

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA (MT), METALOPROTEINASE-2 (MMP-2) E  
INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASE-2 (TIMP-2) EM CARCINOMAS  
BASOCELULARES DE PELE

JULIANA SAYURI KURIBAYASHI

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Julho – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA (MT), METALOPROTEINASE-2 (MMP-2) E  
INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASE-2 (TIMP-2) EM CARCINOMAS  
BASOCELULARES DE PELE

JULIANA SAYURI KURIBAYASHI

ADRIANO MOTA LOYOLA


Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Julho – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA (MT), METALOPROTEINASE-2 (MMP-2) E  
INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASE-2 (TIMP-2) EM CARCINOMAS  
BASOCELULARES DE PELE

JULIANA SAYURI KURIBAYASHI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Homologado pela coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas em 07/12/04

Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.ª Dr.ª Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Ana Angélica Almeida Barbosa

Uberlândia – MG  
Julho – 2004

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Shinobu Kuribayashi e Elsy Marília de Oliveira Kuribayashi, por sempre me apoiarem e me incentivarem na realização dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, Thiago e Lilian, por sempre estarem ao meu lado.

Ao Lívio, pelo companheirismo e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Adriano Mota Loyola, pela paciência e disposição em me orientar, pelos ensinamentos e incentivo.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola pelos ensinamentos e oportunidades no laboratório de Bioquímica.

Ao professor Dr. Ademir Rocha pelos diagnósticos das biópsias e pela disposição em esclarecer as dúvidas que surgiram.

Ao professor Dr. Marcelo Belleti pela disponibilidade do laboratório de captura de imagens.

Ao professor Dr. Sérgio Vitorino Cardoso pelo auxílio na elaboração do piloto de contagem de células.

À professora Dr. Denise Garcia pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Ignez Candelori e à Ângela Maria Pereira pela colaboração nas reações imunoistoquímicas.

À Rosy Iara Maciel Azambuja Ribeiro e ao Paulo César Borges Júnior por sempre me ajudarem e me incentivarem.

A todos meus amigos de bancada dos laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular e Patologia Bucal pela convivência agradável e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário.

Aos meus colegas e amigos da 52ª turma de Ciências Biológicas por terem tornado os anos de faculdade inesquecíveis.

A todos meus amigos, que mesmo às vezes não entendendo o meu trabalho, nunca deixaram de torcer por mim.

## RESUMO

O trabalho teve por objetivo 1) avaliar quantitativamente as expressões de metalotioneína (MT), metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) e inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2) em carcinomas basocelulares (CBCs) humanos e 2) investigar nestas lesões a existência de correlações entre a expressão de MMP-2, TIMP-2 e MT. **Metodologia:** As expressões imunoistoquímicas de MMP-2, TIMP-2 e MT foram avaliadas em 31 casos de CBC. Foram realizadas análises comparativas das expressões de MMP-2, TIMP-2 e MT e da correlação das expressões antigênicas nos diferentes tipos de CBC. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças significativas entre os percentuais médios de marcações para MMP-2 e TIMP-2 nos dois tipos de CBC estudados. Também não foram encontradas correlações significativas entre MT e MMP-2 e entre MMP-2 e TIMP-2. **Conclusão:** As expressões de MMP-2 e TIMP-2 independem do subtipo histológico de CBC e não houve correlações estatísticas entre as expressões de MMP-2 e TIMP-2 e entre as expressões de MMP-2 e MT nas lesões estudadas. A expressão de MMP-2 no epitélio neoplásico é, na média, menor que a de TIMP-2. As marcações para MT e MMP-2 foram fracas na maioria dos casos de CBC.

**PALAVRAS-CHAVE:** CARCINOMA BASOCELULAR; METALOPROTEINASE DE MATRIZ-2; METALOTIONEÍNA.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Metaloproteinases	02
1.2. Inibidores teciduais de metaloproteinases	03
1.3. Metalotioneína	03
2. MATERIAL E MÉTODOS	06
2.1. Amostras	06
2.2. Padronização do ensaio imunoistoquímico	07
2.3. Protocolo da reação imunoistoquímica	07
2.4. Identificação e avaliação da marcação imunoistoquímica de MMP-2, TIMP-2 e MT	08
3. RESULTADOS	10
3.1. Padronização	10
3.2. Imunomarcção de MT, MMP-2 e TIMP-2	11
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÃO	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele tem como principal causa a exposição crônica aos raios ultravioleta (UV) do sol. Os três tipos de cânceres mais frequentemente relacionados à exposição actínica são o carcinoma basocelular (CBC), o carcinoma espinocelular (CEC) e o melanoma maligno.

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

No CBC, os componentes celulares neoplásicos, semelhantes às células do estrato basal do epitélio, permeiam um estroma característico, dispondo-se, histologicamente, em diferentes padrões arquiteturais (sólido, glandular, queratótico e esclerodermiforme). Ocorre mais comumente na pele da cabeça e pescoço, usualmente como lesões únicas. Raramente é diagnosticado na região palmar e plantar. (ELDER *et al.*, 1997).

O CBC apresenta baixa taxa de metástases (0,028 a 0,5% dos casos) (BERLIN *et al.*, 2002). O subtipo sólido é mais indolente, enquanto que o esclerodermiforme apresenta maior agressividade. O CBC possui “malignidade local”, podendo invadir e destruir tecidos adjacentes, inclusive ossos (ELDER *et al.*, 1997).

O desenvolvimento do processo metastático pressupõe invasão vascular pelas células neoplásicas e sua disseminação hematogênica ou linfática. Na sua dinâmica, os êmbolos neoplásicos aderem à superfície de células endoteliais distantes, emigram através das junções interendoteliais, degradando a membrana basal periendotelial. O processo continua com a degradação da matriz extracelular (MEC), migração e proliferação celular, com o

estabelecimento do crescimento neoplásico secundário: as metástases. A degradação da MEC é, sem dúvida, um elemento chave na invasão tumoral e no estabelecimento de metástases (HONG *et al.*, 2000).

As metaloproteínas de matriz têm grande importância na progressão tumoral e geração de metástase, pois degradam a matriz extracelular. Aumento na atividade das MMPs correlaciona-se positivamente com invasão e o potencial metastático em vários tipos de câncer (VARANI *et al.*, 2000).

### 1.1. Metaloproteínas

As metaloproteínas (MMPs) constituem uma família de mais de 20 metaloenzimas que clivam vários componentes da matriz extracelular (MEC) (MCCAWLEY & MATRISIAN, 2000). São secretadas como proenzimas latentes e requerem ativação através de clivagem proteolítica do domínio amino-terminal rico em cisteína, estando sua atividade na dependência de zinco (WANG *et al.*, 2000).

