, ou ainda, que ele tenha sido previamente induzido nos casos controles por outros fatores que não a radiação solar (o stress pré-operatório poderia levar a essa indução). O fato é que a produção de NO se mostrou igual nos três tipos de amostra estudados.

O papel do NO no câncer pode ser o seguinte: quando produzido em altas concentrações teria atividade anti-tumoral (apoptose) e em baixas concentrações por um longo período de tempo promoveria o crescimento tumoral (angiogênese)¹³. No entanto o papel do NO em tumores é bastante complexo e seu estudo ainda está em fase inicial.

REFERÊNCIAS

1. ALI, S.M.; OLIVO, M.; *Nitric oxide mediated photo-induced cell death in human malignant cells. Intern. J. Oncology*, v.22, p. 751-756, 2003.
2. BOWDEN, G.T.; *Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-b-light signaling, Nature Reviews*, v.4, p. 23-35, 2004.

3. BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
4. BRENNAN, P.A.; UNAR, T.; BOWDEN, J.; HOBKIRK, A.; SPEDDING, A.V.; CONROY, B.; ZAKI, G. e MACPHERSON, D.W. *Nitric oxide syntase expression is downregulated in basal cell carcinoma of dthe head and neck.* **British journal of oral and maxillofacial surgery**, v.38, p.633-636, 2000.
5. BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. *Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease – a review,* **Arch. Dermatol. Res.** V. 290, p. 643-651, 1998.
6. CHENEY, R. E. , O'SHEA, M. K., HEUSER, J. E. , COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S., *Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity.* **Cell**, v.75, p.13-23. 1993.
7. CHIN, C.W.; FOSS, A.J.; STEVENS, A.; LOWE, J. *Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin carcinomas explain their differences in clinical behaviour.* **J. Pathol.** v. 200 pt. 3 p. 308-313, 2003.
8. CHOE, W.; KIN, S.; HWANG, T.S.; LEE, S.S.; *Expression of inducible nitric oxide synthase in thyroid neoplasms: Immunohistochemical and molecular analysis.* **Pathology International**, v. 53, p. 434 – 439, 2003.
9. ELDER, D.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; JOHNSON JR. B.; **Lever's Histopatology of the skin**; eighth edition, Lippincott. Raven pp. 1073, 1997.
10. FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. *Óxido nítrico: osimples mensageiro percorrendo a complexidade, Metabolismo, sínteses e funções.* **Rer. Ass. Méd. Brasil**, v.46, n.3, p. 265-271, 2000.
11. GRANSTEIN, RD. *Photoimmunology.* **Semin. Dermatol.** Mar; v. 9, n. 1, p. 16-24, 1990.
12. GREEN, H.J., HUGSON, R.L., ORR, G.W., RANNEY, D.A. *Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in prograssive exercise.* **J Appl Physiol.**v.54, p. 1032-1038, 1983.
13. JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THONSEN, L.L. et al. *Roles of nitric oxide in tumor growth.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4392-4396, 1995.

14. KAGOURA, M.; MATSUI, C.; TOYODA, M.; MOROHASHI, M. *Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancers.* **J. Cutaneous Pathology**, v.28, n.9, p. 476-481, 2001.
15. KATO, S.; ESUMI, H.; HIRANO, A.; KATO, M.; ASAYAMA, K. OHAMA, E.; *Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein.* **Acta Neuropathol.** V.105, p.333-340, 2003.
16. KRIPKE, ML. *Carcinogenesis: Ultraviolet Radiation.* In: FITZPATRICK, TB et al. **Dermatology in General Medicine.** McGraw Hil.; p. 797-804, 1993.
17. LAEMMLI, U. K, FAVRE, M. *Maturation of the head of bacteriophage T4,* **J. Mol. Biol.**, v. 80, p. 575-599, 1973.
18. LEE, T.W.; CHEN, G.G.; XU, H.; YIP, J.H.Y.; CHAK, E.C.W.; MOK, T.S.K. e YIM, A.P.C. *Diferential expression of inducible nitric oxide syntase and peroxisome proliferators-activated receptor gamma in non-small cell lung carcinoma.* **European Journal of cancer.** V. 39, p. 1296-1301, 2003.
19. MARROGI, A.J.; TRAVIS, W.D.; WELSH, J.A.; et al. *Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma.* **Clin. Cancer Res.** V. 6, p. 4739-4744, 2000.
20. THONSEN, L.L. e MILES, D.W. *Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from human tumors.* **Cancer Metastasis Rev.** v. 17, p. 107-118, 1998.
21. STUEHR DJ, CHO HJ, KWON NS, WEISE MF, NATHAN CF. *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 7773-7777, 1991.
22. VURAL, P.; ERZENGIN, D.; CANBAZ, M.; SELÇUKI, D. *Nitric oxide and endothelin-1,2 in actinic keratosis and basal cell carcinoma: changes in nitric oxide/endothelin ratio.* **Int. J. Dermatology**, v. 40, p. 704-708, 2001.
23. WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W. e MITCHELL, J.B. *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer.* **Carcinogenesis.**, v. 19, p. 711-721, 1998.