Várias subclasses têm sido definidas e agrupadas de acordo com a especificidade ao substrato: collagenases, gelatinases, estromelinas, MMP tipo membrana (MT-MMPs) e elastases, havendo similaridades estruturais entre os membros da família.

O colágeno tipo IV é um componente crítico da membrana basal. Nele laminina, heparan sulfato, proteoglicanos e outros componentes secundários são organizados. A membrana basal influencia o crescimento e sobrevivência das células epiteliais e a MEC serve como reservatório de grande variedade de moléculas ativas biologicamente. A proteólise dos componentes da MEC por MMPs libera fragmentos com atividades biológicas distintas que alteram estas funções (WERB, 1997).

Duas MMPs, as gelatinases A (MMP-2, de 72 kD) e B (MMP-9, de 92 kD), degradam colágeno tipo IV como substrato primário e são distintas pela sua capacidade de degradar gelatina (MCCAWLEY & MATRISIAN, 2000). Como o colágeno tipo IV é um dos maiores constituintes da membrana basal, maior atenção tem sido dada ao papel das MMPs -2 e -9 no processo metastático (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2000).

Em cânceres de pele, a expressão de MMP-2 foi mais acentuada em CEC comparativamente àquela identificada em CBC (BOWDEN *et al.*, 2002).



## 1.2. Inibidores teciduais de MMPs (TIMPs)

A atividade proteolítica das MMPs é primariamente controlada pelos TIMPs. Estes são pequenas proteínas de 21-28 kDa que bloqueiam a atividade das MMPs ligando-se a estas pelo sítio de zinco, altamente conservado. Há, atualmente, quatro TIMPs conhecidos, todos possuindo resíduos de cisteína conservados, requeridos para a formação de seis pontes dissulfeto. O domínio amino-terminal é requerido para atividade inibitória das MMPs. Experimentos indicam que muitas regiões das TIMPs estão envolvidas na formação do complexo com colagenases intersticiais, e que uma seqüência específica compreendendo duas pontes dissulfeto da TIMP-1 é altamente efetiva na inibição da atividade colagenolítica (STAMENKOVIC, 2000).

Os TIMPs são produzidos por células tumorais e pelo tecido hospedeiro, podem se ligar a formas ativas ou latentes de muitas MMPs, funcionando como proteínas anti-metastáticas (BREW *et al.*, 2000). O TIMP-2 inibe a MMP-2 ao se ligar ao sítio ativo dessa enzima via sua região inibitória N-terminal (BERNARDO & FRIDMAN, 2003).

Tem sido observado que a relação entre MMP e TIMP pode estar associada ao comportamento tumoral, favorecendo ou não a invasividade da lesão e o desenvolvimento de metástases (STAMENKOVIC, 2000).

## 1.3. Metalotioneína

A metalotioneína (MT), proteína descrita na década de 50, tem sido estudada por suas propriedades associadas a neutralização 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 (HAMER, 1986; KÄGI & SCHÄFFER, 1988). Caracteriza-se pelo baixo peso molecular (6 a 7 kDa), sendo constituída nos mamíferos por 61 ou 62 resíduos de aminoácidos, com presença marcante de cisteína (23 a 33%) e ausência de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Possui também alto conteúdo de metais pesados (4 a 12 átomos por mol), ligados covalentemente a apoproteína pelos grupos sulfúricos (tióis) dos resíduos de cisteína (CHAN *et al.*, 2002).

A proteção oferecida pela metalotioneína contra danos celulares mediados por agentes oxidativos tem sido intensamente pesquisada. Acredita-se que a proteína, quando exposta a

ambiente celular oxidante, libere os átomos metálicos aos quais está ligada (como por exemplo o zinco, que por sua vez inibe diretamente o dano oxidativo por diversas vias) e forme pontes dissulfeto intramoleculares. Essas pontes são ávidas captadoras de elétrons, favorecendo, assim, a redução do dano potencial dos radicais livres, como as hidroxilas (LAZO *et al.*, 1998; ROMERO-ISART & VASÁK, 2002; TAPIERO & TEW, 2003).

A MT se liga principalmente ao zinco, podendo também ligar-se ao cobre em tecidos mamíferos não expostos a excesso de metais não essenciais que apresentam alta afinidade de ligação a essa proteína (prata, mercúrio e cádmio) (ROMERO-ISART & VASÁK, 2002; HAQ *et al.*, 2003; SABER & PISKIN, 2003).

A MT tem sido considerada a principal proteína relacionada à regulação da biodisponibilidade de zinco. Recebendo e doando esse metal a outros componentes celulares, participa na modulação de diferentes vias metabólicas intracelulares (SUHY *et al.*, 1999). A presença de átomos de zinco na estrutura de p53 ativa é fundamental para a aquisição de uma conformação compacta e altamente estável. MÉPLAN *et al.* (2000) demonstraram que a MT é capaz de modular a conformação, a ligação ao DNA e a atividade transcricional de p53, mediante a doação e remoção do átomo de zinco necessário para a aquisição da estrutura funcional da proteína supressora tumoral.

O zinco encontrado nas células insulares pancreáticas tipo beta é essencial na produção de dímeros de insulina. Partindo deste pressuposto, TOMITA (2000), demonstrou por técnica imunistoquímica, alta expressão de MT em células insulares normais. Em células neoplásicas, todavia, o autor encontrou baixa expressão de MT, condizente com a reduzida capacidade de produzir e armazenar insulina observada na neoplasia. Paralelamente, tem sido demonstrada a presença de MMPs em células insulares pancreáticas normais e seu envolvimento nos processos de remodelação, diferenciação e desdiferenciação tanto das ilhotas normais, quanto dos tumores pancreáticos endócrinos. Tendo em vista que a atividade das MMPs também depende de zinco, estes achados podem sugerir a participação da MT na modulação da atividade de MMP tanto no tecido pancreático normal como neoplásico.

HAGA *et al.* (1996) reportaram que a atividade de gelatinases é aumentada por metalotioneínas, que podem ser ativadores endógenos da enzima. Sugeriram que a MT age inativando o complexo MMP-TIMP ou que a MT catalisa a ativação auto-catalítica da MMP.

Também encontraram correlação significativa entre os níveis teciduais de MTs e atividade colagenolítica em modelos de metástase em murinos (HAGA *et al.*, 1998).