CAPÍTULO III
AUSÊNCIA DE CORRELAÇÃO ENTRE
OXIDO NÍTRICO, OXIDO NÍTRICO
SINTASE II E METALOTIONEINA EM
CARCINOMAS BASOCELULARES

RESUMO

A metalotioneína é uma proteína de 6 a 7 kD de peso molecular que tem alta afinidade para metais pesados, em especial o zinco. Ela atua como reservatório natural deste metal, e tem sido relacionada a mecanismos protetores da célula a agressão por radicais livres. Evidências recentes imputam a MT um papel protetor a agressão actínica. O óxido nítrico (NO), importante metabólito celular, tem sido identificado em modelos de agressão actínica. Desconhece-se se sua presença atua de forma protetora, sinalizando um stress oxidativo pela maior geração de radicais livres ou se sua presença atua lesando o DNA, produzindo efeito diretamente na carcinogênese. Um mecanismo hipotético defende que o NO pode estar vinculado à indução de MT, que age como protetor à medida que sua ação quelante de metais estimularia a ativação gênica de MT pela maior concentração de Zn intra-celular. Outro mecanismo que unificaria a ação de MT e NO seria na apoptose. Neste estudo, procuramos identificar em neoplasias associadas a agressão actínica uma correlação entre MT e NO e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A expressão de MT foi avaliada imunohistoquimicamente por meio da técnica streptavidina-biotina-peroxidase, sendo expressa em índices de distribuição de marcação, ou seja, um índice que refletiu o percentual de marcação tumoral associado a intensidade desta marcação. A concentração de NO tumoral foi mensurado indiretamente pela concentração de nitrito e nitrato por meio da técnica de GREISS, sendo os valores expressos em μMoles . A mensuração de iNOS tumoral foi realizada pela técnica de Western-blott, revelados pela técnica da quimioluminescência com os valores expressos em índices de densidade óptica (IOD). A análise de correlação foi feita a partir do teste de Spearman. Nossos resultados mostraram ausência de correlação entre as variáveis estudadas. Estes achados sugerem que o papel da MT, da iNOS e do NO na carcinogênese actínica pode ser de forma não dependente.

ABSTRACT

Metallothionein (MT) is a protein with 6 to 7 kD of molecular weight which has a high affinity for heavy metal, specially zinc. It acts as a natural zinc store, and has been related to cell protection mechanism at free radical aggression. Recent finds suggests a protective role to MT to actinic aggression. The nitric oxide (NO), an important cellular metabolite, has been identified in models of actinic aggression. It's unknown if your presence acts in a protective way, signaling a oxidative stress by the higher production of free radicals or if your presence acts directly on DNA damage, producing effect directly in the carcinogenesis. An hypothetic mechanism suggests that NO may be associated with MT induction, that acts as a protector whereas your metal quelant action stimulated MT's genetic activation because of higher intracellular zinc concentration. Another mechanism that attaches the action of MT and NO could be apoptosis. In this study, we tried to identify a correlation of MT expression and NO production with iNOS in the neoplasias associated with actinic aggression. The expression of MT was evaluated immunohistochemically by using the streptavidin–biotin–peroxidase technique, being expressed in distribution marking index, that reflects the tumor marking percentage associated with the marking intensity. The NO in the tumor was measured indirectly with nitrite and nitrate concentrations by using Greiss technique, expressing the values in μmol . The iNOS measurement was realized using Western Blot technique, revealed by the chemo luminescence technique with the values expressed in absorbance index. The correlated analysis was performed by Spearman test. Our results showed absence of correlation among the variables. These findings suggests that the role of MT, iNOS and NO in the actinic carcinogenesis can be in a independently way.

INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno que se origina das células basais da epiderme e seus apêndices, possui malignidade local, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos. Seus componentes celulares se assemelham às células indiferenciadas e imaturas do estrato basal, apresentando um estroma característico. Ocorre basicamente na face, usualmente como lesões únicas¹³. Embora muitos dos CBCs sejam originados em áreas da pele que estão relativamente protegidas do sol, como o couro cabeludo e atrás das orelhas, está amplamente aceito que a UVB é o principal fator etiológico na gênese do CBC.²

A metalotioneína (MT), proteína descrita na década de 50, compõem uma classe de proteínas intracelulares não-enzimáticas com presença marcante de cisteína (23% a 33%) e ausência de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Possuem também alto conteúdo de metais pesados (4 a 12 átomos por mol), ligados covalentemente a apoproteína pelos grupos sulfúricos (tióis) dos resíduos de cisteína. A ligação a metais bivalentes (principalmente ao zinco) e a outros compostos (como as espécies reativas do oxigênio) constitui a principal função biológica das MTs no processo de detoxificação celular¹⁷⁻²⁰. Funcionando como reservatório intra-celular de zinco, participa nos processos de reparo, transcrição e replicação do DNA. Além disto, a MT tem sido associada à proteção celular contra a citotoxicidade da radiação ionizante e à captura de radicais livres, sugerindo um importante papel dessa proteína na proteção contra o estresse oxidativo³⁷⁻³⁵⁻⁷⁻⁸⁻¹¹⁻¹²⁻³¹. Desse modo, poderia efetuar uma função protetora para as células pela redução do dano produzido por radicais livres. Em contrapartida, sua sobre-expressão em células neoplásicas tem indicado maior agressividade tumoral e resistência a quimio e radioterapia³⁰⁻¹⁴⁻³⁸.