Baseados nestes achados, consideramos que a MT pode atuar na carcinogênese, modulando a ativação e atividade das MMPs, devendo esta relação expressar-se também na progressão dos CBCs. Esta hipótese baseia-se no fato de que as MMPs serem dependentes funcionais de zinco e da MT ser a principal molécula reguladora de sua biodisponibilidade.

Assim, o objetivo deste trabalho é 1) padronizar a reação imunoistoquímica para os anticorpos anti-MMP-2 e anti-TIMP-2; 2) avaliar quantitativamente as expressões de MT, MMP-2 e TIMP-2 em CBCs humanos; e 3) investigar nestas lesões, a existência de correlações entre as expressões de MMP-2, TIMP-2 e MT.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Foi utilizado um total de 31 casos de CBCs sólidos e esclerodermiformes provenientes dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, fixados em formalina (10%) por no mínimo 24 horas e incluídos em parafina. Destes casos, foram obtidas secções histológicas de 5µm de espessura coradas pelo método de hematoxilina e eosina, que foram utilizadas para confirmação do diagnóstico de CBC esclerodermiforme (sete casos) e CBC sólido (24 casos) conforme ELDER *et al.* (1997).

### **2.2. Padronização do ensaio imunistoquímico**

Fragmentos de biópsias de melanomas, carcinomas epidermóides de língua e de carcinoma ductal de mama fixados em formol a 10% e incluídos em parafina provenientes do mesmo serviço, foram seccionados a 3 µm de espessura e colhidos em lâminas de vidro recobertas com organossilano, para padronização das reações imunistoquímicas para detecção dos antígenos TIMP-2 e MMP-2.

Foi empregada como referência a técnica da avidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981), testada para diferentes condições laboratoriais (incubação com anticorpo primário por 18 e 24 horas a 4°C; resgate antigênico em microondas com tampão citrato 10mM pH 6,0, tampão EDTA 1mM pH 8,0, tampão TRIS/HCl 10mM pH 9,0 e substituição de complexo avidina-biotina-peroxidase por complexo streptavidina-biotina-peroxidase-StreptABC). Nestes protocolos

foram utilizados os anticorpos anti-MMP-2 (monoclonal, LABVISION, clone CA-4001, Fremont-CA, USA) e anti-TIMP-2 (policlonal, CHEMICON, Temecula-CA, USA), anticorpos secundários anti-IgG de camundongo biotinilado, obtido comercialmente (VECTOR, Burlingame-CA, USA) e anti-IgG de coelho biotinilado, obtido comercialmente (VECTOR, Burlingame-CA, USA) a partir da diluição recomendada pelo fabricante (anti-TIMP-2 1:100 – 1:200; anti-MMP-2 1:50 – 1:100).

### 2.3. Protocolo da reação imunoistoquímica

A seqüência de procedimentos efetuados no ensaio imunoistoquímico é descrita a seguir: (1) desparafinação por três passagens em soluções de xilol; (2) reidratação em cadeia descendente de etanol; (3) lavagem em água corrente; (4) imersão em solução de resgate antigênico, processadas em microondas, à potência máxima, em três ciclos de cinco minutos cada, para os tampões TRIS/HCl e EDTA; e em potência máxima por 20 minutos em tampão citrato. O grupo de secções histológicas que não foi submetido ao resgate ficou armazenado em água destilada no período pré-incubação. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com quatro banhos de três minutos em água oxigenada 10 volumes, seguido de lavagem em água corrente por dez minutos e imersão em PBS pH 7,4 por cinco minutos.

Para bloquear a coloração de fundo devido à interações hidrofóbicas entre tecidos e proteínas reagentes, utilizou-se solução de soro albumina bovina a 1% com azida sódica a 0,1% em PBS na diluição dos anticorpos primários.

Os cortes foram incubados com um máximo de 200 µL de anticorpo primário a 4°C por 18 horas. Após o período de incubação os cortes foram colocados à temperatura ambiente por 30 minutos, lavados delicadamente e submetidos a dois banhos de cinco minutos cada em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4.

Em seguida procederam-se a incubação com anticorpo secundário por 30 minutos a 37°C; lavagem cuidadosa com dois banhos de cinco minutos cada em PBS; incubação do complexo StreptABC (DAKO, Carpinteria-CA, USA) por 30 minutos a 37°C; lavagem cuidadosa com dois banhos de cinco minutos cada em PBS.

A revelação da reação foi desenvolvida com incubação por três minutos em solução cromógena, constituída de água oxigenada 10 volumes adicionada à solução de 3, 3'-

diaminobenzidina (DAB) (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis-MO, USA) em tampão PBS 0,03%. Em seqüência, os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos, submetidos a contra-coloração em hematoxilina de Mayer por cinco minutos, lavados em água corrente por cinco minutos, desidratados em álcoois, diafanizados em xilóis e montados em lâminulas com Entellan (MERCK, Alemanha).

Os parâmetros utilizados nas reações imunoistoquímicas para detecção de MT foram aqueles obtidos em ensaios prévios desenvolvidos em nosso laboratório (CARDOSO, 2001; BORGES JÚNIOR, 2004), a saber: anticorpo monoclonal anti-MT (clone E9, Dako, Carpinteria, CA, USA) na diluição 1:300, incubado por 18 horas, em câmara úmida a 4°C. Para recuperação antigênica foi empregada a solução de EDTA, 1mM, pH 8,0, 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, completando-se o volume original de tampão caso necessário.

Carcinoma ductal de mama foi utilizado como controle positivo. Omissão de anticorpos primários foi empregada como controle negativo das reações.

#### **2.4. Identificação e avaliação da marcação imunoistoquímica de MMP-2, TIMP-2 e MT**

Para a avaliação de MMP-2 e TIMP-2, foram contadas 2000 células de cada caso e calculou-se a porcentual de células marcadas para ambos os antígenos pesquisados em cada subtipo de CBC. As células foram observadas em campos seqüenciais, à microscopia óptica com aumento final de 400X (objetiva X ocular).

O número ideal de células a serem contadas (2000) foi determinado em estudo piloto para verificação da resposta média de observações por corte, estabelecendo a estabilidade no procedimento (SAMPAIO, 1998; CARDOSO, 2001).

Para a análise da imunomarcção da MT nas massas tumorais, todos os cortes foram examinados com aumento final de 40X (objetiva X ocular). Em cada lâmina foram considerados 50% dos campos, escolhidos de forma aleatória. O procedimento consistiu da verificação da porcentagem de área tumoral corada pela marcação com MT. Posteriormente, 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. 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 multiplicada por três.

No final, obteve 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 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 forte (BORGES JÚNIOR, 2004).

Todas as avaliações foram feitas com a utilização de 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).