A iNOS ou Isoforma II (130 K-Da) não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolisacárides bacterianos e/ou

citocinas³⁴. Esta isoenzima também pode ser chamada de macNOS (macrophage NO synthase), é uma enzima cálcio independente. Vários autores consideram que qualquer célula do organismo tem a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, envolvendo-se em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, estando este mecanismo presente na maioria dos processos inflamatórios e autoimunes.

A iNOS está envolvida na proliferação celular²², no crescimento celular e no controle do ciclo celular. Seu papel no câncer é multidimensional, podendo ser tanto promotora –promovendo a angiogênese–, quanto um inibidor tumoral, mediando a apoptose¹⁹. Já foi demonstrado que durante a inflamação crônica, a exposição prolongada do meio ao NO pode iniciar e aumentar a carcinogênese no homem³⁹. Atua na mediação da formação de nitrosaminas carcinogênicas, danosas ao DNA, favorecendo a neovascularização, vasodilatação e ativação de metaloproteases³⁶.

A citotoxicidade mediada pelo NO resulta de sua reação com o radical livre superóxido (O_2^-), produzindo um poderoso oxidante, o peroxinitrato ($ONOO^-$). O que o torna particularmente tóxico é a sua notável estabilidade como ânion em pH alcalino, ao contrário do NO que é altamente instável³. O NO pode danificar diretamente o DNA pela desaminação de bases purinas e pirimidinas, resultando em mutações e quebra das fitas do DNA²⁹.

Nem todas as células são igualmente susceptíveis aos efeitos tóxicos do NO, e pouco se sabe sobre os meios de defesa contra o NO e seus metabólitos tóxicos, tanto nas células produtoras quanto nas células alvos de sua ação. Uma hipótese seria que uma superexpressão de MT reduziria a sensibilidade da célula quanto aos danos provocados pela produção de NO³³. O NO aeróbico pode nitrozilar os grupos tióis da MT *in vitro*²⁵ e a ligação da MT com o cádmio é liberada pela exposição ao NO *in vitro*²⁸ Essas observações implicam que o NO age como quelante de metais dos grupos sulfidrilas da MT, assim permitindo a liberação do zinco ou cádmio da MT, esses metais livres estimulariam a expressão do gene da MT, levando assim a um maior nível de MT induzida²¹,

outro meio de liberação do metal pelo NO seria pela destruição dos feixes de ligação entre o zinco com os grupos tióis ¹.

A exposição aos raios UVA e UVB, causam injúria à pele humana. Os raios UVB danificam diretamente o DNA, enquanto os efeitos deletérios dos raios UVA envolvem a fotossensibilidade das células alvo e a geração de espécies reativas do oxigênio ¹⁶. A exposição aos raios UVB estão relacionados tanto na expressão da iNOS como da MT. JENKINS, CHARLES e THONSEN 1995, demonstraram que raios UVA e UVB da radiação solar levam a uma superexpressão do mRNA de iNOS, e, experimentalmente, a MT induzida em animais protegeria o tecido e as células contra a radiação UV *in vitro* e *in vivo* ¹⁸⁻²³. A exposição a radiação UVB induz uma forte expressão da MT epidermal em camundongos normais ³².

O objetivo desse trabalho foi estudar a correlação existente entre MT, iNOS e NO, em CBC sólido, estudando a expressão do iNOS pela técnica de Western Blot; a concentração de nitrito e nitrato (como prova da produção de NO) pela reação de Greiss, e a expressão da MT pela técnica de imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para esta pesquisa, 16 casos de CBC sólido, obtidos através de biópsias excisionais indicadas para diagnóstico após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes.

Para a evidenciação imuno-histoquímica da MT foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram obtidos cortes histológicos de três micrômetros de espessura a partir de fragmentos teciduais das lesões, fixados em formalina e incluídos em parafina, montados em lâminas de vidro, previamente recobertas com organossilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os cortes foram desparafinados em duas passagens por soluções de xilol, realizadas à temperatura ambiente e à 37°C por 20 e 30 minutos, respectivamente. Os cortes histológicos foram hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%) e submetidos à solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol, para remoção do pigmento formólico. Após uma lavagem rápida em banhos de água destilada, os cortes foram submetidos a

tratamento com tampão EDTA (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid), 1 M, em ambiente de microondas, à potência máxima, em três ciclos de cinco minutos cada, com dois minutos de descanso à temperatura ambiente entre cada ciclo, para recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados.

Após resfriamento, alcançando o equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena. Previamente à incubação do anticorpo primário, os cortes foram imersos por 10 minutos em solução bloqueadora de biotina endógena (Dako, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, foram lavados em água corrente por 5 minutos e incubados com o anticorpo monoclonal anti-MT (Clone E9, Dako, Carpinteria, CA, USA) em diluição de 1:300, por 18 horas. Seguindo-se a lavagem com tampão PBS, foi incubado com anticorpo secundário biotilado (kit StrAviGen® MultiLink para fosfatase alcalina, Biogenex, San Ramon, CA, USA) na diluição de trabalho de 1:800 e o complexo estreptavidina-biotina (Dako, Carpinteria, CA, USA), em diluição de 1:300, ambos em câmara úmida, por 30 minutos. Entre essas etapas, os cortes foram lavados por solução de tampão PBS, pH 7,4, em três banhos de 10 minutos.

A revelação da reação foi desenvolvida a partir de solução cromógena contendo 12 mg de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 120 ml de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, passada em filtro duplo. Após a filtração, adicionou-se 1,2 ml de peróxido de hidrogênio a 10 volumes, incubando-se os cortes nessa solução durante três minutos. Em seqüência, os cortes foram lavados em água corrente, por cinco minutos e então, contracolorados pela hematoxilina de Mayer, por 3 minutos. Seguiu-se desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanizados em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Foram utilizados controles positivos, empregando-se fragmentos de carcinomas lobular e ductal de glândulas mamárias, conhecidamente positivos para MT. O controle negativo foi obtido a partir de omissão do anticorpo primário.

Para a análise da imuno-marcação da MT nas massas tumorais, todos os cortes foram examinados com aumento de 40x (aumento original). Em cada lâmina foram considerados 50% dos campos, incluídos de forma aleatória. O

procedimento consistiu da verificação da percentagem de área tumoral corada pela marcação com MT ⁵. Para esse fim, foi utilizado um “software” para análise de imagens (HL-Image++97I, Western Vision – Flash Bus MV Lite, Plus, Pro, USA), produzidas por microscopia de luz visível (Olimpus BH2, Japan) e capturadas por câmera de vídeo (Sony, CCD IRIS, Japan), utilizando o recurso “Image Thresholding” ⁴⁻⁹.

Estabeleceu-se um índice qualitativo de intensidade e quantitativo de percentual de marcação tumoral, a partir dos quais formulou-se um índice semi-quantitativo de intensidade e distribuição da marcação (ID). Foram considerados para o índice qualitativo os parâmetros de intensidade de marcação fraca, moderada e forte, baseados no padrão de marcação identificado na pele normal considerado como moderado. Assim, para a obtenção do ID, a marcação fraca teve o seu percentual de área corada multiplicada por um, a marcação moderada teve seu valor multiplicado por dois, e aquela considerada forte teve o valor da área marcada multiplicada por três. No final, obteve-se uma escala de ID cujo valor máximo foi três. Casos nos quais o ID foi menor ou igual a 0,3 foram considerados negativos; aqueles em que o ID foi maior que 0,3 e menor que um foram considerados de expressão FRACA da MT, e aqueles com índice maior ou igual a um foram considerados de expressão FORTE ²⁷⁻¹⁰.

Para análise de iNOS alíquotas pré-pesadas das amostras dos tecidos foram homogeneizados por três minutos, em gelo, em tampão de extração ⁶ contendo Hepes 40mM pH 7.7, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 0.1 mM e PMSF 0.5 mM, utilizando-se um homogeneizador (OMINUTOSUTOSI-MIXER Waterbury, CT. USA) com microsonda.

As amostras dos homogeneizados foram então centrifugadas a 40.000 g a 4^oC (Hitachi rotor 27). Das amostras do sobrenadante foi feita a precipitação de proteínas com TCA 50% e uma nova centrifugação a 15000 x g a 4^oC. Os sedimentos obtidos do precipitado foram ressuspensos em tampão da amostra (Tris- HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 1%; bromofenol blue 0,025%, e 10µl de 2-mercaptoetanol) numa concentração de 5µg/µl. A seguir, as amostras foram fervidas à 100^oC e estocadas a -20^oC. A concentração de proteína total nas frações foi determinada pelo método de Bradford (1976) tendo como padrão a

soro albumina bovina (BSA). O sobrenadante foi usado para dosagem de nitrito/nitrato.

A análise do perfil de polipeptídios foi feita usando o sistema descontínuo descrito por Laemmli & Favre (1973) e o sistema de placas de vidro descrito por Studier (1973). A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita em placas de vidro de dimensões de 11x 9x 0,06 cm, utilizando géis com gradiente de 5-16% .

As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas eletroforéticamente a 80mA por 5 horas, para membrana de nitrocelulose, utilizando-se como tampão de transferência constituído de Tris- HCl 25mM, glicina 190mM , metanol 20%. A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,2% em ácido tricloroacético 3% por 5 minutos e, a seguir, lavada com água deionizada.

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% e TBS-T) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS-T, três ciclos de 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário para NOS II (Clone 54, BD Transduction Laboratories, CA. USA) em diluição de 1:2500 por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram lavadas em TBS-T, 3 ciclos de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugados com peroxidase por 1 hora. A reatividade dos anticorpos foi detectada pelo sistema de quimiluminescência segundo o kit ECL e protocolo do fabricante (Amersham-Pharmacia-Biotech, UPPSOLA, Sweden): a membrana foi incubada com solução de detecção (solução A e B 1:1) por 1 minuto e colocada dentro de um cassete de revelação. O filme de raios-X foi colocado sobre a membrana com tempo de revelação variando entre 1 a 10 minutos em câmara escura. O filme foi então mergulhado em solução reveladora (Kodak) por 1 minuto, lavado em água e mergulhado em solução fixadora (KodaK) por 1 minuto. então revelado. As bandas identificadas no filme foram analisados e quantificadas quanto as suas densidades ópticas no programa Image Máster VDS software, versão 2.0 (Amersham-Pharmacia, UPPSOLA, Sweden) obtendo o índice de densidade ótica (IOD).