Para observar se houve diferenças de expressões de MMP-2 e TIMP-2 nos diferentes tipos histológicos de CBC, foram feitas comparações entre médias pelo teste *t* de Student para as medidas que apresentaram normalidade, considerando o intervalo de confiança de 95%, com valor de  $p < 0,05$ .

Para a análise de correlação entre as expressões de MMP-2 e TIMP-2, e entre MT e MMP-2 e TIMP-2, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, considerando o intervalo de confiança de 95%, com valor de  $p < 0,05$ .

Para a análise de correlação entre MT e MMP-2 foram utilizados apenas sete casos de CBCs do subtipo sólido.

As análises estatísticas foram feitas no programa PROPHET, versão 2.0 (Prophet Financial Systems Inc. Palo Alto, CA, USA).

### **3 - RESULTADOS**

#### **3.1. Padronização**

Consideramos aceitáveis os ensaios nos quais observou-se um poder de discriminação entre células marcadas e o fundo (não marcado). Além disto, consideramos sempre, como mais próximo da realidade, a existência de um padrão em mosaico para as expressões dos antígenos pesquisados, ou seja, presença de diferenças na intensidade de impregnação do cromógeno. Considerou-se também a presença de um bloqueio satisfatório pela ausência de impregnação de cromógeno nas hemácias. Segundo análise, ficou estabelecido que o anticorpo TIMP-2 apresentou melhor resultado utilizando-se o resgate antigênico em microondas com tampão citrato 10mM pH 6,0, no título de 1:300. Para o anticorpo MMP-2 verificou-se melhores resultados sem a utilização do resgate antigênico, com título de anticorpo primário de 1:30. Em ambas as situações a técnica desenvolvida foi a da StreptABC.

Cabe observar que a inclusão da utilização do melanoma nesta padronização baseou-se no fato de ser um tumor de pele, semelhante em topografia as lesões utilizadas nos experimentos. No entanto, a presença de grande quantidade de pigmentação melânica nas lesões dificultou a discriminação da marcação antigênica.



### 3.2. Imunomarcação de MT, MMP-2 e TIMP-2

Pôde-se notar marcação da MT em toda camada basal e parabasal da epiderme. 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 pêlo e em fibroblastos do estroma.

A expressão da MT 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 mosaico refletindo desde ausência até forte expressão em um mesmo tumor (Figura 1A).

Observou-se que 33% dos CBCs foram negativos para MT. A expressão foi fraca para 44% dos CBCs e 22% apresentaram expressão forte. O percentual de marcação para MT variou de 20 a 54% de área tumoral marcada.

A marcação para MMP-2 foi bastante heterogênea: algumas áreas bem marcadas com áreas sem marcação no mesmo tumor. No geral, a marcação foi fraca e muitas vezes só pôde ser evidenciada no maior aumento (400X, objetiva x ocular) (Figura 1B).

Em relação à marcação de MMP-2, a expressão de TIMP-2 foi mais homogênea e intensa. No aumento de 40X (objetiva x ocular) já era possível discriminar as áreas marcadas (Figura 1C).

A marcação da MMP-2 e do TIMP-2 foi encontrada apenas no citoplasma. Observou-se marcação nos epitélios de revestimento e glandular.

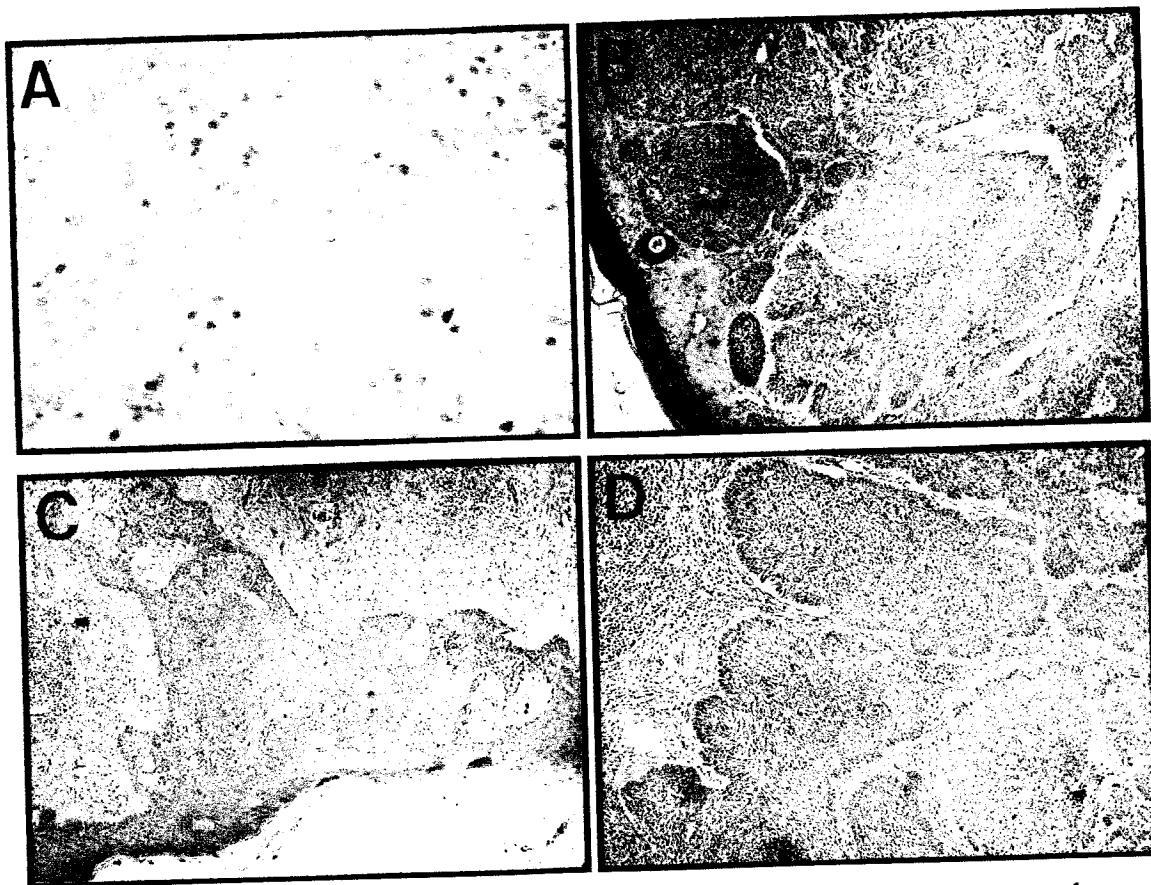


Figura 1: A) CBC marcado com metalotioneína (aumento de 40X); B) CBC marcado com MMP-2 (aumento de 10X); C) CBC marcado com TIMP-2 (aumento de 10X); D) CBC corado pelo método de HE (aumento de 10X).

O CBC do subtipo sólido apresentou um percentual de  $74,91 \pm 9,39$  de células neoplásicas positivas para TIMP-2 e  $36,78 \pm 28,54$  para MMP-2. No CBC do subtipo esclerodermiforme o percentual médio de células marcadas para TIMP-2 foi de  $74,12 \pm 9,98$  e  $35,67 \pm 35,6$  de células tumorais marcadas para MMP-2. Não foram encontradas diferenças significativas entre os percentuais médios de marcação para ambos os antígenos nos dois tipos de CBC estudados (Figuras 2 e 3).

Os índices de expressão dessas proteínas foram arbitrariamente divididos em duas categorias: positivo (MMP-2, células positivas  $> 50\%$  das células tumorais; TIMP-2  $> 10\%$ ) e negativo (MMP-2, células positivas  $\leq 50\%$  das células tumorais; TIMP-2  $\leq 10\%$ ) (YOSHIZAKI *et al.*, 2001).

De acordo com os índices propostos, foram encontrados 35,48% de lesões positivas e 64,52% de lesões negativas para MMP-2. Para TIMP-2 o percentual foi de 100% para positivas e de 0% para negativas.

Não foram encontradas correlações significativas entre MT e MMP-2 (Figura 4) ( $r = 0,542321$  e  $p = 0,2085$ ) no CBC sólido. Da mesma forma, não foram encontradas significâncias estatísticas nas correlações entre índices de marcação para MMP-2 e TIMP-2 nos CBCs sólidos ( $r = -0,043391$  e  $p = 0,8404$ ) (Figura 5) e esclerodermiformes ( $r = -0,238344$  e  $p = 0,6068$ ) (Figura 6).

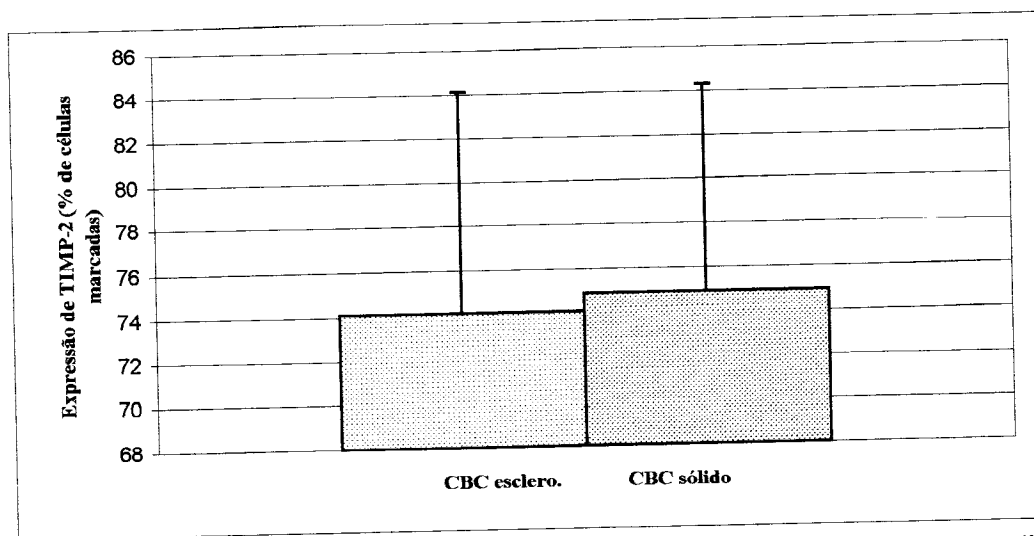


Figura 2: Expressão de TIMP-2 em CBCs nos subtipos esclerodermiforme e sólido a partir da porcentagem de células marcadas. Observa-se que não houve diferença de expressão de TIMP-2 nos subtipos de CBC ( $t = 0,191$  e  $p = 0,8495$ ).

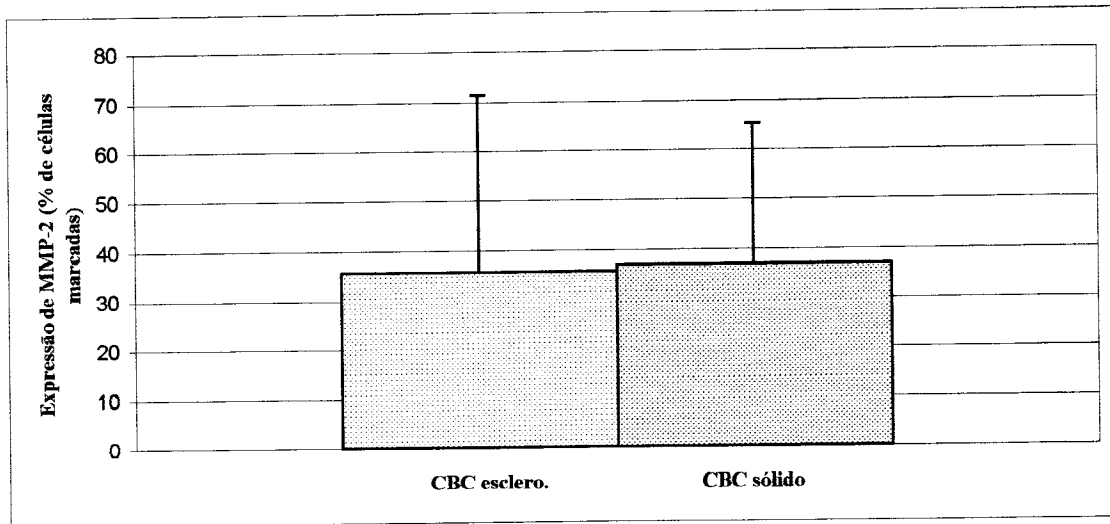


Figura 3: Expressão de MMP-2 em CBCs nos subtipos esclerodermiforme e sólido a partir da porcentagem de células marcadas. Observa-se que não houve diferença de expressão de MMP-2 nos subtipos de CBC ( $t = 0,086$  e  $p = 0,9323$ ).