A concentração de nitrito e nitrato foi determinada pela reação de Greiss¹⁵. Foram utilizadas placas com 96 poços de fundo chato (*Nunc-Maxsorp*, Rochester, NY, USA) onde foi depositado 50µl de cada amostra em duplicata, com a subsequente detecção do nitrito e nitrato com 50µl de reagente de Greiss. A curva padrão de nitrito foi feita usando solução estoque de NaNO₂ 1M e água milli-Q. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de absorbância a 540nm.

Os resultados de produção de NO em µM e de expressão da iNOS indicado pelo índice de densidade óptica (IOD) foram convertidos a uma média e as comparações entre médias foram feitas pelo teste *t* de Student para as medidas que apresentaram normalidade, considerando o intervalo de confiança de 95%. Foram considerados significativos estatisticamente valores em que $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* PROPHET, versão 2.0.

RESULTADOS

Em função das limitações impostas pela quantidade de tecido e sobrenadante das amostras utilizadas, não foi possível fazer o estudo da correlação a partir de todas as amostras relacionadas. Desta forma, os valores referentes a IOD foram obtidos a partir do ensaio de 18 casos. Nesta amostra, observou-se uma variação de IOD de 13,66 a 214,84; com média de $77,80 \pm 47,46$. Em relação a dosagem de NO, foram utilizados 16 casos, com os quais se obteve valores que variaram de 0,77 a 7,23; apresentando uma média de $2,42 \pm 2,05$. Já a mensuração de MT foi realizada a partir de 18 casos, cujo ensaio resultou em valores variando de 0,17 a 1,62; com uma média de $0,69 \pm 0,48$.

Para a análise de correlação entre a dosagem de NO e os valores de IOD de iNOS (Figura 1) foram considerados 14 casos de CBC sólido pareados, dos quais obteve-se a média de produção de NO de $2,53 \pm 2,18$ µM, A média do IOD foi igual a 82,90, com desvio padrão igual a $\pm 51,04$. A análise da correlação foi baixa indicando que os índices não estão variando de forma proporcional ($r = -0,1982$).

Para a análise de correlação entre a dosagem de NO e a expressão de MT (Figura 2) foram analisados 13 casos de CBC sólido, cuja média de produção foi de $2,76 \pm 2,15 \mu\text{M}$. O valor da média do ID para MT foi de $0,68 \pm 0,49$. A análise da correlação foi baixa indicando que os índices não estão variando de forma proporcional ($r = -0,2724$).

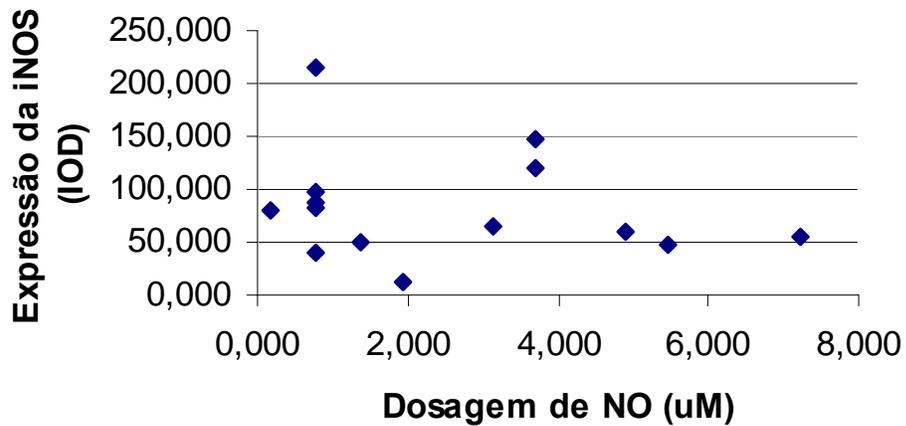


Figura 1. Diagrama de dispersão do Óxido Nítrico (NO) e Óxido Nítrico Sintase induzida (Inos) nos Carcinomas Basocelulares Sólidos

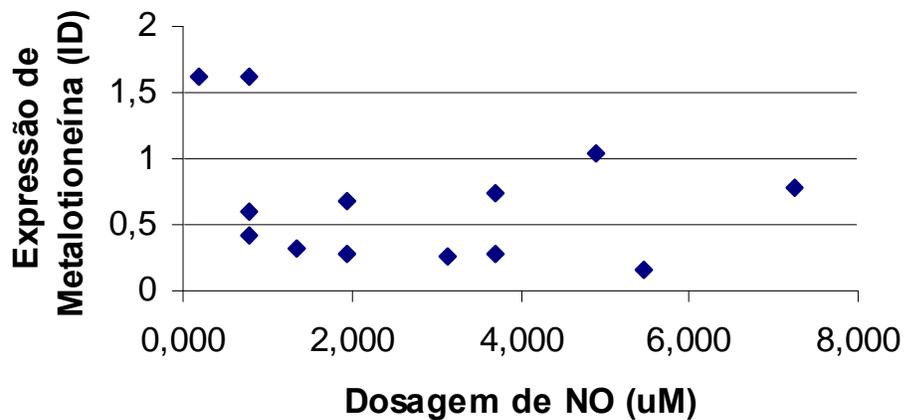


Figura 2. Diagrama de dispersão da expressão de Metalotioneína dada pelo índice de distribuição da marcação (ID) e a dosagem de óxido nítrico (NO) nos casos de CBC sólidos.

Para a análise de correlação entre a expressão de MT e a expressão de iNOS foram utilizados dados obtidos a partir de 16 casos de CBC sólido, para os quais o valor médio de ID para MT foi de $0,71 \pm 0,50$. Para o IOD da iNOS a média foi igual a $78,89 \pm 49,32$. A análise da correlação foi baixa indicando que os índices não estão variando de forma proporcional ($r = 0,1437$).

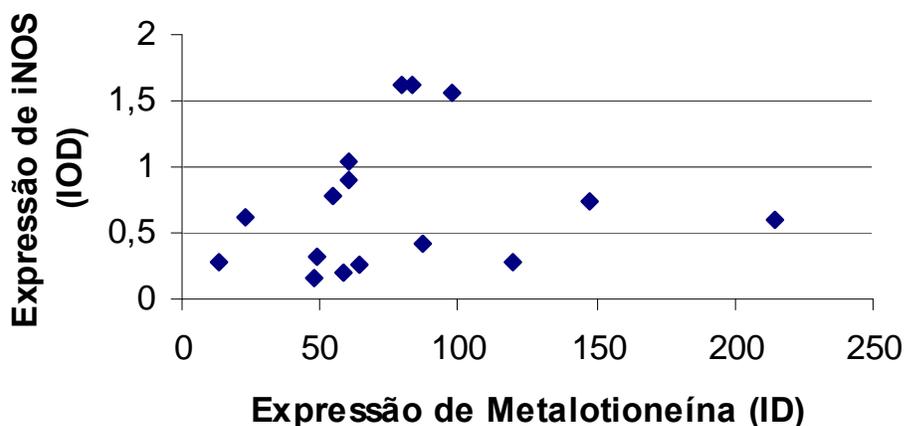


Figura 3. Diagrama de dispersão da expressão dos valores de IOD para Óxido Nítrico Sintase Induzida (IOD) e aqueles referentes a expressão de metalotioneína dados em índice de distribuição da imunomarcagem (ID) nos casos de CBC sólidos

DISCUSSÃO

Estudando a relação entre o iNOS e o NO esperávamos encontrar uma correlação positiva pois o iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Uma relação entre a MT e o NO também era esperada pois o NO age como quelante de metais dos grupos sulfidrilas da MT, permitindo a liberação do zinco ou cádmio da MT, e esses metais livres estimulariam a expressão do gene da MT, levando assim a um maior nível de MT induzida ²¹. E uma correlação entre a iNOS e a MT seria explicada pela exposição crônica do carcinoma basocelular aos raios UVA e UVB, essa radiação promove a expressão tanto do iNOS quanto da MT ²³⁻³².

O NO, e os seus produtos metabólicos, como o peroxinitrato também poderia induzir a expressão da MT, pois essa é a principal função desta proteína.¹⁷⁻²⁰. Tanto o iNOS/NO como a MT estão envolvidos numa série de eventos relacionados a carcinogênese, como angiogênese e apoptose²⁴, e também interferem no DNA. O NO pode danificar diretamente o DNA pela desaminação de bases purinas e pirimidinas, resultando em mutações e quebra das fitas do DNA²⁹, e a MT poderia remover átomos de zinco da p53, proteína que possui importantes funções no controle do ciclo celular e do crescimento da célula, alterando sua conformação espacial gerando um fenótipo nulo, mas não mutante, desse gene supressor tumoral, favorecendo a instabilidade genômica essencial nos mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral.

Nesse estudo procurou-se encontrar correlação entre iNOS, NO e MT, pois eles estão diretamente, ou indiretamente, envolvidos na carcinogênese e na progressão tumoral. Entretanto nas condições deste trabalho os resultados obtidos não foram suficientes para demonstrar essa correlação em CBC sólido.

O CBC sólido é o mais brando dos tumores de pele malignos, refletindo baixos níveis de stress oxidativo celular e de agressões genômicas que se refletissem nos níveis das moléculas pesquisadas. Outro aspecto que não poderia fugir a nossa análise é o baixo número de casos utilizados que poderia ter inviabilizado o poder estatístico da amostra. Não obstante, não foi possível encontrar dados na literatura que permitissem uma maior exploração dos nossos achados.

Faz-se necessário maior investigação nessa área, em especial com a montagem de modelos experimentais *in vitro* nos quais estas correlações poderiam ser medidas sob circunstâncias experimentais mais bem controladas.

REFERÊNCIAS

1. ARAVINDA KUMAR, C.T.; CEULEMANS, J. e DELEY, M. *Nitric oxide induces Zn²⁺ release from metallothionein by destroying zinc-sulphur clusters without concomitant formation of s-nitrosothiol*. **Biochem. J.**, v.344, p. 253-258, 1999.

2. BALES, ES et al. *Characterization of Molecular Defects in Xeroderma Pigmentosum Group C*. **Nat - Genet.** v. 5, n. 4, p. 413-17, 1993.

3. BECKMANS, J.S.; KOPPENOL, W.H. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly*. **Am. J. Physiol**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

4. BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; WALDEMARIN, K.C.A.; *Morphometry of the celular nuclei as diagnosis method of the histocytoma, transmissible veneral tumor (TVT) abd mastocytoma in dog*, **1st International Conference on Bioinformatics and computational Biology**, Ribeirão Preto, 2003.