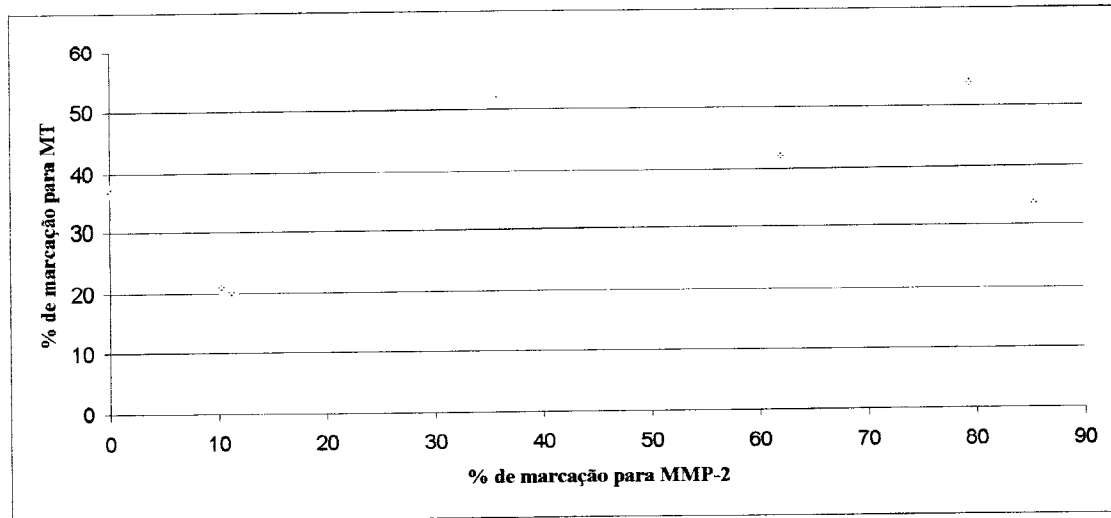


Figura 4: Diagrama de dispersão de MMP-2 e MT em CBCs sólidos ( $r = 0,542321$  e  $p = 0,2085$ ).

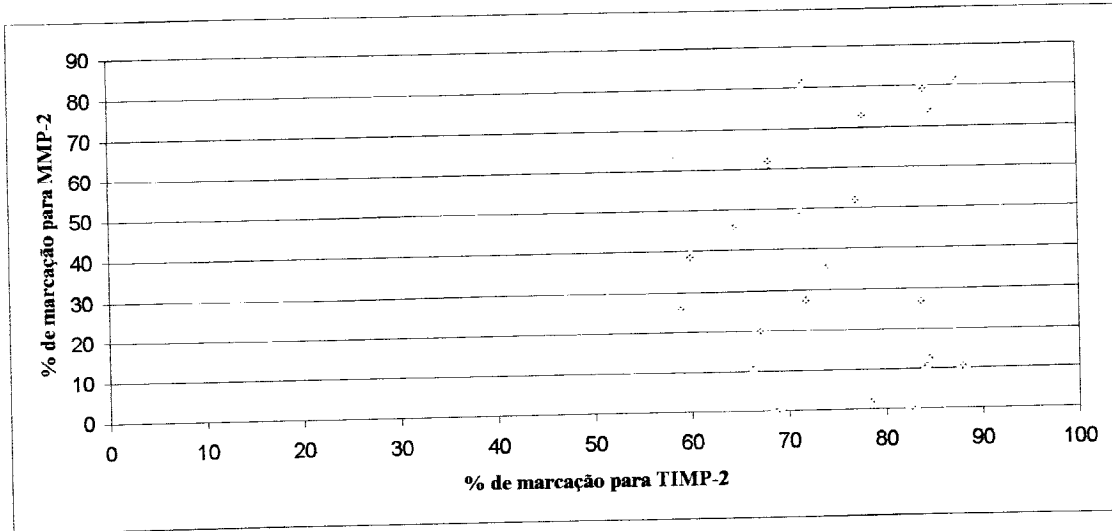


Figura 5: Diagrama de dispersão de MMP-2 e TIMP-2 nos CBCs sólidos

( $r = -0,043391$  e  $p = 0,8404$ ).

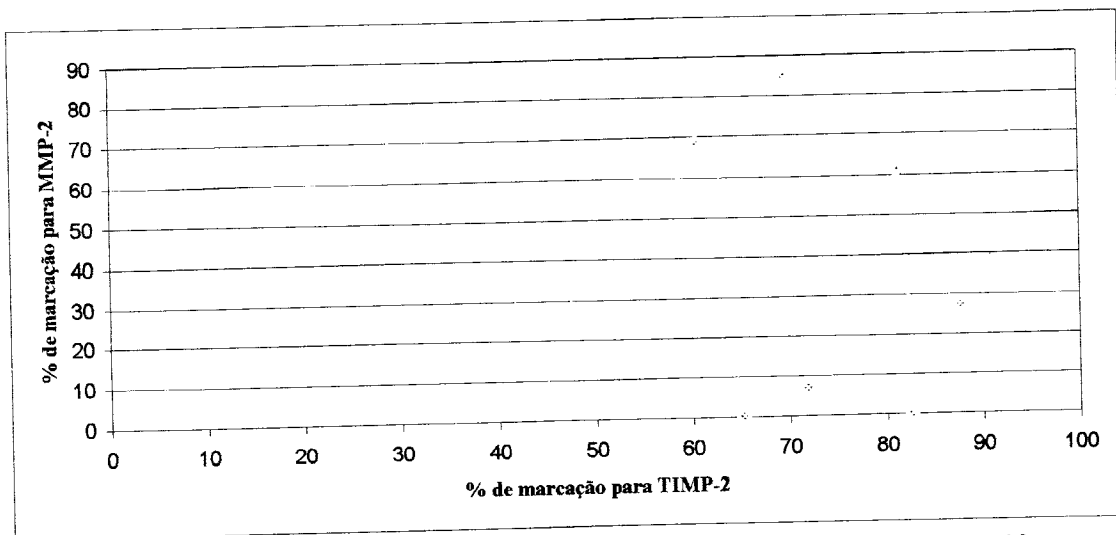


Figura 6: Diagrama de dispersão de MMP-2 e TIMP-2 nos CBCs esclerodermiformes

( $r = -0,238344$  e  $p = 0,6068$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

As metaloproteinases de matriz desempenham papel crucial no desencadeamento da cascata metastática. De forma semelhante, tem sido considerado que a presença de TIMPs nos tecidos favorece maior resistência a disseminação tumoral, suportando a hipótese da diversidade potencial dos tumores na capacidade metastatar (invasão tecidual e estabelecimento de uma colônia neoplásica independente do foco primário) (CHILDERS *et al.*, 1987; WAGNER *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que uma relação entre estas moléculas poderia, em parte, explicar o comportamento diferencial das neoplasias quanto ao seu comportamento. Desta forma, um tumor que apresente baixa taxa de invasividade, como o CBC, deveria expressar uma relação inversa entre MMP-2 e TIMP-2: maiores quantidades de TIMP-2 e menor expressão de MMP-2. Baseados nos índices de imunomarcção definidos no presente estudo, os CBCs (independentemente dos tipos) foram negativos para MMP-2 e positivo para TIMP-2, achado compatível com os pressupostos considerados anteriormente.

Neste sentido, WAGNER *et al.* (1996) encontraram altos níveis teciduais de TIMP-2 em CBCs comparativamente aos carcinomas espinocelulares (CECs), de comportamento mais agressivo.

KURAHARA *et al.* (1999), por outro lado, sugeriram que a metástase dos tumores é regulada por vários tipos de MMPs e que a superprodução de MMPs parece ser mais importante para a metástase do que a produção de TIMPs *in vivo*. A expressão de MMPs é claramente mais abundante em CEC do que em CBC, o que pode refletir na diferença da capacidade de invasão desses tumores. A baixa expressão de TIMPs não se correlaciona necessariamente com aumento

de invasividade, tanto que tumores malignos e metastáticos frequentemente superexpressam TIMPs *in vivo* (KERKELA & SAARIALHO-KERE, 2003).

Embora as médias dos percentuais de expressão para MMP-2 (tanto no CBC sólido quanto no esclerodermiforme) fossem menor que as do TIMP-2, percebe-se em ambos os casos, um desvio padrão bastante alto. Isto deve refletir a heterogeneidade de expressão destes antígenos. Possivelmente, esta deve ser a explicação para o fato de que, embora houvesse uma correlação negativa, tenha sido baixíssima e sem significado estatístico.

HONG *et al.* (2000) observaram que o CEC oral é heterogêneo para o potencial de produzir MMP-2. A produção de MMPs por células normais é regulada por fatores de crescimento e/ou citocinas. Assim, a heterogeneidade parece ser devido a propriedades diferenciais de cada célula do CEC em termos de expressão de receptores específicos para esses agentes. Se essa hipótese for aplicável ao CBC, fica explicado o alto desvio padrão associado às médias de marcação para MMP-2 e TIMP-2 que classificou a nossa amostra como heterogênea.

No presente estudo, observamos também que não houve diferença significativa nas expressões de TIMP-2 e MMP-2 entre os subtipos histológicos de CBC. WAGNER *et al.* (1996) reportaram que não houve uma correlação significativa entre as expressões de TIMP-2 com os subtipos histológicos de CBC. HONG *et al.* (2000) também demonstraram uma ausência de correlação entre os diferentes tipos histológicos de CEC oral e expressão de MMP-2. Eles concluíram que a diferenciação histológica do CEC oral não afeta a expressão de MMP-2 pelas células cancerosas.

Vale lembrar a baixa sensibilidade proporcionada pela técnica para detecção do antígeno, o que pode ter comprometido a acuidade da mensuração. Novas abordagens técnicas deveriam ser consideradas, juntamente com o aumento da amostra, para permitir melhor juízo dos resultados. Além disto, não foi possível encontrar na literatura informações conclusivas sobre níveis definidos da expressão antigênica que indicam um comportamento agressivo. Quase sempre esta avaliação é realizada de forma comparativa entre grupos de tumores com diferentes gradações histológicas ou de comportamento clínico. Estes estudos, assim, tem um caráter exploratório, permitindo a visualização de indícios de significados que devem ser aperfeiçoados.

Vários estudos relataram a expressão de TIMP-2 por fibroblastos do estroma tumoral (WAGNER *et al.*, 1996; HONG *et al.*, 2000) e a expressão de MMP-2 no estroma adjacente ao tumor (THOMAS *et al.*, 1999; KERKELA & SAARIALHO-KERE, 2003). Usualmente, a

expressão epitelial tem recebido maior atenção quanto ao possível significado no comportamento tumoral. Se de um lado isto pode ser importante, poderíamos, por outro, estar subestimando o fenômeno já que, aparentemente, a atividade colagenolítica e sua inibição, resulta da ação do conjunto de moléculas teciduais. Assim, ao desconsiderarmos o estroma tumoral na avaliação dessas proteínas, não analisamos a real expressão de TIMP-2 e MMP-2 no microambiente tumoral.

A MT é um importante regulador homeostático da biodisponibilidade de zinco que pode alterar as funções de enzimas zinco-dependentes (SUHY *et al.*, 1999). As MMPs dependem de zinco para serem funcionalmente ativas. Baseado neste fato e em trabalhos que relatam as expressões concomitante de MMP e MT em alguns neoplasmas (TOMITA, 2000), esperávamos encontrar uma correlação entre as expressões dessas proteínas.

No entanto, nossos resultados não revelaram correlação entre MMP-2 e MT, embora ambos os antígenos tivessem baixas expressões nestas lesões (BOWDEN *et al.*, 2002; ROSSEN, 1997; BORGES JÚNIOR, 2004). A ausência de correlação pode ser explicada pelo fato de que as análises para identificar a marcação dessas proteínas foram diferentes. A marcação de MT foi analisada de forma abrangente no tumor e tecidos vizinhos enquanto que a avaliação da marcação de MMP-2 ficou restrita às células tumorais, desconsiderando-se o estroma adjacente.

É sabido que a MT é expressa tanto no tumor quanto no estroma adjacente (BORGES JÚNIOR, 2004) e que a MMP-2 é expressa principalmente pelo estroma tumoral (KERKELA & SAARIALHO-KERE, 2003). Dessa forma, a avaliação das expressões dessas proteínas pode não ter sido representativa da realidade, o que não nos levou ao resultado esperado.

Outras investigações devem ser realizadas no sentido de expandir os conhecimentos das relações entre MT e MMPs, no que tange ao papel da primeira na ativação e função da segunda não só no desenvolvimento embrionário dos tecidos como nos tumores deles originários.



## 5. CONCLUSÃO

No presente trabalho observamos que a expressão de MMP-2 no epitélio neoplásico é, na média, menor que a de TIMP-2 e que independe do tipo histológico.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os percentuais médios de marcação para MMP-2 e TIMP-2 nos CBCs sólido e esclerodermiforme. Também não houve correlação significativa entre MMP-2 e TIMP-2 nos CBCs sólidos ou esclerodermiformes.

As marcações para MT e MMP-2 no CBC foram fracas na maioria dos casos. No entanto, não foi encontrada significância estatística na correlação entre índices de marcação para MMP-2 e MT nos CBCs sólidos.

Os resultados encontrados sugerem que outros mecanismos independentes de MT podem atuar para modulação de MMP-2 nos CBCs. Outros estudos devem ser considerados na investigação de correlações entre a expressão total de MMP-2 nos tecidos adultos, embrionários e nos tumores deles decorrentes, bem como por modelos *in vitro* para aferir a real relação funcional entre estas moléculas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERLIN, J.M., WARNER, M.R., BAILIN, P.L. **Metastatic Basal Cell Carcinoma presenting as unilateral axillary lymphadenopathy: report of a case and review of the literature.** *Dermatol Surg*, 2002. 28:1082-84.
- BERNARDO, M.M., FRIDMAN, R. **TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP.** *Biochem J*, 2003. 374:739-45.
- BORGES JÚNIOR, P.C. **Estudo da metalotioneína, óxido nítrico sintase II e óxido nítrico em neoplasias cutâneas associadas à radiação actínica.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2004. 98p. (*Dissertação Mestrado em Bioquímica*).
- BOWDEN, G.T. **Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-b-light signaling.** *Nature Reviews*, 2004. 4:23-25.
- BOWDEN, J., BRENNAN, P. A., TIJANI, U., CRONIN, A. **Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Cutan Pathol*, 2002. 29: 585-589.
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. **Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function.** *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1477:267-283.

- CARDOSO, S.V. **Estudo da expressão imuno-histoquímica da metalotioneína em carcinoma epidermóide bucal.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 105p. (*Dissertação Mestrado em Patologia*).
- CHAN, J., HUANG, Z., MERRIFIELD, M.E., SALGADO, M.T., STILLMAN M.J. **Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques.** *Coord Chem Rev*, 2002. 233-234:319-339.
- CHILDERS, J.W., HERNANDEZ, A.D., KIM, J.H., STRICKLIN, G.P. **Immunolocalization of collagenase inhibitor in normal skin and basal cell carcinoma.** *J Am Acad Dermatol*, 1987. 17(6):1025-32.
- ELDER, D., ELENITSAS, R., JAWORSKY, C., LIPPINCOTT JR., B.J. **Lever's Histopathology of the skin.** 8<sup>a</sup> ed. Raven. 1997. 1073 p.
- HAGA, A., NAGASE, H., KITO, H., SATO, T. **Correlation between host metallothioneins and collagenases in murine metastasis models.** *Cancer Research Therapy & Control*, 1998. 5(3): 203-10.
- HAGA, A., NAGASE, H., KITO, H., SATO, T. **Effect of metallothioneins on collagenolytic activity of tumor gelatinase B.** *Cancer Research Therapy & Control*, 1996. 5(1):17-22.
- HAMER, D.H. **Metallothionein.** *Ann Rev Biochem*, 1986. 55:913-951.
- HAQ, F., MAHONEY, M., KOROPATNICK, J. **Signaling events for metallothionein induction.** *Mutat Res*, 2003. 533(1-2):211-26.
- HONG, S-D., HONG, S-P., LEE J-I., LIM C-Y. **Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential.** *Oral Oncology*, 2000. 36: 207-213.

- HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H. **The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** *J Histochem Cytochem*, 1981. 29: 577-580.
- KÄGI, J.H., SCHÄFFER, A. **Biochemistry of metallothionein.** *Biochemistry*, 1988. 27(23):8509-8515.
- KERKELA, E., SAARIALHO-KERE, U. **Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer.** *Experimental Dermatology*, 2003. 12:109-125.
- KURAHARA, S., SHINOHARA, M., IKEBE, T., NAKAMURA S., BEPPU, M., HIRAKI, A., TAKEUCHI, H., SHIRASUNA, K. **Expression of MMPs, MT-MMPs, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis.** *Head Neck*, 1999. 21(7):627-38.
- LAZO, J.S., KUO, S.M., WOO, E.S., PITT, B.R. **The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs.** *Chem Biol Interact*, 1998. 111-112:255-62.
- MCCAWLEY, L.J., MATRISIAN, L.M. **Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!** *Current Opinion in Cell Biology*, 2000. 13:534-540.
- MÉPLAN, C., RICHARD, M.J., HAINAUT, P. **Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells.** *Oncogene*, 2000. 19(46):5227-36.
- PUCCI-MINAFRA, I., MINAFRA, S., LA ROCCA, G., BARRANCA, M., FONTANA, S., ALAIMO, G., OKADA, Y. **Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis.** *Matrix Biology*, 2000. 20:419-427.

- ROMERO-ISART, N., VASÁK, M. **Advances in the structure and chemistry of metallothioneins.** *J Inorg Biochem*, 2002. 88(3-4):388-396.
- ROSSEN, K., HAERSLEV, T., HOU-JENSEN, K., JACOBSEN, G.K. **Metallothionein expression in basaloid proliferations overlying dermatofibromas and in basal cell carcinomas.** *Br. J. Dermatol*, 1997. 136(1): 30-34.
- SABER, R. PISKIN, E. **Investigation of complexation of immobilized metallothionein with Zn(II) and Cd(II) ions using piezoelectric crystals.** *Biosens Bioelectron*, 2003. 18(8):1039-46.
- SAMPAIO, I.B. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 1ª Edição. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. p. 12-13.
- STAMENKOVIC, I. **Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *Semin Cancer Biol*, 2000. 10(6):415-33.
- SUHY, D.A., SIMON, K.D., LINZER, D.I., O'HALLORAN, T.V. **Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation.** *J Biol Chem*, 1999. 274(14):9183-92.
- TAPIERO, H., TEW, K.D. **Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins.** *Biomed Pharmacother*, 2003. 57(9):399-411.
- THOMAS, G.T., LEWIS, M.P., SPEIGHT, P.M. **Matrix metalloproteinase and oral cancer.** *Oral Oncology*, 1999. 35:227-233.
- TOMITA, T. **Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms.** *Mod Pathol*, 2000. 13(4):389-95.

VARANI, J., HATTORI, Y., CHI, Y., SCHMIDT, T., PERONE, P., ZEIGLER, M.E., FADER, D.J., JOHNSON, T.M. **Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin.** *Br J Cancer*, 2000. Feb;82(3):657-65.

WAGNER, S.N., OCKENFELS, H.M., WAGNER, C., SOYER, H.P., GOOS, M. **Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by cutaneous squamous and basal cell carcinomas.** *J Invest Dermatol*, 1996. 106(2):321-6.

WANG, Z., JUTTERMANN, R., SOLOWAY, P.D. **TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo.** 2000.

WERB, Z. **Metalloproteases and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology.** *Cell*, 1997. 91:439-442.

YOSHIZAKI, T., MARUYAMA, Y., SATO, H., FURUKAWA, M. **Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma.** *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 2001. 95:44-50.