5. BRENNAN, P.A.; UNAR, T.; BOWDEN, J.; HOBKIRK, A.; SPEDDING, A.V.; CONROY, B.; ZAKI, G. e MACPHERSON, D.W. *Nitric oxide syntase expression is downregulated in basal cell carcinoma of dthe head and neck*. **British journal of oral and maxillofacial surgery**, v.38, p.633-636, 2000.

6. CHENEY, R. E. , O'SHEA, M. K., HEUSER, J. E. , COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S., *Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity*. **Cell**, v.75, p.13-23. 1993.

7. CHERIAN, M. G.; JAYASURYA, A.; BOON-HUAT BAY; *Metalloyhioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis*, **Mutation Research**, v. 533, p. 201-209, 2003.

8. CHUBATSU, L. S. e MENEGHINI, R. *Metallothionein protects DNA from oxidative damage*. **Biochem. J.**, v. 291, pt. 1, p. 193-198, 1993.

9. COSTA, L.F.; CESAR, R.M.; *Shape Analysis and Classification; Theory and Practice*. CRC Press. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. p248-251/660. 2001.

10. DOUGLAS-JONES, A. G.; SCHMID, K. W.; BIER, B.; HORGAN, K.; LYONS, K.; DALLIMORE, N. D.; MONEYPENNY, J. e JASANI, B. *Metallothionein expression in duct carcinoma of the breast*. **Human Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 217-222, 1995.

11. EBADI, M. e IVERSEN, P. L. *Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy*. **Gen. Pharmacol.**, v. 25, n. 7, p. 1297-1310, 1994.

12. EBADI, M.; LEUSHEN, M. P.; EL-RAFAEY, H.; HAMADA, F. M. e ROJAS, P. *The antioxidant properties of zinc and metallothionein. Neurochem. Int.*, v. 29, n. 2, 1996.
13. ELDER, D.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; JOHNSON JR. B.; **Lever's Histopatology of the skin**; eighth edition, Lippincott. Raven pp. 1073, 1997.
14. ELGOHARY, W. G.; SIDHU, S.; KREZOSKI, S. O.; PETERING, D. H. e BYRNES, R. W. *Protection of DNA in HL-60 cells from damage generated by hydroxyl radicals produced by reaction of H₂O₂ with cell iron by zinc-metallothionein. Chem. Biol. Interact.*, v. 115, n. 2, p. 85-107, 1998.
15. GREEN, H.J., HUGSON, R.L., ORR, G.W., RANNEY, D.A. *Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in prograssive exercise. J Appl Physiol.*v.54, p. 1032-1038, 1983.
16. GRUIJ, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. Methods Enzymol*, v. 319, p. 356-366, 2000.
17. HAMER, D. H. *Metallothionein. Ann. Rev. Biochem.*, v. 55, p. 913-951, 1986.
18. HANADA, K. *Photoprotective role of MT in UV-injury MT-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B. Jornal Dermatological Science*, v. 23, s. 1, p. 51-56, 2000
19. JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THONSEN, L.L. et al. *Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 4392-4396, 1995.
20. KÄGI, J. H. e SCHÄFFER, A. *Biochemistry of metallothionein. Biochemistry*, v. 27, n. 23, p. 8509-8515, 15, 1988.
21. KATAKAI, K.; LIV, J.; NAKAJINA, K.; KEEFER, L.K.; WOOLKES, M.P. *Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc band to MT, Toxicology Letters*, v. 119, p. 103-108, 2001.
22. KATO, S.; ESUMI, H.; HIRANO, A.; KATO, M.; ASAYAMA, K. OHAMA, E.; *Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human brain tumors: relationships of iNOS to superoxide dismutase (SOD) proteins (SOD1 and SOD2), Ki-67 antigen (MIB-1) and p53 protein. Acta Neuropathol.* V.105, p.333-340, 2003.

23. KOBAYASHI, S.; HIROTA, Y.; SAYATO-SUZUKI, J.; TAKEHAMA, M.; NISHIMURA, H.; NISHIMURA, N. e TOHYAMA, C. *Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts*. **Photochem. Photobiol.**, v. 59, n. 6, p. 650-656, 1994.
24. KONDO, Y.; RUSNAKI, J. M.; HOYUT, D. G.; SETTINERI, C. E.; PITT, B. R. e LAZO, J. S. *Enhanced apoptosis in metallothionein-null cells*. **Mol. Pharmacol.**, v. 52, n. 2, p. 195-201, 1997.
25. KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; SCHMIDT, T.; ZENKE, F.T.; DASTING, I.; WESENER, J.R.; BETTERMANN, H.; BREUNING, K.D.; BACHOFEN, V. *Nitric oxide destroys zinc-sulfur cluster inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC 9*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V. 200, p. 1105-1110, 1994.
26. LAEMMLI, U. K, FAVRE, M. *Maturation of the head of bacteriophage T4*, **J. Mol. Biol.**, v. 80, p. 575-599, 1973.
27. McCLUGGAGE, W. G.; MAXWELL, P.; HAMILTON, P. W. e JASANI, B. *High metallothionein expression is associated with features predictive of aggressive behavior in endometrial carcinoma*. **Histopathology**, v. 34, n. 1, p. 51-55, 1999.
28. MISRA, R.R.; HOCHADEL, J.F.; SMITH, G.T.; COOK, J.C.; WAALKES, M.P.; WINK, D.A. *Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein*. **Chem. Res. Toxicol.** V. 9, p. 326-332, 1996.
29. NGUYENT; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L. et al. *DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3030-3034, 1992
30. PITT, B. R.; SCHWARZ, M.; WOO, E. S.; YEE, E.; WASSARLOOS, K.; TRAN, S.; WANG, W.; MANNIX, R. J.; WATKINS, S. A.; TYURINA, Y. Y.; TYURIN, V. A.; KAGAN, V. E. e LAZO, J. S. *Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 4, p. 856-865, 1997.

31. QUESADA, A. R.; BYRNES, R. W.; KREZOSKI, S. O. e PETERING, D. H. *Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites.* **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 2, p. 241-250, 1996.
32. REEVE, V.E.; NISHIMURA, N.; BOSNIC, M.; MICHALSKA, A.E.; CHOO, K.H.A. *Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice.* **Imunology**, v. 100, n.3, p. 399-404, 2000.
33. SCHWARZ, M.A.; LAZO, J.S.; YALOWICH, J.C.; ALLEN, W.P.; WHITMORE, M.; *Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA damaging effects of nitric oxide.* **Pharmacology**, v. 92, p. 4452-4456, 1995.
34. STUEHR DJ, CHO HJ, KWON NS, WEISE MF, NATHAN CF. *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 7773-7777, 1991.
35. TEMPLETON, D. M. e CHERIAN, M. G. *Toxicological significance of metallothionein.* **Methods Enzimol.**, v. 205, p. 11-24, 1991.
36. THONSEN, L.L. e MILES, D.W. *Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from human tumors.* **Cancer Metastasis Rev.** v. 17, p. 107-118, 1998.
37. THORNALLEY P. J. e VASÁK, M. *Possible role for metallothionein against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals.* **Biochem. Biophys. Acta**, v. 827, n. 1, p. 36-44, 1985.
38. WANG, G. W.; SCHUSCHKE, D. A. e KANG, Y. J. *Metallothionein-overexpressing neonatal mouse cardiomyocytes are resistant to H₂O₂ toxicity.* **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 1, pt. 2, p. 167-175, 1999.
39. WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W. e MITCHELL, J.B. *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer.* **Carcinogenesis.**, v. 19, p. 711-721, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Uma maior expressão da metalotioneína em pele normal exposta a radiação actínica foi encontrada quando esta foi comparada à pele normal não exposta, indicando uma possível indução dessa proteína pelos raios UVA e UVB da radiação solar.

A imunomarcagem nos tumores mostrou padrões em mosaico, com células bem marcadas e células negativas no mesmo campo da neoplasia.

Uma maior expressão da metalotioneína foi encontrada nos carcinomas espinocelulares cutâneos (CEC) sugerindo uma relação entre a expressão da metalotioneína e a agressividade do tumor. A associação é reforçada quando se observa que a expressão dessa proteína foi significativamente menor no carcinoma basocelular (CBC), um tumor menos agressivo.

A expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) foi maior no CEC e menor no CBC quando comparado aos valores obtidos em estudo de pele normal, sugerindo que a expressão da iNOS, como da metalotioneína, está relacionado à tumores mais agressivos.

Nas condições desse estudo, a produção de óxido nítrico (NO) não variou entre as amostras estudadas, sugerindo uma produção de NO independente da expressão de iNOS desses casos.

A baixa expressão de iNOS em CBC pode ser um fator relacionado ao fato desse tipo de lesão raramente metastatizar, devido a possível ação angiogênica do NO.

Uma possível correlação entre iNOS, NO e metalotioneína era esperado. No entanto, nas condições experimentadas não encontramos nenhuma correlação. Isso sugere uma independência entre as variáveis estudadas.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Odontologia

Área de Patologia Buco-Maxilo-Facial

AV. Pará, 1720, bloco 2N – HCUFU - 38900-405 – Uberlândia (MG)

Tel: 32182263/fax: 32182626/e-mail: pássaro@ufu.br

Projeto de pesquisa: “ESTUDO DA METALOTIONEINA, p53 E ÓXIDO NÍTRICO EM LESÕES ASSOCIADAS A RADIAÇÃO ACTÍNICA.”

Coordenador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Responsável: Mestrando Paulo César Borges Júnior

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____,
concordo em participar desta pesquisa científica como voluntário. Estou ciente de que me submeterei a um procedimento cirúrgico de biopsia para remoção de lesão de pele com o objetivo de realizar o diagnóstico ou como forma de tratamento indicado para lesões com diagnóstico definitivo. Tenho conhecimento pleno de que estarei doando fragmentos de tecidos recolhidos do material retirado na cirurgia e que as intervenções cirúrgicas serão realizadas em ambiente hospitalar (HC-UFU), sob os cuidados do profissional de saúde responsável, e que terei acesso aos resultados provenientes do exame do material colhido. Estou ciente que a minha identidade será preservada e que se eu recusar em participar, não terei prejuízos em relação ao meu tratamento. Outrossim, não receberei benefícios financeiros em participar desta pesquisa e, desde já, autorizo a utilização dos dados coletados para o seu desenvolvimento e publicação.

Voluntário:
