

ANDRESA COSTA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE
POLIMORFISMO NO GENE DA METALOPROTEINASE-9 E O
DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR
QUIMICAMENTE INDUZIDO PELO DMBA NA PELE DE
CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de DOUTOR, pelo Programa de
Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA
BUCAL, Área Biopatologia Bucal

ANDRESA COSTA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE
POLIMORFISMO NO GENE DA METALOPROTEINASE-9 E O
DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR
QUIMICAMENTE INDUZIDO PELO DMBA NA PELE DE
CAMUNDONGOS *HAIRLESS***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

São José dos Campos
2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Pereira, Andresa Costa

Avaliação da associação entre a presença de polimorfismo no gene da metaloproteinase-9 e o desenvolvimento do carcinoma espinocelular quimicamente induzido pelo DMBA na pele de camundongos *hairless* / Andresa Costa Pereira; orientador Luiz Eduardo Blumer Rosa. São José dos Campos, 2007.

83p.IL.

Tese (Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

1. Carcinoma de células escamosas – 2. Polimorfismo genético – 3. Metaloproteinase 9 da matriz.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de Julho de 2007.

Assinatura :

E-mail: andresa-cp@uol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pereira AC. Avaliação da associação entre a presença de polimorfismo no gene da metaloproteinase-9 e o desenvolvimento do carcinoma espinocelular quimicamente induzido pelo DMBA na pele de camundongos *hairless* [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

São José dos Campos, 18 de Julho de 2007.

Banca examinadora

1) Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

2) Prof. Assoc. Fábio Daumas Nunes

Departamento de Estomatologia

Faculdade de Odontologia da USP

3) Prof. Titular Francisco Gorgônio da Nóbrega

Faculdade de Ciências da Saúde e Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - UNIVAP

4) Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberback Brandão

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

5) Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu marido MARCO ANTONIO DIAS DA SILVA, presença fundamental na minha vida, por me ajudar a realizar meus sonhos e especialmente por ser parte deles.

Aos meus pais ANTONIO CARLOS PELOGGIA PEREIRA e LIDIA COSTA PEREIRA, não apenas pelos princípios de respeito, ética e perseverança, mas principalmente pelos ensinamentos de amor, que me guiarão por essa vida e pelas próximas.

Aos meus irmãos ANDRÉCOSTA PEREIRA e ADRIANA COSTA PEREIRA, meus grandes amigos, que amo tanto e que estarão sempre presentes no meu coração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Professor Adjunto LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA, pela amizade e pelo imenso apoio na busca dos meus objetivos, me ajudando a evoluir com a realização deste doutorado.

Ao meu supervisor no exterior Doutor SHU YU, por acreditar no nosso projeto e me oferecer a oportunidade de aprender em seu laboratório.

À minha amiga ELAINE DIAS DO CARMO, pelo companheirismo, apoio e amizade. Pessoa indispensável neste período, com quem pude aprender o significado de um verdadeiro trabalho em equipe.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP e ao seu Diretor Professor Adjunto PAULO VILLELA SANTOS JÚNIOR, por proporcionarem meu desenvolvimento acadêmico durante estes últimos cinco anos.

À Chefe do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal Professora Adjunta ANA SUELI RODRIGUES CAVALCANTE e a todos os professores e funcionários que estiveram presentes durante o curso.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal Professora Doutora CRISTIANE YUMI KOGA ITO, pela competência e dedicação ao nosso curso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, pela experiência proporcionada e pelo aprendizado único, fatores indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao ROSS LAXTON pela presença diária durante um ano e pela imensa paciência nesta etapa tão importante da minha vida profissional.

Ao Doutor JOHN HOLLOWAY e MATTHEW ROSE-ZERILLI pelos ensinamentos indispensáveis na fase experimental desta tese.

À Doutora HELMTRUDY ISOLD ROACH, pelo apoio em disponibilizar seu laboratório em Southampton.

Ao Professor Titular FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA, pela oportunidade de estagiar em seu renomado laboratório e por auxiliar no meu ingresso ao mundo da biologia molecular.

À Professora Doutora ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO, pessoa que muito admiro, por saber conciliar sua imensa competência à simplicidade de sempre estar pronta a ajudar.

À Professora Adjunta YASMIN RODARTE CARVALHO, por estar sempre presente no engrandecimento do nosso curso de Biopatologia.

À Professora Adjunta ROSILENE FERNANDES DA ROCHA, por ter conduzido tão bem nossa pós-graduação, buscando sempre o crescimento do curso.

Ao Professor Titular ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, por fazer parte do início, do desenvolvimento e da conclusão deste objetivo.

Ao Professor Doutor MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO pela presença sempre importante no meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor IVAN BALDUCCI, pela colaboração na análise estatística.

À Professora Doutora PAULA CRISTINA TREVILATTO pelas dúvidas sanadas e pelas dicas tão importantes, sempre com muita competência e alegria.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação que entendem o esforço dispensado para a confecção de uma tese.

À SUSANA UNGARO AMADEI, VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA, GISELLE SEGNINI SENRA, RENATA FALCHETE DO PRADO e ANGELA BOLANHO pela convivência constante, alegrando e completando cada um dos meus dias em São José dos Campos.

Às alunas de iniciação científica ANA PAULA PEREIRA MASA, MICHELINE BICA GUTTERRES e PAULA JULIANA TAVERNARO RUZA por fazerem parte da nossa equipe com tanto empenho e dedicação.

À funcionária do laboratório de Patologia ANA LOURDES DA SILVA MACHADO, não apenas pela imensa dedicação na confecção das lâminas histológicas, mas também pela amizade que se fez surgir nestes anos de convívio.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, ROSEMARY DE FÁTIMA SALGADO, ERENA MICHIE HASEGAWA, MARIA APARECIDA CONSIGLIO DE SOUZA e LÍLIAN FARIA DAS GRAÇAS pela paciência na solução das minhas dúvidas, em todos os momentos, mesmo à distância.

Às secretárias do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal SÍLVIA SCARPEL e IVONEIDE RAMOS LEANDRO, pela dedicação e atenção dispensada aos alunos.

Aos funcionários LOURIVAL JACOB e ANTONIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELOS, pelo auxílio no tratamento dos animais.

Às bibliotecárias ÂNGELA DE BRITO BELLINI e SILVANA ALVAREZ, pela atenção e paciência na normatização desta tese e a todas as funcionárias da biblioteca pelo auxílio a todos os alunos.

À LUCI MARIA SANT'ANA DUSSE e à sua família tão especial, por participarem de uma fase tão adorável e inesquecível.

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, por sempre torcerem por mim e por fazerem parte da família que tanto amo.

Aos mais novos membros da minha família, MARCO ANTONIO FREIRE DA SILVA, SANDRA LÚCIA GONÇALVES DIAS DA SILVA E JULIO LOURENÇO DIAS DA SILVA pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos, estando longe ou perto.

A todos os meus amigos que participam da minha vida e fizeram imensa falta neste ano distante.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Carcinogênese.....	14
2.1.1 Carcinogênese química.....	15
2.1.2 Carcinogênese química experimental em pele.....	16
2.2 Câncer de pele.....	18
2.2.1 Desenvolvimento do CEC.....	19
2.3 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs).....	20
2.3.1 MMP-9.....	22
2.4 Polimorfismos genéticos.....	24
2.4.1 Polimorfismos no gene da MMP-9.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Carcinogênese experimental.....	30
4.2 Análise fenotípica.....	31
4.2.1 Análise clínica.....	32
4.2.2 Análise histopatológica.....	32
4.3 Análise genotípica.....	33
4.3.1 Extração do DNA.....	34

4.3.2 Reação de PCR.....	34
4.3.3 Eletroforese.....	36
4.3.4 Análise das imagens.....	38
4.3.5 Seqüenciamento.....	40
4.4 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Análise fenotípica.....	42
5.1.1 Análise clínica.....	42
5.1.2 Análise histopatológica.....	44
5.2 Análise genotípica.....	48
5.3 Análises fenotípica x genotípica.....	51
5.3.1 Associação dos alelos com as características clinicopatológicas	51
5.3.2 Associação dos genótipos com as características clinicopatológicas.....	53
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO.....	65
8 REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO.....	82
<i>ABSTRACT</i>	83

Pereira AC. Avaliação da associação entre a presença de polimorfismo no gene da metaloproteinase-9 e o desenvolvimento do carcinoma espinocelular quimicamente induzido pelo DMBA na pele de camundongos *hairless* [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Para que ocorra a invasão das células epiteliais neoplásicas é necessário o rompimento da membrana basal, sendo que este processo depende, em grande parte, da ação enzimática realizada pela metaloproteinase-9 (MMP-9). O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese que variações no gene da MMP-9 influenciam as características clínicas e histopatológicas do carcinoma espinocelular. Noventa e quatro camundongos *hairless* foram submetidos à carcinogênese química (DMBA 0,5%) induzida em pele, durante 16 semanas. Na 17ª semana, os animais foram sacrificados e as lesões fotografadas e avaliadas clinicamente (com relação ao tamanho e à presença de ulceração). As lesões foram então biopsiadas e fixadas em formaldeído 10%, para posterior avaliação histopatológica (padrão de invasão, estágio de invasão e diferenciação celular). No momento da biópsia, foi retirado 0,5 cm da cauda de cada animal, para extração do DNA e avaliação da presença de polimorfismos de repetição CA no promotor do gene da MMP-9. Foi utilizado o teste qui-quadrado ($p < 0,05$) para avaliar a associação dos alelos e dos genótipos com as características clínicas e histopatológicas. Verificou-se uma associação entre o alelo com 25 repetições e o grau moderado de diferenciação celular. Concluiu-se que a presença de maior número de repetições CA no gene da MMP-9 pode estar relacionada com a redução na diferenciação celular do carcinoma espinocelular induzido quimicamente na pele de camundongos *hairless*.

PALAVRAS-CHAVE: carcinoma de células escamosas, polimorfismo genético, metaloproteinase 9 da matriz

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é uma neoplasia maligna dos queratinócitos da epiderme⁴⁵. Nesta patologia, as células neoplásicas apresentam, não apenas a capacidade de invadir o tecido conjuntivo subjacente⁸⁸, como também a de produzir metástase²⁰.

A indução de CEC em pele de camundongos já é bastante conhecida na literatura^{17,68,83,98,104}. Uma grande vantagem desta metodologia, comparada aos estudos em humanos, é que no modelo animal, muitas variáveis são controladas, principalmente devido à utilização do mesmo carcinógeno, tempo e tipo de exposição. Porém, apesar de existir este controle, os animais podem apresentar lesões com características clínicas e histológicas distintas^{3,68,98}. Soma-se a isso o fato de que, dentre as lesões classificadas como CEC, pode haver uma variação no estágio de invasão da neoplasia⁹.

Tendo em vista que com os modelos animais consegue-se minimizar as variáveis extrínsecas, acredita-se que a presença de diferentes fenótipos possa ser justificada por alterações no genótipo destes animais.

Desta forma, é interessante a investigação de regiões gênicas responsáveis pela produção de enzimas importantes durante o desenvolvimento da carcinogênese. A atividade de transcrição de um gene é parcialmente regulada pela região promotora⁸² e assim, a presença de polimorfismos genéticos específicos nesta região pode alterar a expressão da enzima.

A investigação da região promotora do gene da metaloproteinase da matriz extracelular-9 (MMP-9) é apontada como fator importante, visto que esta enzima apresenta função degradadora de

colágeno tipo IV^{33,38,44,90}, o que gera a destruição da membrana basal, que conseqüentemente permite os processos de invasão e metástase⁹⁰.

A elevada expressão da enzima MMP-9 está relacionada a casos de câncer bucal^{38,42}, carcinoma gástrico¹⁰³, carcinoma de cabeça e pescoço⁷⁹, carcinoma esofágico^{33,47}, câncer de mama⁵¹, carcinoma de endométrio¹⁸ dentre outros. Sendo que, sua expressão aumentada pode ser também relacionada com pobre diferenciação celular³³, alto grau de invasão^{18,42,47,103} e/ou metástase^{33,38,103}.

Em adição, esta metaloproteinase apresenta amplo papel no desenvolvimento do câncer experimental, uma vez que camundongos que apresentam deficiência na produção de MMP-9 possuem poucas lesões neoplásicas, com baixa densidade vascular⁴⁰, além de um reduzido número de metástases⁴⁴.

Na região promotora do gene da MMP-9, um polimorfismo do tipo microssatélite é encontrado, devido à presença de uma seqüência de repetições CA (Citosina-Adenina)^{81,102}. A redução do número de repetições CA está correlacionada com a diminuição da expressão do gene da MMP-9 em humanos⁸¹ e em camundongos²⁸.

Assim, visto que a presença do polimorfismo genético pode interferir na expressão da enzima MMP-9 nos tecidos e que, o nível desta enzima está relacionado com diferenciação celular, invasão e metástase de neoplasias, acredita-se que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante no desenvolvimento do CEC. Portanto, acredita-se que talvez seja possível identificar, com o auxílio da biologia molecular, um padrão de indivíduos com maior propensão para o CEC.

Desta maneira, o estudo de polimorfismos no gene da MMP-9 é importante na busca de um potencial marcador, não apenas para a susceptibilidade ao câncer, mas também auxiliando no plano de tratamento, para um melhor prognóstico, ou até mesmo na prevenção da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2006⁷, seriam contabilizados 472.050 novos casos de câncer, sendo 234.570 no sexo masculino e 237.480 no feminino. Essas foram estimativas mínimas, visto que muitas lesões suspeitas são removidas sem diagnóstico e há um sub-registro destes valores⁷.

Todos esses dados são extremamente elevados e impulsionam numerosos estudos que visam o entendimento do processo de carcinogênese, bem como a busca de tratamentos mais efetivos e mecanismos preventivos para o câncer.

2.1 Carcinogênese

A carcinogênese é o processo de conversão de uma célula normal em uma célula neoplásica maligna, sendo que os indutores desse processo são denominados carcinógenos⁵⁵.

Tais agentes cancerígenos provocam alterações genéticas no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, as quais levam à quebra das barreiras que governam a proliferação celular normal, fazendo com que as células que estão no ciclo celular ou que são capazes de nele entrar dêem origem a clones de células transformadas, favorecendo o surgimento de células imortalizadas, ou seja, com capacidade de realizar divisões infinitamente⁸.

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, pois a aplicação de um carcinógeno não leva ao imediato aparecimento do câncer^{29,55}. O processo da carcinogênese pode ser dividido basicamente em três fases: iniciação, promoção e progressão⁸.

A iniciação é causada por uma alteração irreversível do DNA, sendo que pode ser consequência de uma falha no mecanismo de detoxificação do carcinógeno, reparo do DNA ou eliminação das células que tenham DNA alterado^{11,55}.

A promoção neoplásica pode ser produzida pelo próprio carcinógeno ou por outras substâncias, chamadas agentes promotores, as quais, isoladamente, não causam o aparecimento de neoplasias, portanto, não são carcinogênicos em si, mas induzem a divisão celular num tecido previamente iniciado²⁹.

A progressão é a etapa caracterizada por sucessivas modificações na expressão gênica das células neoplásicas, gerando a transformação de uma lesão pré-maligna em maligna^{8,55}.

Dentre os agentes capazes de induzir proliferação neoplásica, podemos citar os carcinógenos químicos, físicos ou biológicos⁷⁶.

2.1.1 Carcinogênese química

O primeiro relato de carcinogênese induzida por um agente químico foi descrito por Percival Pott em 1775, o qual observou que limpadores de chaminé apresentavam um risco aumentado de desenvolver carcinoma de escroto, devido à exposição aos produtos do carvão e da fuligem que se depositavam sobre a pele da região^{6,8,55}.

Para que ocorra a carcinogênese, a substância química utilizada deve ser efetiva e interagir com os constituintes celulares, incluindo os ácidos nucleicos. Os compostos que realizam reações diretamente com a célula são chamados de carcinógenos de ação direta,

enquanto aqueles que requerem uma ativação metabólica anterior à atividade principal são de ação indireta^{8,92}.

Dentre os principais carcinógenos químicos capazes de desencadear neoplasias malignas estão os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)⁸. Estes compostos constituem uma família de elementos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Estas substâncias, bem como seus derivados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em quase todos os compartimentos ambientais⁷⁰. Os organismos expostos aos HPAs pela inalação, ingestão e contato de pele apresentam um maior risco de câncer de pulmão, bexiga e pele⁶.

Um carcinógeno é considerado incompleto quando possui apenas a ação iniciadora, enquanto um carcinógeno completo possui atividades iniciadoras e promotoras simultâneas. Dentre os completos, encontra-se o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), um tipo de HPA^{34,35}. O DMBA é um dos carcinógenos mais utilizados no modelo de carcinogênese química em animais⁵⁷.

A carcinogênese química experimental em animais possibilita a verificação de mudanças teciduais precoces, marcadores diagnósticos e potencial de reversibilidade das lesões¹⁶, proporcionando não apenas o estudo da biologia neoplásica, como também o desenvolvimento e a avaliação de estratégias de prevenção do câncer⁵⁷.

2.1.2 Carcinogênese química experimental em pele

Em 1915, Yamagiwa e Ichikawa⁹⁷ desenvolveram carcinomas de pele em coelhos após aplicações de carvão mineral, dando início à utilização de animais de laboratório para o estudo da carcinogênese induzida quimicamente.

Atualmente, o processo de carcinogênese química em animais é um dos principais meios para o estudo seqüencial da evolução do processo do câncer, sendo um modelo confiável para o desenvolvimento multifásico da neoplasia^{9,17,83}.

Dentre os numerosos modelos de carcinogênese, um dos mais bem caracterizados é o realizado em pele⁶⁸. Este é tipicamente um processo multiestágio constituído por iniciação, promoção e progressão⁴¹.

A pele tem sido muito utilizada, devido às facilidades de manipulação e de observação^{8,34,35}. Para este modelo experimental, uma simples dose do agente iniciador é aplicada na pele do animal, seguida por repetidas aplicações do agente promotor⁶⁸.

Podem-se citar basicamente dois modelos mais amplamente utilizados para a carcinogênese química em pele: o modelo composto por duas fases e o modelo completo.

O modelo de carcinogênese composto por duas fases é caracterizado pela iniciação do processo por uma dose subcarcinogênica (*i.e.*, DMBA) seguida por aplicações múltiplas por um longo período do promotor, como por exemplo, o TPA (13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol). Este tipo de tratamento gera predominantemente a formação de neoplasias benignas (papilomas) e também alguns carcinomas¹⁰⁴. Em contraste, o modelo de carcinogênese completa requer múltiplas aplicações tópicas da substância, como o DMBA (iniciador e promotor), na pele do camundongo, o qual conduz ao desenvolvimento de uma grande proporção de carcinomas⁹.

Para a indução da carcinogênese em pele, a utilização dos camundongos *hairless* tem obtido grande sucesso^{9,17,83}. Apesar de outras espécies serem utilizadas, como os SENCAR^{84,95}, a grande vantagem da utilização de camundongos sem pêlo, é a facilidade de manipulação, de aplicação do carcinógeno e de avaliação dos resultados.

A mutação *hairless* (Hr^{hr}) foi encontrada em um camundongo encontrado em um aviário em Londres, em 1924, o qual foi então levado ao The Jackson Laboratory, em 1956, pelo Dr. E. L. Green. Dr. Green cruzou este animal com uma fêmea BALB/c e os descendentes foram cruzados entre si. Em 1964, na geração F24, a espécie foi nomeada HRS/J⁸⁷.

Embora artificial, o modelo de carcinogênese em pele de camundongos é um sistema ideal para o estudo quantitativo e qualitativo das alterações que ocorrem durante os diferentes estágios da carcinogênese química, permitindo a análise dos eventos de iniciação, promoção e progressão da lesão neoplásica¹⁰⁴.

Neste modelo, os carcinomas produzidos pelos agentes químicos são semelhantes às lesões neoplásicas de pele em humanos³ e, dessa maneira, os resultados obtidos apresentam grande relevância para um entendimento mais profundo do câncer epitelial humano⁶¹.

2.2 Câncer de pele

O câncer de pele é o câncer mais comum em diversas populações mundiais⁷². Este tipo de câncer pode ser classificado em melanoma ou câncer de pele não melanoma (CPNM).

O melanoma se origina dos melanócitos presentes na epiderme e é o câncer de pele mais agressivo, e que, portanto, apresenta grande possibilidade de metastizar e causar morte²⁰. Apesar de sua letalidade ser elevada, sua incidência é baixa, sendo as estimativas, previstas para o Brasil, no ano de 2006, de 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres⁷.

Em contraste, os CPNM apresentam grande incidência na população brasileira, sendo o número de casos novos estimados para 2006 de 55.480 em homens e de 61.160 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco de 61 casos novos a cada 100 mil homens e 65 para cada 100 mil mulheres⁷. O CPNM pode ser subdividido em carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (CEC). Ambos se originam dos queratinócitos da epiderme, sendo que o carcinoma basocelular apresenta um crescimento lento, que raramente causa metástase, porém pode gerar grande morbidade. Em contraste, o CEC apresenta maior tendência a metastizar²⁰.

2.2.1 Desenvolvimento do CEC

O desenvolvimento do CEC é um processo de múltiplas etapas, que freqüentemente apresenta lesões iniciais proliferativas caracterizadas por padrões histológicos distintos. Com o tempo, há freqüentemente proliferação aumentada, acompanhada por alteração da morfologia. Estas lesões, com a presença de atipias celulares, mas sem evidência de invasão, por vezes chamadas carcinoma *in situ*, precedem o desenvolvimento de um carcinoma verdadeiro, no qual detecta-se a invasão⁴⁹.

É atualmente aceito que a membrana basal, a qual separa o epitélio das células mesenquimais, representa a primeira barreira para a invasão das células epiteliais neoplásicas^{88,101}. As células do CEC atravessam a membrana basal e adentram no tecido conjuntivo, objetivando invadir estruturas adjacentes, fenômeno que caracteriza o processo de invasão neoplásica³⁰.

Morfologicamente, a invasão tumoral está associada com a alteração das bordas da lesão neoplásica, onde as células parecem invadir a matriz extracelular (MEC) adjacente ao tumor primário¹⁵. Para que esse fenômeno ocorra, são necessárias alterações nas interações

entre as células neoplásicas e a MEC, com aumento na secreção das enzimas degradadoras da matriz^{38,67,88}. Longe de ser uma barreira física, o estroma participa ativamente do processo de invasão neoplásica^{67,83,88}.

Uma das mais sérias conseqüências da invasão é a produção de metástases. As células malignas, da mesma forma que são capazes de romper a membrana basal e degradar o tecido intersticial, podem invadir os vasos sangüíneos e linfáticos e serem levadas pela circulação⁶³. Estando na corrente sangüínea, necessitam ainda atravessar as células endoteliais e a membrana basal em um local distante, e só então emigrar do vaso para um tecido íntegro, no qual irão se proliferar e caracterizar o processo de metástase³⁸.

Dentre as enzimas degradadoras da MEC, destacam-se as metaloproteinases da matriz (MMPs)^{52,85,88,91}. Estas podem agir em um ou mais componentes⁹³, sendo que juntas, apresentam a capacidade de degradar praticamente todos os elementos proteicos conhecidos da MEC⁴⁵.

2.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs)

O grupo das MMPs é representado por mais de 20 enzimas humanas^{45,99}, as quais apresentam certas características em comum. A primeira é a utilização da presença do zinco para realizarem suas ações^{93,94}; a segunda é a inibição da ação das MMPs por seus inibidores teciduais (TIMP), com os quais formam complexos inativos e auxiliam o controle da quantidade de enzima ativa^{5,19,93}; e a terceira é a secreção da enzima em uma forma latente, chamada zimógeno^{27,89}.

Em condições fisiológicas normais, há uma rigorosa regulação da secreção das MMPs, as quais são sintetizadas e secretadas como pré-enzimas, os zimógenos, que posteriormente são ativados^{22,36,65,78,93}.

Esta regulação ocorre apenas em momentos específicos, nos quais existem processos multifásicos de ativação dos zimógenos, podendo também ser influenciada por inibidores sangüíneos e teciduais, os quais monitoram a ação da proteinase⁹³.

Os níveis das MMPs nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis^{36,69}. Um desequilíbrio dos níveis de MMP e TIMP pode resultar em patologias como a artrite reumatóide, osteoartrite e crescimento neoplásico, com invasão e metástase⁵.

A expressão das MMPs é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas³⁶. Devido ao papel importante das MMPs no desenvolvimento do câncer, diversos autores têm relacionado seus níveis com carcinomas de esôfago⁴⁷, oral^{53,54}, de endométrio^{1,18}, de pele³⁰, entre outros.

Em geral, existem dois aspectos importantes relacionados ao papel das MMPs na progressão do câncer: a associação entre a expressão das MMPs e o grau ou a agressividade da neoplasia e a correlação da expressão e atividade das MMPs com relação ao risco de recorrência ou metástase⁹⁰.

Apesar de certos domínios das MMPs serem homólogos, estas enzimas exibem considerável diversidade nos domínios estruturais e no substrato protéico específico⁸⁹. Desta maneira, as MMPs são classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural, além do substrato específico para degradação⁵². Apresentam diversas classes, dentre elas, as collagenases, as matrilisinas, as estromelisinases, as gelatinases e as MMPs ligadas à membrana (MT-MMP)^{36,91,93}.

As collagenases 1, 2 e 3 são as MMPs-1, -8 e -13 respectivamente. Essas degradam as moléculas de colágeno intersticial tipo I, II e III, além de digerirem outras moléculas da MEC^{4,45}.

As matrilisinas 1 e 2 (MMP-7 e -26, respectivamente) digerem diversos componentes da matriz, dentre os quais estão a fibronectina e o colágeno tipo IV^{4,45}.

As MT-MMPs são numeradas de 1 a 6: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP, correspondendo respectivamente às MMPs-14, -15, -16, -17, -24 e -25. Além de apresentarem papel importante na ativação das outras MMPs⁴³, os subtipos das MT-MMPs são responsáveis pela degradação de diferentes componentes da MEC^{45,64}.

E estromelisinases 1 e 2 (MMPs-3 e -10) podem degradar fibronectina e proteoglicanas^{4,64}, enquanto as gelatinases A e B (MMPs-2 e -9) degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas) e colágeno tipo IV^{45,90,93}.

2.3.1 MMP-9

Da mesma forma que as outras MMPs, a MMP-9 é secretada como zimógeno e permanece inativa até que seja ativada pela remoção do domínio propeptídeo, quando uma mudança conformacional ocorre e o zinco se torna acessível para o substrato, resultando na ativação da enzima. Diferentes proteases são conhecidas por ativar a MMP-9, como por exemplo, as MMPs -2 e -3⁷⁵.

A MMP-9 é produzida por diversos tipos de células, incluindo queratinócitos, monócitos, macrófagos teciduais, leucócitos polimorfonucleares e uma variedade de células neoplásicas malignas⁷⁵.

Como membro da família das gelatinases, a MMP-9 degrada gelatina (colágeno desnaturado) e colágeno tipo IV, o maior componente da membrana basal⁷⁵.

A determinação da capacidade de invasão de um CEC é extremamente importante na conduta clínica, no tratamento e no prognóstico³⁸.

A facilidade das gelatinases em iniciar a destruição da membrana basal e ainda degradar os componentes colágenos e não-colágenos da MEC justifica suas importantes ações durante a invasão neoplásica⁸⁸.

Na literatura é relatado que altos níveis da MMP-9 estão presentes em casos de grande potencial de invasão em carcinomas oral⁴², gástrico¹⁰³, esofágico⁴⁷ e de endométrio¹⁸. E desta maneira, pode-se notar a relação entre os níveis de MMP-9 e o processo de invasão tumoral^{18,38,42,103}, apesar de poucos autores não terem verificado esta associação^{33,47,79}.

É ainda relatada a expressão aumentada de MMP-9 em casos de neoplasias com reduzida diferenciação celular^{1,33}, fato que estimula ainda maiores pesquisa sobre o papel desta enzima no desenvolvimento do carcinoma.

Como uma forma alternativa de terapia anti-câncer, diversos autores têm buscado inibir as funções das MMPs, sintetizando alguns inibidores^{46,59,60,80,96}.

Apesar da detecção imunoistoquímica e zimográfica dos níveis das MMPs e o tratamento com inibidores sintéticos terem tido relativo sucesso nas pesquisas, estes procedimentos são aplicados após o estabelecimento do CEC. Entretanto, atualmente, têm-se dado grande importância às pesquisas que buscam a prevenção da lesão.

Para que a enzima seja expressa no tecido, e possa ser detectada pela imunoistoquímica e zimografia, é necessário que a informação seja trazida pelo ácido ribonucléico (RNA), após este ter copiado a codificação genética presente no DNA²¹. Se existe alguma alteração no gene, é possível existir uma modificação neste processo, resultando em diferente expressão da proteína MMP no tecido. Assim, o controle genético é particularmente importante nesta regulação e se alterações, como um polimorfismo genético, são encontradas, elas podem

interferir na susceptibilidade^{37,53,54} ou em um distinto desenvolvimento clinicopatológico do câncer^{31,100}.

2.4 Polimorfismos genéticos

Os polimorfismos ocorrem naturalmente como modificações da sequência de DNA encontradas em pelo menos 1% dos indivíduos^{50,56,73}. Considerando-se o tamanho do genoma humano (3×10^9 pares de base - pb), espera-se encontrar mais de 10 milhões de pontos de variação no DNA²¹.

Apesar da maioria dos polimorfismos de DNA ser funcionalmente neutra, uma parte deles pode exercer efeitos na regulação da expressão gênica ou na função da proteína codificada, evidenciando assim, diferenças entre indivíduos em vários aspectos biológicos e na susceptibilidade às doenças⁹⁹.

Basicamente existem dois tipos de variações no DNA de indivíduos normais: aquela que afeta um simples par de bases, chamado polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), e a que envolve seqüências repetidas, o polimorfismo das seqüências curtas repetidas em série (STRP)²¹.

A categoria de seqüências repetidas em *tandem* (uma após a outra) pode ser do tipo microssatélite. Estas incluem seqüências muito pequenas contendo, geralmente, de 1 a 4 pb que aparecem distribuídas repetidamente ao longo do genoma²¹. A maioria dos microssatélites ocorre em seqüências repetidas de dinucleotídeos⁹⁹, sendo que as seqüências citosina/adenina (CA) e citosina/timina (CT) são mais comuns²¹.

Pode-se notar no genoma humano cerca de 100.000 blocos de repetições em série de nucleotídeos CA e o número destas repetições em um determinado *locus* varia entre indivíduos. Desta maneira, as diferenças no número de repetições podem ser usadas como marcadores genéticos. Tais variações podem ser facilmente detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), facilitando o uso dos microssatélites como marcadores¹¹.

A presença de um polimorfismo nos genes das MMPs pode estar relacionada com várias patologias caracterizadas pela degradação da matriz extracelular^{82,99}. Alguns trabalhos têm investigado esta relação com diversos tipos de câncer como melanoma¹⁰⁰, carcinoma oral^{53,54}, câncer gástrico⁶², coloretal³⁷, câncer de pulmão⁸⁶, de mama^{31,32,74}, entre outros.

Em relação às MMPs, existem diversos mecanismos de regulação que influenciam sua ação final na degradação da matriz extracelular⁹⁹. Parece, entretanto, que para a maioria das MMPs, a etapa chave é a regulação da transcrição²².

As regiões responsáveis pelo controle da transcrição do gene são os promotores genéticos e recentemente, polimorfismos do DNA foram encontrados na região promotora dos genes de diversas MMPs⁸². A análise estrutural e funcional da região promotora de genes destas enzimas tem promovido um melhor entendimento dos mecanismos que regulam sua expressão²⁷.

2.4.1 Polimorfismos no gene da MMP-9

Em humanos, especificamente em relação à investigação do gene da MMP-9, dois polimorfismos que afetam a ação de transcrição deste gene têm sido identificados na região promotora⁹⁹. Um deles é um SNP na posição -1562¹⁰² e o outro consiste na sequência de repetições CA próxima à região -90⁸¹.

Devido ao fato das seqüências de microssatélites serem comumente encontradas nos promotores genéticos humanos, a habilidade em modular a transcrição pode ser significativa em relação à susceptibilidade e patogênese de numerosas doenças genéticas complexas⁷¹. Dessa maneira, o polimorfismo com repetições CA na região promotora do gene da MMP-9 tem sido avaliado em algumas patologias como aneurisma intracranial⁷¹, esclerose múltipla^{26,66}, nefropatia diabética⁵⁸, degeneração macular relacionada a idade²⁵, aterosclerose^{23,24} e melanoma¹².

Em 1999, Peters et al.⁷¹ avaliaram a relação entre a presença de polimorfismos de repetição no gene da MMP-9 e a susceptibilidade do indivíduo desenvolver aneurisma intracranial. Os autores verificaram que a variação genética no promotor do gene da MMP-9 resulta em variação na expressão no nível transcricional. Este fato pode gerar diferenças na atividade da MMP-9, conduzindo ao aumento da susceptibilidade de formação do aneurisma intracranial.

Em 2000, Nelissen et al.⁶⁶ não encontraram associação entre a presença de polimorfismo no promotor da MMP-9 e a susceptibilidade à esclerose múltipla. Entretanto, em 2004, Fiotti et al.²⁶ concluíram que a presença de 22 ou mais repetições CA na região promotora deste gene está associada ao aumento do risco à esta patologia.

No estudo em pacientes com nefropatia diabética⁵⁸ (caracterizada pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular no glomérulo renal), os autores verificaram que, dentre nove alelos, as amostras com 21 repetições CA apresentaram maior expressão de MMP-9 e conseqüente proteção para o desenvolvimento e progressão da doença.

Em 2005, Fiotti et al.²³ avaliaram se este polimorfismo de repetição no gene da MMP-9 estava associado à degeneração macular relacionada à idade. Eles verificaram que microssatélites maiores na

região promotora da MMP-9 estavam associados ao desenvolvimento da doença.

No mesmo ano, o mesmo autor e seus colaboradores²⁵, verificaram que indivíduos portadores de mais de 20 repetições mostraram crescimento mais rápido da espessura íntima-média das artérias carótidas e mais rápida progressão da remodelação constritiva.

Poucos trabalhos foram realizados avaliando a relação da presença de microssatélites e o câncer. Foi estabelecido que em células de carcinoma esofágico, o promotor da MMP-9 compreendendo 14 repetições CA apresenta apenas 50% da atividade de transcrição de um promotor contendo 21 repetições CA⁸¹.

Em culturas de células de adenocarcinoma de pulmão, Huang et al.³⁹ testaram a ação de um agente anticâncer e verificaram que o fármaco inibiu a expressão da MMP-9, devido a um encurtamento do microssatélite do DNA. Com o uso do fármaco, o número de CA reduziu de 24 para 18 e a expressão da enzima passou a ser apenas de 53%, reforçando a hipótese da associação entre o polimorfismo e a ação da MMP-9.

Sabe-se que o comprimento destas repetições CA interfere na atividade promotora do gene MMP-9, fato verificado com a correlação entre um menor comprimento de repetições CA e a diminuição da expressão do gene da MMP-9 em cultura de células de carcinoma esofágico⁸¹.

Devido à similaridade entre as regiões promotoras de humanos e camundongos, evidências laboratoriais obtidas destes animais promovem um modelo de confiança para o entendimento do efeito destes polimorfismos em humanos²⁶.

Fornoni et al.²⁸ verificaram que camundongos com glomerulonecrose apresentaram 20 repetições CA enquanto que outra linhagem, resistente a mesma doença, continha 24 repetições. O grupo com glomerulonecrose, foi ainda associado à menor expressão e

atividade da MMP-9 e dessa maneira, os autores concluíram que alterações no promotor do gene da MMP-9 podem representar marcadores genéticos para o desenvolvimento da glomerulonecrose.

Em camundongos, pequenas diferenças no comprimento do microssatélite (20–24 repetições) podem ser responsáveis por uma diferença na expressão da MMP-9, e semelhantemente ao gene humano, a região promotora do gene MMP-9 contendo menores repetições CA tem sido associada com menor expressão e atividade da MMP-9²⁸.

Na realidade, este polimorfismo não justifica a doença, porém, facilita a expressão de MMP-9, podendo agir no desenvolvimento da patologia²³.

Apesar de ter sido relatado que uma redução no número de repetições CA no gene da MMP-9 está associada a uma marcante redução na expressão e na atividade enzimática da MMP-9, observa-se a necessidade de pesquisas adicionais que investiguem a associação entre este polimorfismo no gene da MMP-9 e as características clinicopatológicas do carcinoma espinocelular.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a presença de polimorfismo do tipo microssatélite (repetições CA) na região promotora do gene da MMP-9 pode influenciar as características clínicas e histopatológicas do carcinoma espinocelular em pele de camundongos *hairless*, submetidos a um modelo de carcinogênese experimental (0,5% DMBA em acetona).

4 METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste trabalho seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a aprovação fornecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (017/2005-PA/CEP) (Anexo A).

4.1 Carcinogênese experimental

Noventa e quatro camundongos *hairless* (HRS/J - Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), machos e fêmeas, com idade média de 3,5 meses, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, onde permaneceram em gaiolas com temperatura ambiente, ração (Guabi – Nutrilabor) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

O processo de carcinogênese química foi induzido em todos os animais, por meio do tratamento tópico com a solução de DMBA (Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA), a 0,5% diluído em acetona, previamente preparada em capela e estocada a 4°C.

Para a realização de qualquer procedimento com a manipulação do carcinógeno, os operadores utilizaram equipamento de proteção individual composto por máscara com filtro especial para gases tóxicos, luvas de nitrilo, gorro, óculos de proteção e avental.

A aplicação da solução de DMBA foi realizada com o auxílio de um pincel de pêlo de camelo número zero, com remoção do excesso de solução. Os animais receberam três pinceladas do carcinógeno na região ilíaca, dos lados direito e esquerdo, uma vez por semana, até a 16ª semana (Figura 1).

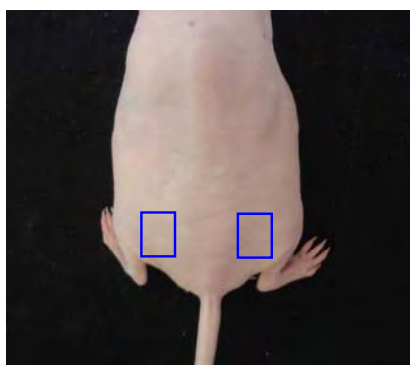


FIGURA 1- Local de aplicação da solução de DMBA na pele dos camundongos *hairless* submetidos ao processo de carcinogênese.

Na 17ª semana, todos os animais foram anestesiados para a avaliação clínica e a realização das biópsias, sendo posteriormente realizada a eutanásia.

4.2 Análise fenotípica

Inicialmente realizou-se a avaliação clínica das lesões e posteriormente o diagnóstico, por meio da análise histopatológica.

4.2.1 Análise clínica

Primeiramente, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun®) e ketamina (Dopalen®), na proporção de 1:0,5, na dose de 0,1ml/100g de peso. Os animais foram então fotografados e as lesões caracterizadas clinicamente. Os três avaliadores verificaram: a presença ou ausência de ulceração e o tamanho das lesões.

Posteriormente, foi realizada biópsia excisional da maior lesão presente no dorso do animal. O material foi então hemisseccionado e imediatamente submerso em solução de formaldeído tamponado a 10%.

4.2.2 Análise histopatológica

Após um período de fixação de 48 horas, o material foi incluído em blocos de parafina para realização de vinte cortes seriados (5 µm de espessura) a partir da região central de cada lesão, colocados em quatro lâminas de vidro. As lâminas 1 e 3 foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e as lâminas 2 e 4 com ácido periódico de Schiff (PAS), para posterior análise qualitativa, por meio da microscopia de luz (Axiophot – Axioplan – Carl Zeiss, Oberküchen, Germany).

Os cortes corados pelo HE e PAS foram diagnosticados por três observadores calibrados. A integridade da membrana basal foi verificada nas lâminas coradas em PAS e as lesões nos cortes em HE foram classificadas em relação ao estágio e ao padrão de invasão, além do grau de diferenciação celular.

A classificação segundo o estágio e o padrão de invasão foi baseada parcialmente no modelo proposto por Anneroth et al.², sendo os critérios adaptados para a pele e subdivididos em quatro graus.

O estágio de invasão grau 1 agrupou as lesões com invasão questionável; já o grau 2, foi caracterizado pela invasão da derme; no grau 3, a invasão atingiu a hipoderme; e no grau 4, a invasão foi extensa e profunda, chegando à camada muscular.

Na avaliação do padrão de invasão, foi considerado grau 1, quando as bordas de infiltração foram bem delimitadas; grau 2, quando a infiltração ocorreu em cordão e/ou faixa; grau 3, na presença de grupos de células com $n > 15$; e grau 4, pela ampla disseminação de células em pequenos grupos ($n < 15$) e/ou células isoladas.

Em relação ao grau de diferenciação celular, as lesões foram avaliadas em bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas e pouco diferenciadas.

Após toda a avaliação histopatológica, os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

4.3 Análise genotípica

No dia do sacrifício, além da biópsia da lesão, também foi realizada a secção da cauda de cada animal, com tamanho aproximado de 0,5cm. Este material foi imediatamente colocado para conservação em solução de RNAlater® (Ambion Inc) e posteriormente estocado em freezer -20°C.

4.3.1 Extração do DNA

As caudas dos animais foram retiradas da solução de RNAlater® e lavadas em água ultra pura. O DNA foi extraído com a utilização do kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega).

A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro (ND-1000 Spectrophotometer – Nano Drop Technologies), em comprimento de onda de 260 nm e sua pureza determinada pela razão das densidades ópticas 260/280.

4.3.2 Reação de PCR

O objetivo da reação de PCR foi amplificar um fragmento (~128 pb) contendo as repetições de dinucleotídeos na região promotora do gene da MMP-9 (Figura 2). Os *primers* utilizados²⁸ foram: 5'-CTGCCTGACTTGGCAATG-3' e 5'-TCCAGGCTTATGCTGACT-3'.

*primer*GGGGACTGTGGGCAGGGCATAAGGGAGGGGGTAGTGTAACCACACA...CGCTG*primer*

FIGURA 2- Fragmento da região promotora do gene da MMP-9 amplificado pela técnica do PCR: nas extremidades estão as regiões de ligação com os primers e sublinhada está a sequência de repetições CA.

A reação de PCR das amostras foi realizada em um volume total de 10 µl, contendo aproximadamente 10 ng de DNA genômico, 1 µl 10X PCR Buffer, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,3 unidade de Taq DNA polimerase, 8,04 µl de água ultra pura e 0,05 µl de cada *primer* (100 µM). A solução foi incubada durante 10 minutos a 95°C, seguida por trinta ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, com outros 6 minutos a 72°C após o ciclo final.

Para a avaliação posterior no programa Phoretix 1D Advanced (Version 4.01, Non Linear Dynamics Ltd), foram escolhidos dois marcadores, um maior e um menor que o fragmento da região da MMP-9. Os fragmentos escolhidos apresentavam 107 pb e 169 pb e ambos foram amplificados por PCR.

O fragmento contendo 107 pb é normalmente utilizado para detecção de polimorfismo do tipo SNP no gene da Protocaderina 1. Para a sua amplificação pela reação de PCR, foram utilizados os *primers*: 5'-GTGCTTTCGGGAGGAATGTG-3' e 5'-ACCACCATAACCAGGCCCTAGTAC-3' e foi escolhido o DNA de uma amostra conhecida homozigota. Foi utilizado um volume total de 250 µl, contendo aproximadamente 200 ng de DNA, 25 µl 10X ABgene PCR Buffer IV, 0,4 µM de cada *primer*, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's e 0,6 unidade de Taq DNA polimerase. A solução foi incubada durante 2 minutos a 95°C, seguida por quarenta ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, finalizando com um ciclo a 25°C durante 10 minutos.

A reação de PCR do fragmento contendo 169 pb, específico para a região entre os genes da interleucina 4 e da interleucina 13, foi realizada com os seguintes *primers*: 5'-GGCTGATTTGTAAGTTGGTAAGCC-3' e 5'-CAAATTCCTGGGCTCAAGTG-3'. O DNA para esta reação foi o DNA controle padrão da European Collection of Cell Cultures (ECACC), o Human Random Control 1 (HRC 1), o qual foi previamente testado como um bom marcador. A solução de PCR (250 µl) foi composta por 200 ng de DNA, 25 µl de 10X ABgene PCR Buffer IV, 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's e 0,3 unidades de Taq DNA polimerase. A solução foi submetida a um ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, terminando com um ciclo de 10 minutos a 72°C.

4.3.3 Eletroforese

O gel utilizado para a eletroforese foi o MADGE (Microplate Array Diagonal Gel Electrophoresis), com formato modificado (Figura 3a), disponíveis pela MadgeBio Ltd. (<http://www.madgebio.freemove.co.uk>). O volume total de 50 ml foi composto por: 9% Duracryl (40% acrilamida/BIS 19:1) e 7% Glicerol em 1xTAE (Tris-acetato-EDTA). Os catalizadores de polimerização, TEMED (Tetrametiletdiamino) e 25% APS (persulfato de amônia) foram adicionados (150 µl de cada) à mistura. Esta solução foi então vertida na forma MADGE (Figura 3b) e logo em seguida uma placa de vidro silanizada foi colocada sobre o gel (Figuras 3c e 3d). Após a polimerização, o gel foi retirado da forma e imerso em solução tampão 1xTAE, contendo 5 mM KCl por uma hora, visando equalizar as condições iônicas próximas ao ânodo e ao cátodo, para que não ocorresse o desbalanço por meio das mobilidades desiguais, dos diferentes íons, durante a corrida⁴⁸.

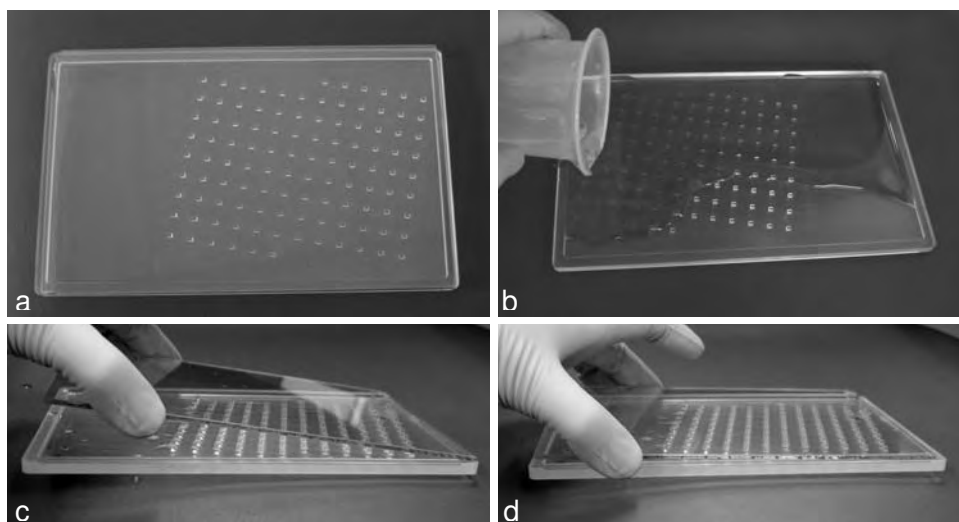


FIGURA 3- Utilização do sistema MADGE para a confecção do gel: a) Forma com os poços para 96 amostras; b) Colocação da solução do gel sobre a forma MADGE; c) e d) Colocação da placa de vidro sobre o gel.

Antes da eletroforese, foi preparada uma mistura de 70 μ l de tampão de amostra (98% formamida deionizada, 10 mM EDTA e xileno cianol FF), 70 μ l de 5xTAE, 35 μ l do marcador com 107 pb e 70 μ l do marcador com 169 pb. Posteriormente, 2 μ l desta mistura foram adicionados a 1 μ l do produto do PCR do fragmento do gene da MMP-9 de cada amostra e conseqüentemente, um total de 3 μ l foi adicionado a cada poço. Logo em seguida, deslizou-se uma placa de vidro sobre a superfície do gel (Figuras 4a, 4b e 4c), a qual foi mantida em posição com o auxílio de dois elásticos posicionados longitudinalmente e dois tubos de silicone inseridos entre os vidros, de cada lado do gel, deixando as bordas voltadas para o ânodo e o cátodo não seladas¹⁰ (Figura 4d). A eletroforese foi realizada a 200 V durante duas horas.

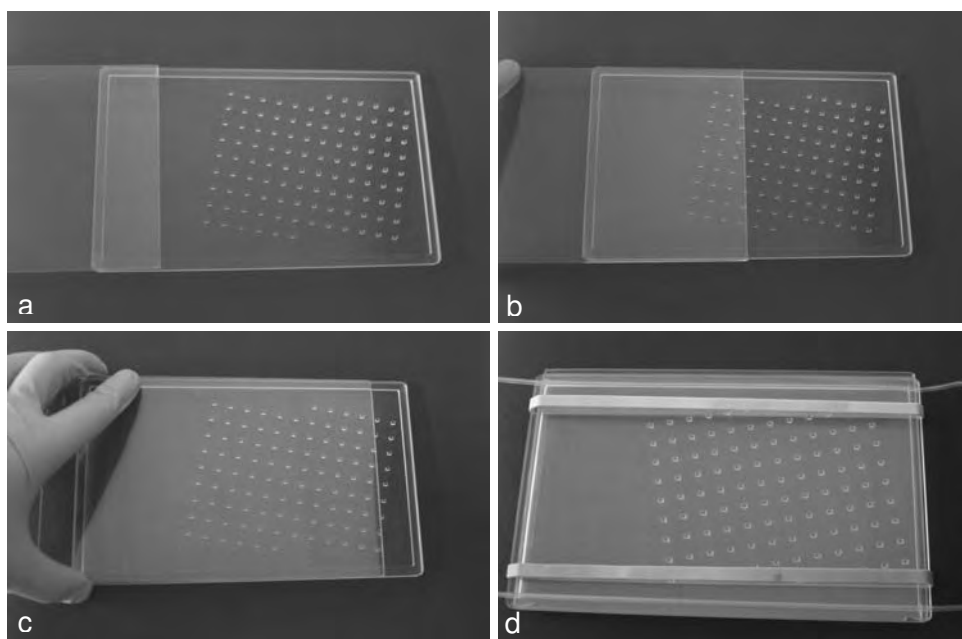


FIGURA 4- Procedimentos finais na utilização do sistema MADGE, após a colocação das amostras nos poços do gel: a), b) e c) Deslizamento da placa de vidro sobre a superfície do gel; d) Fixação das placas de vidro com auxílio de dois elásticos longitudinalmente e dois tubos de silicone inseridos entre os vidros.

4.3.4 Análise das imagens

Os géis foram corados por uma solução de SYBR Gold: 100 μ l 1xTBE (Tris-borato-EDTA) adicionados a 10 μ l SYBR Gold (Invitrogen), durante 15 minutos, em um agitador (Ika KS, 260 basic) com cem rotações por minuto. Em seguida, os géis foram retirados da solução de coloração e imersos em água, durante 10 minutos, também sob agitação de cem rotações por minuto.

Após este período, os géis foram escaneados pelo aparelho Typhoon Trio + (Amersham Biosciences). As imagens escaneadas foram analisadas com o auxílio do programa Phoretix 1D Advanced (Version 4.01, PhoretixTM International, Non Linear Dynamics Ltda). Primeiramente, foi colocado um retículo sobre a imagem para detecção da localização dos poços (Figura 5a) e em seguida desenhadas as canaletas por onde o gel correu (Figura 5b). Automaticamente, o sistema detectou as canaletas do gel e as nomeou (Figura 5c), facilitando a posterior análise das bandas.

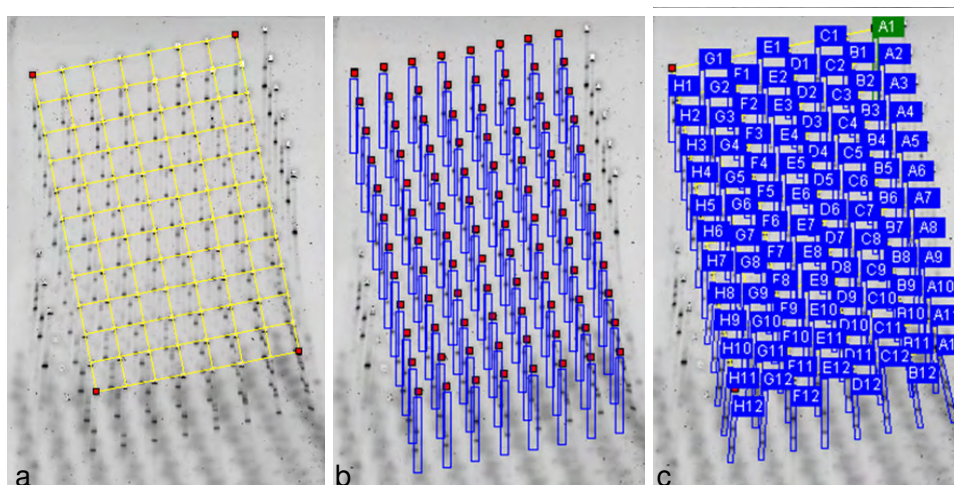


FIGURA 5- Análise das imagens pelo programa Phoretix 1D Advanced: a) Colocação de um retículo sobre a imagem dos poços; b) Detecção das canaletas no gel por onde as amostras correram; c) Nomeção das canaletas do gel.

A imagem de cada canaleta foi analisada separadamente e todas as bandas presentes foram detectadas pelo programa, sendo que as curvas representam a intensidade de cada uma (Figura 6). Em cada imagem foram detectadas as bandas do marcador superior, do marcador inferior e as bandas de interesse, e desta maneira, o sistema calculou a distância (em pixels) de cada banda em relação ao poço e posteriormente confeccionou uma tabela com todos esses valores.

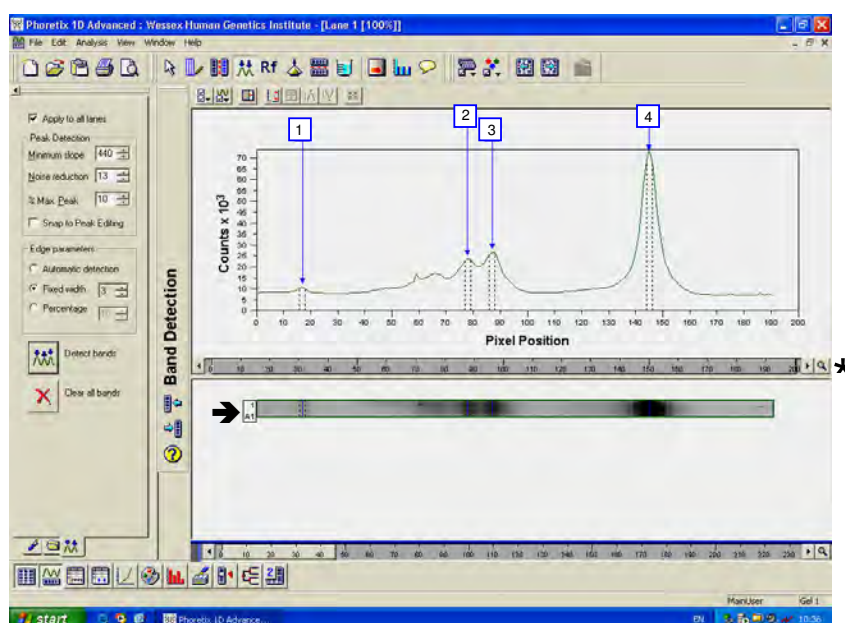


FIGURA 6- Análise da imagem de uma das canaletas (➔) pelo programa Phoretix 1D Advanced, com a detecção das bandas dos marcadores (bandas 1 e 4) e das bandas de interesse (2 e 3). Na barra inferior (★) nota-se a posição em pixels das bandas.

Os valores da tabela foram então copiados para o Microsoft Excel (Microsoft, Windows) e automaticamente o tamanho do fragmento de interesse foi transformado de pixels para pb, de acordo com a seguinte fórmula (Figura 7):

$$U = \frac{107}{\left[\frac{107}{169} \right] \left(\frac{d'107 - d'U}{d'107} \right)}$$

FIGURA 7- Fórmula utilizada para o cálculo do tamanho, em pares de base, do fragmento de interesse encontrado em pixels. Onde U é o tamanho do fragmento desconhecido em pb, d'107 é a distância entre as bandas com 107 pb e 169 pb e d'U é a distância entre a banda do fragmento desconhecido e a banda do fragmento com 169 pb.

4.3.5 Seqüenciamento

Baseando-se nos resultados da medição do tamanho dos fragmentos, pôde-se verificar três diferentes alelos e conseqüentemente, três amostras foram escolhidas para detectar o número de repetições em cada alelo. O seqüenciamento foi realizado pelo *Genome Centre*, na *Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London*. O protocolo utilizado foi o Big Dye version 3.1 DNA sequencing.

4.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi aplicada com o objetivo de relacionar as características clínicas (presença ou ausência de ulceração e tamanho da lesão) e histopatológicas (estágio de invasão, padrão de invasão e grau de diferenciação celular) das lesões neoplásicas com os alelos e os genótipos da MMP-9 encontrados neste estudo. Para todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi de 5%.

Para avaliar a associação das variáveis clinicopatológicas com os alelos e os genótipos encontrados, utilizou-se o teste qui-quadrado e, para conhecermos a intensidade desta associação, obtivemos uma

estimativa da razão de prevalência (odds ratio-OR), servindo-se da técnica de Regressão Logística.

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas computacionais MINITAB for Windows (2004, version 14.12, USA, Minitab Inc.) e BIOSTAT 4.0 (2005, versão 4.0, Brasil, Manuel Aires Júnior).

5 RESULTADOS

Os resultados fenotípicos e genotípicos obtidos serão apresentados de forma abrangente nos itens 5.1 e 5.2 e, posteriormente, a associação entre eles será abordada no item 5.3.

5.1 Análise fenotípica

5.1.1 Análise clínica

Na 17ª semana após o início da aplicação do carcinógeno, todos os animais apresentaram alguma alteração na pele da região dorsal. Enquanto algumas lesões possuíram tamanho reduzido, sem ulceração (Figura 8a), outras apresentaram grandes dimensões e eram freqüentemente ulceradas (Figura 8b).

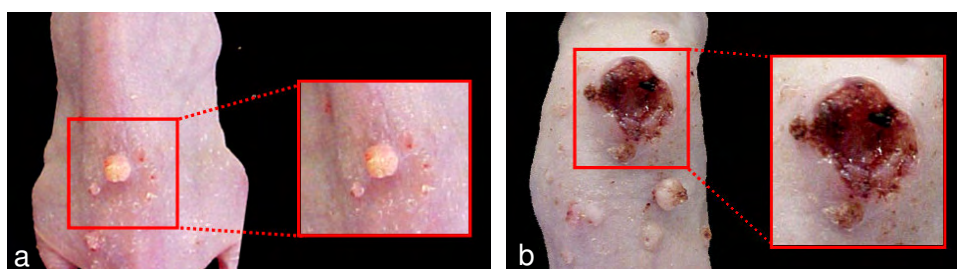


FIGURA 8- Variação das características clínicas das lesões encontradas após a carcinogênese química induzida pelo tratamento com DMBA na pele de camundongos *hairless*: a) Lesão de pequeno tamanho, sem presença de ulceração; b) Lesão com grandes dimensões e presença de ulceração.

As lesões foram classificadas de acordo com a ausência (grupo 1) ou a presença de ulceração (grupo 2). O tamanho da lesão foi calculado pelo diâmetro máximo, que variou entre 0,2 e 1,7 cm, apresentando média de 0,63 cm ($\pm 0,27$). Os dados também foram separados em: grupo 1, com lesão $<0,6$ cm e grupo 2 $\geq 0,6$ cm.

A distribuição dos 94 animais de acordo com a presença de ulceração e o tamanho da lesão pode ser observada na Figura 9.

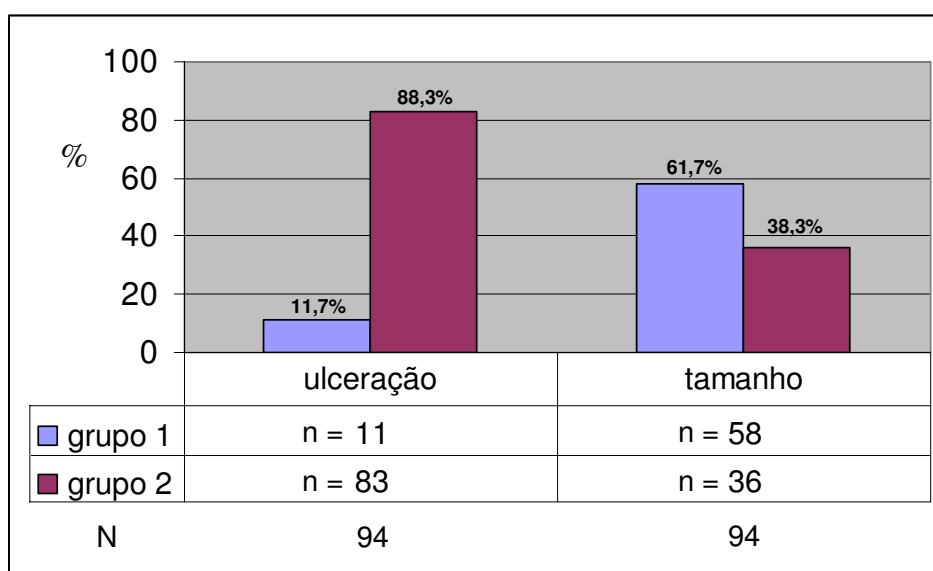


FIGURA 9- Distribuição em frequência absoluta (n) e relativa (%) dos 94 animais (N), de acordo com a ulceração (ausência=grupo 1 e presença=grupo 2) e com o diâmetro máximo da lesão ($<0,6$ cm = grupo 1 e $\geq 0,6$ cm = grupo 2).

Por meio da distribuição das frequências das lesões, pôde-se verificar uma alta prevalência de ulceração nas lesões (88,3%). Em relação ao tamanho, verificou-se um predomínio (61,7%) das lesões com diâmetro máximo $<0,6$ cm.

5.1.2 Análise histopatológica

A análise das características histopatológicas da neoplasia demonstrou que, após os animais receberem 16 aplicações semanais da solução de DMBA, todos os animais desenvolveram CEC, sendo que a maioria das lesões formadas (85,1%) invadiu o tecido conjuntivo (estágio de invasão graus 2, 3 e 4), e formou grupos de células (71,3%) (padrões de invasão graus 3 e 4) (Figura 10).

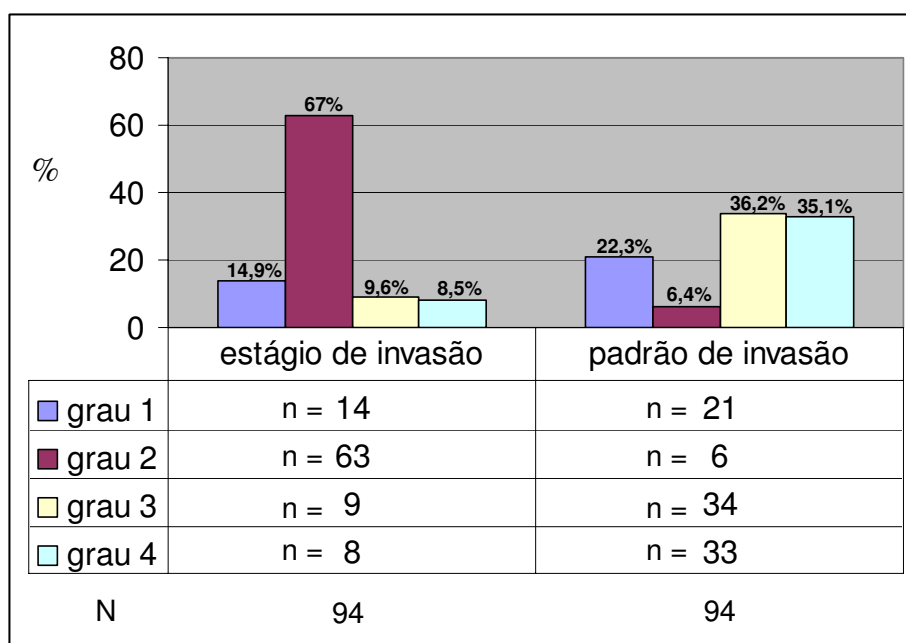


FIGURA 10- Distribuição em frequência absoluta (n) e relativa (%) dos 94 animais (N), de acordo com os critérios histopatológicos de padrão e estágio de invasão.

A invasão da derme em 67% das lesões, caracterizou o grau 2 de invasão (Figura 11), enquanto a invasão da hipoderme classificou o grau 3 (Figura 12) e a invasão da camada muscular o grau 4 (Figura 13). Notou-se também que o padrão de invasão destas lesões foi predominantemente em grupos de células com $n > 15$ (grau 3) (Figura 11) e grupos com $n < 15$ ou mesmo células isoladas (Figuras 12 e 13).

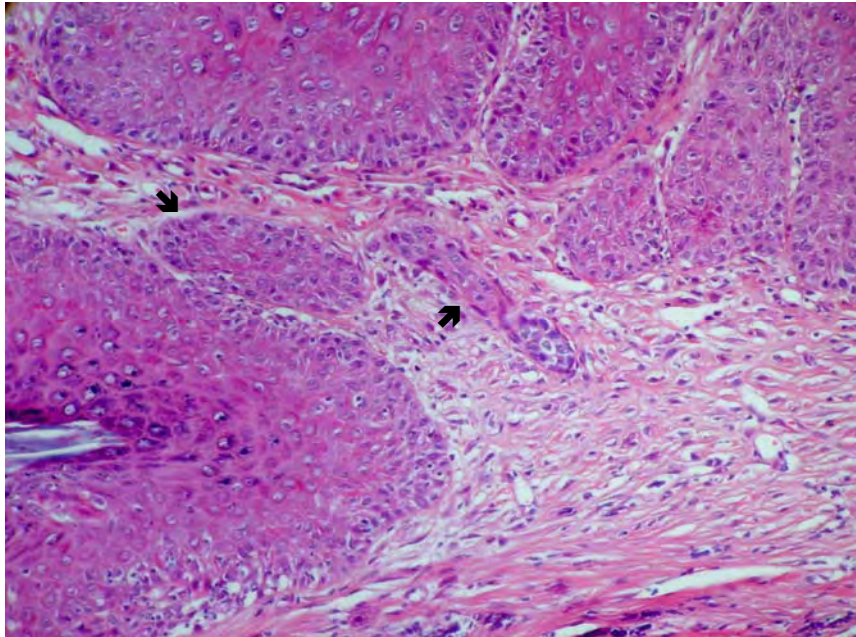


FIGURA 11- Lesão com estágio de invasão grau 2: invasão envolvendo apenas derme e padrão de invasão grau 3, com invasão por grupos de células com $n > 15$ (➡). (HE; aumento original: 200x).

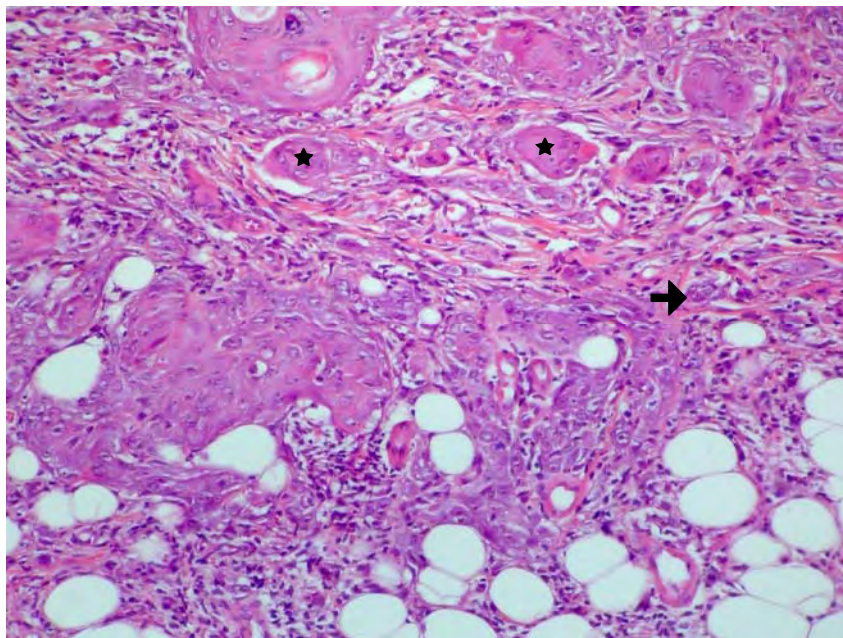


FIGURA 12- Lesão com invasão da hipoderme (estágio de invasão grau 3) e padrão de invasão grau 4, com invasão de pequenos grupos de células (★) e células isoladas (➡). (HE; aumento original 200x).

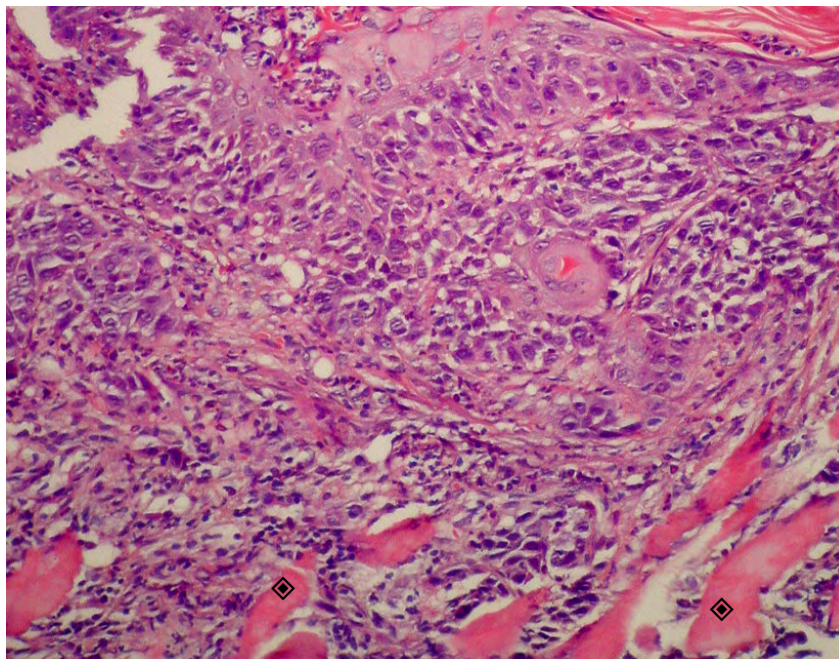


FIGURA 13- Lesão estágio grau 4, com invasão extensa e profunda, chegando até fibras musculares (◆) e padrão de invasão grau 4, com frente de invasão largo com células sem coesão. (HE; aumento original 200x).

Os dados referentes à diferenciação celular encontram-se na Figura 14.

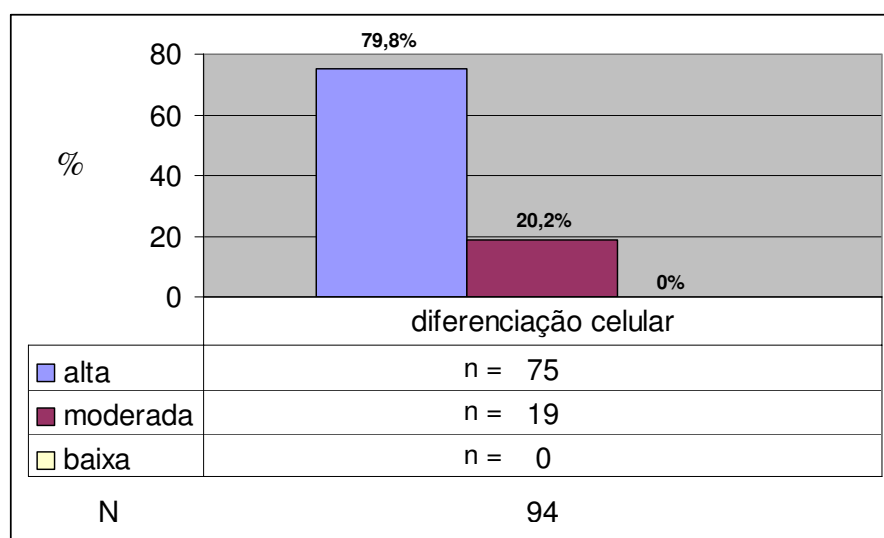


FIGURA 14- Distribuição em frequência absoluta (n) e relativa (%) dos 94 animais (N), de acordo com o grau de diferenciação celular.

Em relação à diferenciação celular, foi evidente o predomínio da formação de neoplasias bem diferenciadas quando comparadas às moderadamente diferenciadas. Em adição, não foi constatada nenhuma lesão pouco diferenciada (Figura 14).

Nas lesões bem diferenciadas, notou-se a conservação da estratificação epitelial, do grau de queratinização normal e das características epiteliais. Nas lesões moderadamente diferenciadas, estas características eram pouco evidenciadas, além de existir a presença de pleomorfismo e a perda de coesão celular (Figura 15).

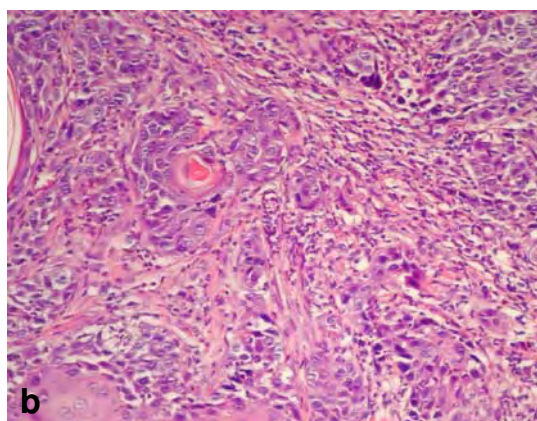
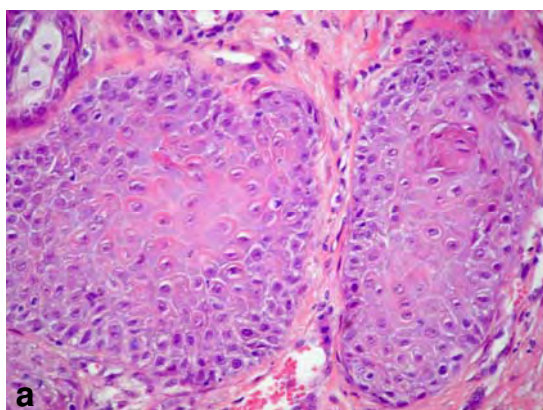


FIGURA 15- Lesões com diferentes graus de diferenciação celular: a) Lesão bem diferenciada, mantendo a estratificação epitelial e pouco pleomorfismo; b) Lesão moderadamente diferenciada, evidenciando perda de coesão celular e desestruturação da estratificação epitelial. (HE; aumento original 200x).

Foi também observada em alguns espécimes a invasão de células neoplásicas em vasos sanguíneos, esta foi notada em uma das lesões moderadamente diferenciadas, com grau 4 de padrão e estágio de invasão (Figura 16).

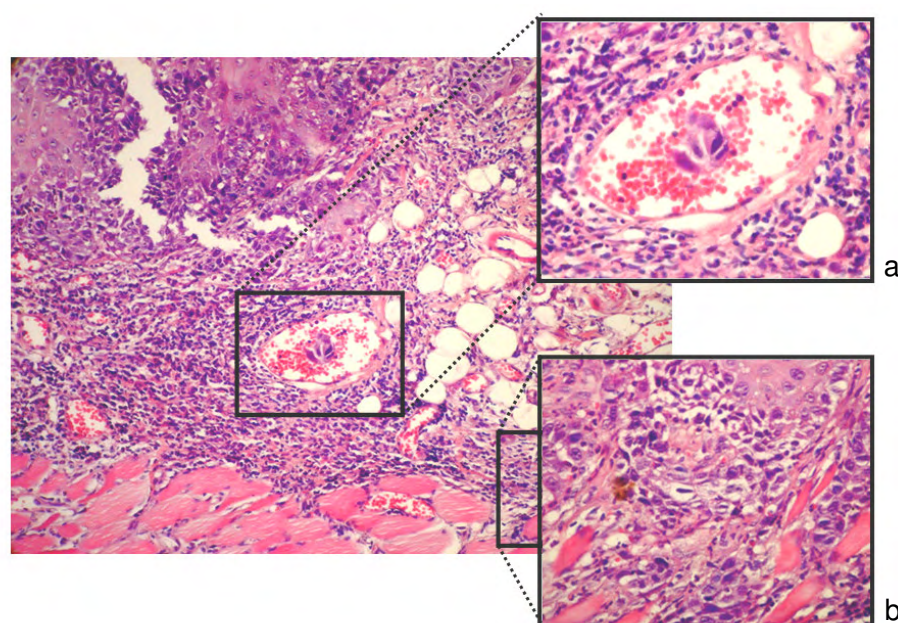


FIGURA 16- Lesão moderadamente diferenciada, com estágio e padrão de invasão grau 4 (HE; aumento original 100x). Destaque para a presença das células neoplásicas: a) No interior de um vaso sanguíneo; b) Entre os feixes musculares. (aumento original 400x).

5.2 Análise genotípica

Após a eletroforese, pôde-se detectar não apenas que havia amostras homozigotas e heterozigotas, mas também que o tamanho dos alelos variava entre as amostras (Figura 17). Com o auxílio do programa Phoretix 1D Advanced (Version 4.01, Non Linear Dynamics Ltd), foi possível realizar a mensuração do tamanho dos fragmentos com 119, 131 e 135 pb.

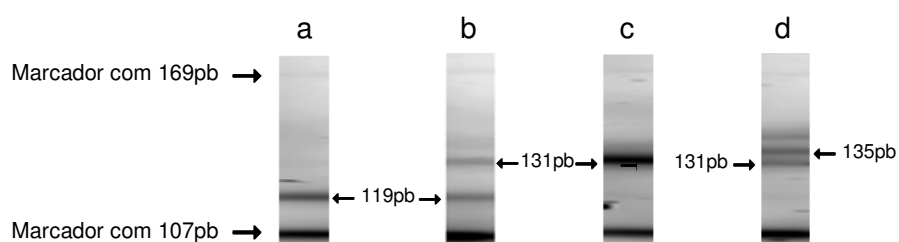


FIGURA 17- Detecção das bandas dos marcadores, superior e inferior, e das bandas de interesse: a) Amostra homozigota, com dois alelos apresentando 119 pb; b) Amostra heterozigota, com fragmentos de 119 e 131 pb; c) Homozigose para o alelo com 131 pb; d) Heterozigoto com alelos de 131 e 135 pb.

Posteriormente, foi então escolhida uma amostra de cada alelo encontrado e estas foram seqüenciadas (*forward* e *reverse*) na região de interesse, para a detecção do número de repetições. Verificou-se que os fragmentos mensurados com 119pb, 131pb e 135pb apresentavam respectivamente 18, 23 e 25 repetições (Figura 18).

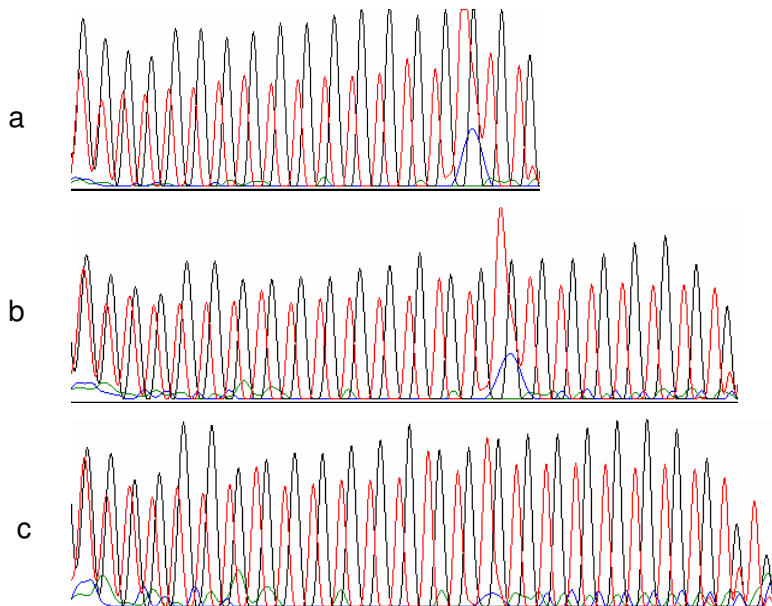


FIGURA 18- Seqüenciamento da região com o polimorfismo de repetição, no promotor do gene da MMP-9: a) Presença de 18 repetições; b) Presença de 23 repetições; c) Presença de 25 repetições.

Os genótipos encontrados foram homozigotos com 18 ou 23 repetições CA, além de heterozigotos compostos pelas seguintes combinações entre os alelos: 18/23 e 23/25 repetições. Não foram encontrados homozigotos com fragmentos apresentando 25 repetições, tampouco heterozigotos 18/25 repetições.

Anteriormente à avaliação da associação dos alelos e dos genótipos com as características clinicopatológicas, foi avaliada a distribuição destes dados. Em relação aos alelos, pôde-se notar que os animais apresentando 23 repetições CA foram maioria, enquanto os com 18 e 25 repetições apresentaram 16 e 17 casos, respectivamente (Figura 19a). Já a distribuição dos genótipos mostrou que o 23/23 foi o mais prevalente, estando presente em 64 animais (68,09%). Em seguida, o 23/25, observado em 17 casos, o 18/23 em 10 casos e o 18/18 em apenas 3 casos (3,19%) (Figura 19b).

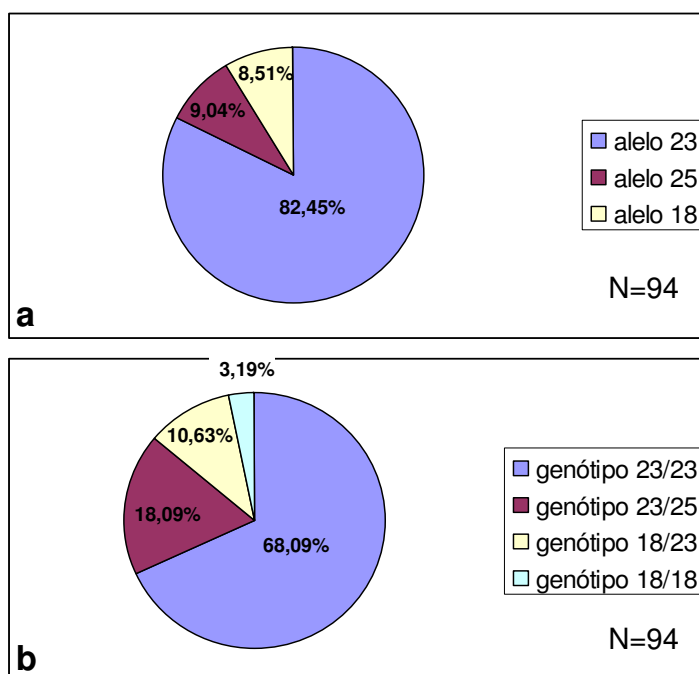


FIGURA 19- Distribuição relativa (%) dos 94 camundongos (N) em relação aos três diferentes alelos (a) e aos quatro diferentes genótipos (b) encontrados neste estudo da MMP-9.

O polimorfismo no gene da MMP-9 apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,4713$), significando que as frequências genotípicas esperadas foram similares às observadas.

5.3 Análises fenotípica x genotípica

Os dados da análise genotípica foram então comparados com os encontrados na análise fenotípica. Buscou-se avaliar a associação das características clínicas e histopatológicas tanto com os alelos quanto com os genótipos encontrados.

Todas as hipóteses de associação foram testadas por meio do teste qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Posteriormente, o risco relativo foi calculado pela razão de chance (OR) e seu intervalo de confiança (IC) de 95%.

5.3.1 Associação dos alelos com as características clinicopatológicas

Os dados clínicos e histopatológicos referentes a cada alelo e os valores de p encontrados após a aplicação do teste qui-quadrado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos aspectos clínicos e histopatológicos das lesões em relação aos alelos.
Resultado do teste qui-quadrado de associação (p valor)

Alelo		18	23	25	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
Lesão ulcerada	Ausente	0 (0)	21 (95,45)	1 (4,55)	0,2030
	Presente	16 (9,64)	134 (80,72)	16 (9,64)	
Diâmetro máximo	≤0,6cm	9 (7,76)	95 (81,90)	12 (10,34)	0,6769
	>0,6cm	7 (9,72)	60 (83,34)	5 (6,94)	
Estágio de invasão	grau 1	2 (7,14)	25 (89,29)	1 (3,57)	0,8063
	grau 2	12 (9,52)	103 (81,75)	11 (8,73)	
	grau 3	1 (5,55)	14 (77,78)	3 (16,67)	
	grau 4	1 (6,25)	13 (81,25)	2 (12,50)	
Padrão de invasão	grau 1	3 (7,14)	37 (88,10)	2 (4,76)	0,0659
	grau 2	4 (33,33)	7 (58,34)	1 (8,33)	
	grau 3	4 (5,88)	56 (82,36)	8 (11,76)	
	grau 4	5 (7,58)	55 (83,33)	6 (9,09)	
Diferenciação celular	alta	15 (10,00)	125 (83,33)	10 (6,67)	0,0362*
	moderada	1 (3,33)	30 (73,34)	7 (23,33)	
	baixa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

* p<0,05

Por meio do teste qui-quadrado, pôde-se notar que houve associação entre os alelos e o grau de diferenciação celular ($p=0,0362$). Após o cálculo do OR, verificou-se que os animais que carregam o alelo 25 apresentam 10,50 mais chances de desenvolver um carcinoma moderadamente diferenciado quando comparados com os animais com o alelo de 18 repetições (OR= 10,50; IC=1,11-98,92; $p=0,040$) e 2,92 mais chances quando comparados com os animais com o alelo de 23 repetições (OR= 2,92; IC=1,03-8,29; $p=0,045$).

Quando os alelos 18 e 23 foram agrupados para comparação com o alelo 25, notou-se que os animais que carregam o alelo 25 apresentam 3,16 mais chances de desenvolver um carcinoma moderadamente diferenciado (OR= 3,16; IC=1,12-8,96; $p=0,030$).

5.3.2 Associação dos genótipos com as características clinicopatológicas

Os mesmos testes estatísticos e os mesmos critérios adotados para análise da associação dos alelos com as características clinicopatológicas foram aplicados aos genótipos e encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos aspectos clínicos e histopatológicos das lesões em relação aos genótipos. Resultado do teste qui-quadrado de associação (p valor)

Genótipo		18/18	23/23	18/23	23/25	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Lesão ulcerada	Ausente	0 (0)	10 (90,91)	0 (0)	1 (9,09)	0,3570
	Presente	3 (3,61)	54 (65,06)	10 (12,05)	16 (19,28)	
Diâmetro máximo	≤0,6cm	2 (3,45)	39 (67,24)	5 (8,62)	12 (20,69)	0,7543
	>0,6cm	1 (2,78)	25 (69,44)	5 (13,89)	5 (13,89)	
Estágio de invasão	grau 1	0 (0)	11 (78,57)	2 (14,29)	1 (7,14)	0,8730
	grau 2	3 (4,76)	43 (68,26)	6 (9,52)	11 (17,46)	
	grau 3	0 (0)	5 (55,56)	1 (11,11)	3 (33,33)	
	grau 4	0 (0)	5 (62,50)	1 (12,50)	2 (25,00)	
Padrão de Invasão	grau 1	0 (0)	16 (76,19)	3 (14,29)	2 (9,52)	0,2930
	grau 2	1 (16,67)	2 (33,33)	2 (33,33)	1 (16,67)	
	grau 3	1 (2,94)	23 (67,65)	2 (5,88)	8 (23,53)	
	grau 4	1 (3,03)	23 (69,70)	3 (9,09)	6 (18,18)	
Diferenciação celular	alta	3 (4)	53 (70,67)	9 (12)	10 (13,33)	0,0936
	moderada	0 (0)	11 (57,90)	1 (5,26)	7 (36,84)	
	baixa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Com base nos resultados do teste qui-quadrado, notou-se que os genótipos não apresentaram associação com as características clinicopatológicas estudadas.

Posteriormente, fez-se o agrupamento dos genótipos, resultando em 4 análises com objetivos distintos. Na análise A, foi comparado o genótipo mais prevalente na população (23/23) versus os outros genótipos encontrados (18/18+18/23+23/25). Com a análise B, buscou-se verificar diferenças entre os genótipos que são homozigotos (18/18+23/23) em relação aos heterozigotos (18/23 e 23/25). Já a análise C agrupou os genótipos 18/18+18/23 versus 23/23+23/25, com o objetivo de verificar se a presença de pelo menos um alelo com 18 repetições poderia influenciar os resultados clínicos e histopatológicos. E finalmente a análise D foi utilizada para confrontar o genótipo 23/25 com os outros genótipos agrupados (18/18+18/23+23/23), buscando avaliar se a presença de pelo menos um alelo 25 poderia interferir nas características clinicopatológicas do CEC.

Após o teste qui-quadrado, foi encontrada uma associação na análise D, que confirmou a hipótese de que a presença de pelo menos um alelo 25 pode interferir no grau de diferenciação celular ($p=0,0058$), porém não nos outros resultados clinicopatológicos (ulceração, $p=0,6833$; tamanho, $p=0,5774$; estágio de invasão, $p=0,4204$; padrão de invasão, $p=0,6308$).

Após a avaliação da chance relativa, notou-se que o genótipo 23/25 apresenta quase quatro vezes mais chances de desenvolver um carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado quando comparado aos genótipos que não apresentam o alelo 25 (OR= 3,79; IC=1,21-11,92; $p=0,023$) nesta população estudada.

6 DISCUSSÃO

A indução de carcinoma espinocelular em pele de camundongos *hairless* foi recentemente implementada em nosso laboratório⁹. Analisando os resultados obtidos durante esse período pudemos observar que animais submetidos aos mesmos procedimentos, durante períodos experimentais idênticos, apresentaram características clínicas e histológicas distintas. Os animais que desenvolveram lesões classificadas como CEC, apresentaram variação com relação ao estágio de invasão da neoplasia, segundo o sistema proposto por Anneroth et al.², apresentando diferentes graus de malignidade.

Tendo em vista o fato da utilização de um modelo de estudo onde as interferências externas são minimizadas, acreditamos que a presença de diferentes fenótipos possa ser justificada por alterações no genótipo destes animais.

Dentre as alterações genéticas, escolhemos estudar os polimorfismos, os quais têm sido investigados nos genes das MMPs, principalmente em patologias caracterizadas pela degradação da matriz extracelular^{82,99}, nas quais inclui-se o câncer.

A investigação de alterações especificamente no promotor do gene é relevante devido a importante ação desta região no controle da transcrição⁸², principal etapa de regulação das MMPs²².

A enzima MMP-9 foi escolhida devido ao seu destacado papel na degradação de colágeno tipo IV^{45,90,93} e conseqüente importância no rompimento da membrana basal, atuando, dessa forma, no processo de invasão do câncer^{18,42,88,103}.

Na região promotora desta enzima é relatada a presença de um polimorfismo de repetição CA^{23,24,26,66,71}, onde o aumento no número de repetições deste dinucleotídeo, leva a um crescimento na atividade

enzimática da MMP-9^{28,39,71,81}. Acredita-se que apesar deste polimorfismo não justificar a doença, ao interferir a expressão de MMP-9, ele possa agir no desenvolvimento da patologia²³.

Em humanos já foram encontrados diversos alelos, apresentando de 13 a 27 repetições CA, variando suas prevalências de acordo com a população estudada^{23,24,25,26,66,71}. Em camundongos, uma pesquisa em cultura de células encontrou alelos apresentando 20 e 24 repetições²⁸. Porém, visto que os autores investigaram apenas dois tipos de cultura de células, houve uma limitação dos seus achados, com a observação de apenas dois alelos distintos.

Em contrapartida, nosso estudo investigou 94 camundongos e demonstrou pela primeira vez três diferentes alelos (18, 23 e 25 repetições CA). Acreditamos que, talvez, se tivéssemos pesquisado um número maior de animais, poderíamos ter encontrado a presença de uma variação mais ampla de alelos, como a encontrada em humanos^{23,24,25,26,66,71}.

Outra diferença entre os estudos é que o polimorfismo relatado por Fornoni et al.²⁸ foi em células de camundongos B6SJL e ROP, já o presente trabalho identifica pela primeira vez a presença desta variação gênica em camundongos da linhagem HSR/J.

Tendo detectado a presença deste polimorfismo, buscamos associá-lo às características clínicas e histopatológicas do carcinoma espinocelular desenvolvido na pele de camundongos *hairless* após indução por carcinogênese química.

A gradação histológica do CEC representa uma importante avaliação, de forma antecipada, do comportamento biológico da neoplasia¹⁴. Apesar de alguns patologistas basearem a classificação do CEC na diferenciação celular, classificando-os em bem, moderadamente e pouco diferenciados¹⁴, outros critérios semi-quantitativos podem ser adicionados à classificação, buscando não apenas a avaliação das

características das células neoplásicas, mas também da resposta do hospedeiro frente à invasão².

Como a MMP-9 exerce papel chave na degradação da membrana basal e o polimorfismo de repetição CA na região promotora desta proteína pode estar ligado ao aumento da sua expressão^{28,39,81}, acreditamos, a princípio, numa possível relação entre o grau de invasão tumoral e a presença do polimorfismo na região promotora do gene.

Entretanto, ao comparar os resultados genéticos e histopatológicos encontramos uma interessante associação entre a redução da diferenciação celular dos CECs desenvolvidos pela carcinogênese química e o aumento de repetições CA.

Interessantemente verificamos que animais com pelo menos um alelo apresentando 25 repetições CA (o maior alelo encontrado neste estudo) apresentam 3,16 mais chances de desenvolver carcinomas moderadamente diferenciados quando comparados aos animais com os alelos de 18 + 23 repetições. Em adição, observamos ainda que essa relação é válida não apenas na avaliação dos alelos, mas também na comparação entre o genótipo 23/25 e os genótipos 18/18+18/23+23/23 (OR=3,79).

A relação entre o aumento da expressão da MMP-9 e a perda da diferenciação histológica é relatada em câncer de endométrio^{1,18} e carcinoma esofágico³³. Sugerimos que este fato possa, em parte, justificar a relação existente entre os carcinomas menos diferenciados e a alta tendência à malignidade, onde a alta expressão de MMP-9 pode determinar às células neoplásicas uma maior chance de invasão e conseqüente metástase³³. Com base nos nossos achados, sugerimos que o mesmo fato possa ocorrer em carcinoma espinocelular de pele, visto que, devido ao maior número de repetições estar relacionado com a maior expressão da enzima^{28,39,81}, acreditamos que o alelo com 25 repetições poderia ser responsável pela maior expressão de MMP-9 e conseqüente alteração nas características histopatológicas do CEC.

Vão de encontro a nossa teoria dois estudos. O primeiro, no qual uma cultura de carcinoma esofágico, formada por células pouco diferenciadas, apresenta menor número de repetições e menor produção de MMP-9⁸¹. E o segundo, no qual a deficiência de MMP-9 em camundongos transgênicos está ligada à perda de diferenciação¹³.

Desta forma entendemos que talvez a avaliação imunoistoquímica em nosso material, elucidaria se existe, nesse caso, a relação entre os animais com o alelo de 25 repetições e a presença de uma maior quantidade de enzima.

A mesma discussão acerca da expressão imunoistoquímica e a característica de invasão neoplásica está presente na literatura. Em culturas de células de adenocarcinoma de pulmão, Huang et al.³⁹ verificaram que a redução no número de repetições CA no gene da MMP-9 interferiu na capacidade de invasão das células neoplásicas. Com o mesmo objetivo, nosso estudo buscou verificar se há uma influência do número de repetições nas características de invasão da neoplasia; entretanto, diferentemente de Huang et al.³⁹, não foi encontrada associação entre o polimorfismo e a invasão do carcinoma espinocelular de pele.

Baseando-se na expressão imunoistoquímica da MMP-9, outros autores concordam com os achados de Huang et al.³⁹, em relação à associação entre o aumento da expressão desta gelatinase e a maior capacidade de invasão em carcinoma oral⁴², gástrico¹⁰³ e de endométrio¹⁸. Entretanto, discordando destes achados, a invasão dos carcinomas de cabeça e pescoço⁷⁹ e esofágico^{33,47} não foram associadas à imunomarcagem desta enzima.

Buscando justificar a ausência de associação entre a MMP-9 e a profundidade de invasão da neoplasia, Gu et al.³³, basearam-se no fato de que o principal substrato da MMP-9 é o colágeno tipo IV e não o tipo I. Durante o processo de invasão da neoplasia, o primeiro tipo de colágeno a ser rompido é o colágeno tipo IV da membrana basal, necessitando de

um papel fundamental da gelatinase, porém, o que interfere na profundidade da invasão é a capacidade de degradação do colágeno tipo I, o maior componente do tecido conjuntivo³³.

Desta maneira, sabendo-se que a MMP-1 é responsável pela degradação de colágeno tipo I^{4,45}, polimorfismos no gene desta enzima também são alvos e podem estar relacionados com a capacidade de invasão do câncer de pele¹⁰⁰. Assim, também é sugerido um conjunto das ações enzimáticas de várias metaloproteinases.

Por outro lado, no presente estudo, acreditamos que outros fatores possam ter interferido para a não detecção da associação entre o polimorfismo e a invasão do CEC de pele, como por exemplo, o período experimental escolhido. Estabelecemos um período de 16 semanas de aplicação do carcinógeno, com base no estudo de Carmo⁹. Esta autora verificou que 12 semanas eram suficientes para a indução de 45,5% de casos de carcinoma epidermóide, porém, apesar de detectados vários estágios de invasão, poucos casos apresentaram grau 3 e nenhum grau 4. Desta maneira, decidimos realizar a aplicação do DMBA durante 16 semanas para poder comparar todos os graus de invasão.

Contudo, acreditamos que se tivéssemos mantido as 12 semanas de carcinogênese, poderíamos observar o momento crítico de ação da MMP-9, que é o rompimento da membrana basal. Assim, poderíamos ter comparado a relação entre a presença do polimorfismo no gene da MMP-9 e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CEC invasivo, agindo precocemente na detecção da doença.

O papel da MMP-9 na degradação da membrana basal interfere não apenas na invasão do tecido conjuntivo, mas também na invasão vascular, o que conseqüentemente pode gerar metástase. Há uma relação entre a expressão de MMP-9 e o aumento da invasão vascular^{18,33}. Além disso, esta gelatinase também pode estar relacionada com a angiogênese^{13,15}. A deficiência de MMP-9 nas células do hospedeiro inibe a formação dos vasos⁴⁰ e este é outro fator que pode ser

avaliado nos espécimes de nosso estudo, buscando verificar se o aumento do número de repetições também pode ser relacionado com a neoformação vascular, fato ainda não relatado na literatura.

No estudo de Koyama et al.⁴⁷, a invasão neoplásica não foi relacionada à MMP-9. Porém, os autores verificaram que nem toda célula positiva imunoistoquimicamente apresentou atividade gelatinolítica, sugerindo que a presença de MMP detectada pode não estar diretamente relacionada com a invasão.

Frente ao relatado, nota-se que a maioria dos estudos detecta os níveis de MMP-9 por meio da técnica de imunoistoquímica e esta avaliação tem grande capacidade de apresentar a localização da gelatinase no tecido tumoral⁴². Visto que, da mesma forma que as outras MMPs, a MMP-9 é secretada como zimógeno e permanece inativa até que seja ativada⁷⁵, esta análise pode às vezes resultar em falso positivo. Em adição, a zimografia demonstra a ação proteolítica e assim fornece medidas semi-quantitativas das MMPs no tumor, além de distinguir a MMP de forma ativa da pró-enzima⁴². Desta maneira, a avaliação concomitante da zimografia e da imunoistoquímica mostra-se importante na detecção das MMPs e a utilização conjunta destas técnicas poderia complementar os resultados encontrados no presente estudo.

Ainda avaliando nossos resultados, não verificamos nenhuma relação das características clínicas (presença de ulceração e aumento do tamanho da lesão) com o polimorfismo de repetição no gene da MMP-9.

A constatação da inexistência de associação entre o tamanho da lesão e o polimorfismo da MMP-9 corrobora com os achados de Ruokolainen et al.⁷⁹ e Li et al.⁵¹, os quais não verificaram aumento da expressão imunoistoquímica de MMP-9 nas maiores lesões de seus pacientes. Em contrapartida Przybylowska et al.⁷⁴ encontraram um maior nível de MMP-9 no grupo de pacientes com câncer de mama que apresentaram lesões com maior tamanho. Acreditamos que um dos fatores que dificultam a comparação dos resultados quanto ao tamanho

da lesão, pode ser o parâmetro de cada estudo para a divisão entre os grupos de maior e menor dimensão. Nossos grupos foram subdivididos de acordo com o valor médio encontrado (0,6 cm), diferentemente de outros estudos em que esta divisão foi em três grupos: <2 cm, de 2 a 5 cm e >5 cm⁵¹ ou ainda de 0,2 a 1,5 cm, de 1,6 a 2,5 cm e de 2,6 a 7,7 cm⁷⁴.

Em relação à metodologia empregada para a detecção dos diferentes genótipos, apesar da técnica MADGE ser relatada como uma genotipagem acurada para repetição de dinucleotídeos⁷⁷, pela avaliação dos nossos resultados pôde-se verificar uma divergência entre os resultados encontrados pelo programa Phoretix e pelo seqüenciamento genético. De acordo com o número de pares de base da região do gene da MMP-9 estudada, os fragmentos com 18, 23 e 25 repetições deveriam apresentar 117, 127 e 131 pb, porém, após análise dos valores encontrados pelo programa Phoretix, os fragmentos do nosso estudo apresentaram 119, 131 e 135 pb. Contudo, entendemos que esta variação não interferiu na análise dos resultados, visto que o padrão da corrida foi mantido em todo o gel e, o valor conservado entre as amostras com mesmo alelo.

De qualquer forma, é importante ressaltar que existem várias vantagens para a utilização do sistema MADGE. O gel utilizado apresentou formato modificado^{10,77}, permitindo a corrida das 94 amostras simultaneamente. Desta maneira, minimizou-se a possível variação individual dos géis quando utilizadas diversas corridas eletroforéticas. Em adição, houve a redução do custo financeiro, visto que a análise do gel possibilitou a detecção de três diferentes alelos, o que tornou possível o seqüenciamento de apenas três amostras, ao invés de 94.

Visto que o protocolo básico utilizado para a detecção de repetições de dinucleotídeos pelo sistema MADGE⁷⁷ foi seguido em nosso estudo, acreditamos que a mensuração do tamanho dos fragmentos não tenha sido exata neste trabalho, talvez devido à escolha dos marcadores. Enquanto Rodrigues et al.⁷⁷ utilizaram marcadores que apresentavam

apenas 30 pb de diferença entre eles, nós utilizamos marcadores com 62 pb de intervalo (107 e 169 pb). Este aumento da região de interesse do gel pode ter reduzido a eficácia da medição exata pelo programa Phoretix, aumentando em 2 pb o tamanho do menor fragmento e em 4 pb os dois alelos maiores.

Diferentemente de outros trabalhos que verificaram o papel deste polimorfismo comparando indivíduos controles e doentes, os quais sofreram diferentes estímulos ambientais, a nossa metodologia pôde verificar o papel deste polimorfismo quando os animais apresentam as mesmas condições para o desenvolvimento da doença, podendo assim verificar seu papel com menor interferência de agentes externos.

Neste estudo, buscamos minimizar as interferências ambientais, escolhendo um modelo animal para esta investigação. Optou-se pelo modelo de carcinogênese em pele de camundongos, principalmente pela sua eficácia no desenvolvimento da progressão tumoral^{3,68,83,104} e pelo fato dos resultados obtidos apresentarem grande significado para o câncer epitelial humano⁶¹. Em adição, previamente ao início da pesquisa, buscamos verificar se o estudo em camundongos é um modelo seguro para o entendimento do efeito de polimorfismos genéticos em humanos. Segundo Fiotti et al.²⁶, as regiões promotoras do gene da MMP-9 em humanos e camundongos são semelhantes, e desta maneira, esta metodologia é confiável.

Devido ao fato de ainda não se saber exatamente como o comprimento da região promotora pode interferir no desenvolvimento das patologias²⁸, estudos adicionais são indicados para avaliar a expressão imunoistoquímica e zimográfica relacionada a cada genótipo.

Apesar de não termos avaliado a expressão imunoistoquímica tampouco a zimografia da MMP-9, acreditamos que nossos resultados sejam justificados pela diferença na expressão da MMP-9 na presença de maiores repetições CA na região promotora, semelhantemente a Fornoni et al.²⁸, Huang et al.³⁹, Peters et al.⁷¹ e Shimajiri et al.⁸¹.

O presente estudo é o primeiro a avaliar a associação do polimorfismo de repetição CA na região promotora do gene da MMP-9 com as características clínicas e histopatológicas do carcinoma de pele. Além disso, mostra-se importante devido ao fato dos resultados indicarem que o aumento no número de repetições CA pode contribuir para a redução da diferenciação celular de carcinomas espinocelulares induzidos pelo DMBA na pele de camundongos *hairless*.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a presença de polimorfismo do tipo microssatélite (repetições CA) na região promotora do gene da MMP-9 não está associada às características clínicas (tamanho e ulceração), nem às características histopatológicas de padrão e estágio de invasão. Entretanto, o aumento no número de repetições CA pode contribuir para a redução da diferenciação celular de carcinomas espinocelulares induzidos pelo DMBA na pele de camundongos *hairless*.

8 REFERÊNCIAS *

- 1 Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B et al. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol*. 2004 Sept.; 94(3): 699-704.
- 2 Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987 June; 95(3): 229-49.
- 3 Aldaz CM, Conti CJ, Klein-Szanto AJ, Slaga TJ. Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: relevance to malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Apr.; 84(7): 2029-32.
- 4 Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 1995 Oct.; 7(5): 728-35.
- 5 Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*. 2003 June; 384(6): 863-72.

*Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]

Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 6 Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997 May; 8(3): 444-72.
- 7 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [texto on line]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado em 01 jun. 2007]. 94p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>.
- 8 Brasileiro G Filho, Pereira FEL, Guimarães RC. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo. *Patologia geral*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004. Cap.8, p.173-234.
- 9 Carmo ED. Carcinoma epidermóide induzido quimicamente pelo DMBA em pele de camundongos *hairless*: estudo clínico, histológico e histoquímico [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 10 Chen XH, O'Dell SD, Day IN. Microplate array diagonal gel electrophoresis for cohort studies of microsatellite loci. *Biotechniques*. 2002 May; 32(5):1080-9.
- 11 Cooper GM. *A célula: uma abordagem molecular*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.

- 12 Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. BMC Med Genet [periódico on line]. 2007 Mar. [cited 2007 Jun. 01]; 8:[about 10p].
- 13 Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell. 2000 Oct.; 103(3): 481-90.
- 14 Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. Cancer. 1984 Dec.; 54(12): 2995-3001.
- 15 Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2006 Mar.; 25(1): 9-34.
- 16 Devor DE, Henneman JR, Kurata Y, Rehm S, Weghorst CM, Ward JM. Pathology procedures in laboratory animal carcinogenesis studies. In: Waalkes MP, Ward JM. Carcinogenesis. New York: Raven Press; 1994. Cap.13, p. 429-66.
- 17 DiGiovanni J. Multistage skin carcinogenesis in mice. In: Waalkes MP, Ward JM. Carcinogenesis. New York: Raven Press; 1994. Cap.9, p. 265-300.
- 18 Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. Cancer. 2002 Mar.; 94(5): 1466-75.

- 19 Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2000, 2(4): 252-7.
- 20 Einspahr JG, Stratton SP, Bowden GT, Alberts DS. Chemoprevention of human skin cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Mar.; 41(3): 269-85.
- 21 Farah SB. DNA e a lei. In: DNA: segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997. Cap.7, p.173-84.
- 22 Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998. Cap.12, p.299-356.
- 23 Fiotti N, Altamura N, Fisicaro M, Carraro N, Adovasio R, Sarra VM et al. MMP-9 microsatellite polymorphism: association with the progression of intima-media thickening and constrictive remodeling of carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2005 Oct.; 182(2): 287-92.
- 24 Fiotti N, Altamura N, Fisicaro M, Carraro N, Uxa L, Grassi G et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 June; 26(6):1330-6.
- 25 Fiotti N, Pedio M, Battaglia Parodi M, Altamura N, Uxa L, Guarnieri G et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to exudative form of age-related macular degeneration. *Genet Med.* 2005 Apr.; 7(4): 272-7.

- 26 Fiotti N, Zivadinov R, Altamura N, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004 July; 152(1-2): 147-53.
- 27 Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(5-6): 411-24.
- 28 Fornoni A, Wang Y, Lenz O, Striker LJ, Striker GE. Association of a decreased number of d(CA) repeats in the matrix metalloproteinase-9 promoter with glomerulosclerosis susceptibility in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Aug.; 13(8): 2068-76.
- 29 Franks LM. O que é câncer? In: Franks LM, Teich NM. *Introdução à biologia celular e molecular do câncer.* São Paulo: Roca; 1990. Cap.1, p.1-24.
- 30 Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2004 May; 17(5): 496-502.
- 31 Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res.* 2002 Dec.; 8(12): 3820-3.
- 32 Grieco F, Li WQ, Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Dec.; 88(3): 197-204.

- 33 Gu ZD, Chen KN, Li M, Gu J, Li JY. Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb.; 11(6): 871-4.
- 34 Guzman-Silva MAG. Revisão e atualização sobre carcinogênese química cutânea. *Rev Bras Cancerol*. 1995; 41(2): 93-108.
- 35 Guzman-Silva MAG, Guimarães JSP. Carcinogênese química cutânea. *Rev Bras Cancerol*. 1985; 31(4): 285-91.
- 36 Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb.; 93(3): 178-93.
- 37 Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y et al. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2002 Dec.; 102(5): 526-9.
- 38 Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol*. 2000 Mar.; 36(2): 207-13.
- 39 Huang TS, Lee CC, Chang AC, Lin S, Chao CC, Jou YS et al. Shortening of microsatellite deoxy(CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan.; 300(4): 901-7.

- 40 Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R et al. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *Natl Cancer Inst.* 2002 Aug.; 94(15): 1134-42.
- 41 Humble MC, Trempus CS, Spalding JW, Cannon RE, Tennant RW. Biological, cellular, and molecular characteristics of an inducible transgenic skin tumor model: a review. *Oncogene.* 2005 Dec.; 24(56): 8217-28.
- 42 Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis.* 1999 June; 17(4): 315-23.
- 43 Iki K, Tsutsumi M, Kido A, Sakitani H, Takahama M, Yoshimoto M et al. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membrane-type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis.* 1999 July; 20(7): 1323-9.
- 44 Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R et al. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis.* 1999 Mar.; 17(2): 177-81.
- 45 Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003 Apr.; 12(2): 109-25.

- 46 Kido A, Tsutsumi M, Iki K, Motoyama M, Takahama M, Tsujiuchi T et al. Inhibition of spontaneous rat osteosarcoma lung metastasis by 3S-[4- (N-hydroxyamino) -2R- isobutylsuccinyl]amino -1- methoxy -3,4-dihydroc arbostyrl, a novel matrix metalloproteinase inhibitor. *Jpn J Cancer Res.* 1999 Mar.; 90(3): 333-41.
- 47 Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *Eur J Cancer.* 2000 Oct.; 36(16): 2164-70.
- 48 Kozulic B. Looking at bands from another side. *Anal Biochem.* 1994 Feb.; 216(2): 253-61 apud Rodriguez S, Chen XH, Day IN. Typing dinucleotide repeat loci using microplate array diagonal gel electrophoresis: proof of principle. *Electrophoresis.* 2004 Apr.; 25(7-8): 975-9.
- 49 Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol.* 2000 Dec.; 157(6): 1777-83.
- 50 Lewin B. De genes a genomas. In: Lewin B. *Genes VII.* Porto Alegre: Artmed; 2001. Cap. 2, p.35-62.
- 51 Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Nov.; 88(1): 75-85.

- 52 Li WP, Anderson CJ. Imaging matrix metalloproteinase expression in tumors. *Q J Nucl Med*. 2003 Sept.; 47(3): 201-8.
- 53 Lin SC, Chung MY, Huang JW, Shieh TM, Liu CJ, Chang KW. Correlation between functional genotypes in the matrix metalloproteinases-1 promoter and risk of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2004 July; 33(6): 323-6.
- 54 Lin SC, Lo SS, Liu CJ, Chung MY, Huang JW, Chang KW. Functional genotype in matrix metalloproteinases-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2004 Aug.; 33(7): 405-9.
- 55 Loureiro APM, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím Nova*. 2002; 25(5): 777-93.
- 56 Louro ID, Melo MSV, Galeotti S. Conceitos gerais de genética molecular. In: Louro ID, Llerena Júniro JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes N. *Genética molecular do câncer*. São Paulo: MSG; 2002. Cap.1, p.11-24.
- 57 Macejova D, Brtko J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). *Endocr Regul*. 2001 Mar.; 35(1): 53-9.
- 58 Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Sugimoto T et al. Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Oct.; 60(4): 1428-34.

- 59 Maekawa R, Maki H, Wada T, Yoshida H, Nishida-Nishimoto K, Okamoto H et al. Anti-metastatic efficacy and safety of MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor. Clin Exp Metastasis. 2000; 18(1): 61-6.
- 60 Maki H, Hojo K, Tanaka H, Sawada TY, Maekawa R, Yoshioka T. Augmented anti-metastatic efficacy of a selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, in combination with CPT-11. Clin Exp Metastasis. 2002; 19(6): 519-26.
- 61 Marks F, Furstenberger G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. Eur J Cancer. 2000 Feb.; 36(3): 314-29.
- 62 Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Jan.; 131(1): 19-25.
- 63 Montenegro MR. Neoplasias. In: Montenegro MR, Franco M. Patologia. Processos Gerais. 4.ed. São Paulo: Atheneu; 1999. Cap.14, p. 241-54.
- 64 Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. Pathol Int. 2002 Apr.; 52(4): 255-64.

- 65 Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 July; 274(31): 21491-4.
- 66 Nelissen I, Vandenbroeck K, Fiten P, Hillert J, Olsson T, Marrosu MG et al. Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000 June; 105(1): 58-63.
- 67 Ohtani H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int.* 1998 Jan.; 48(1): 1-9.
- 68 Owens DM, Wei SJ, Smart RC. A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1999 Sept.; 20(9): 1837-44.
- 69 Parks WC, Sudbeck BD, Doyle GR, Saariahlo-Kere UK. Matrix metalloproteinases in tissue repair. In: Parks, WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases.* San Diego: Academic Press; 1998. Cap.11, p. 263-98.
- 70 Pereira AD Netto, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Quím Nova.* 2000; 23(6): 765-73.
- 71 Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke.* 1999 Dec.; 30(12): 2612-6.

- 72 Pezeshki A, Sari-Aslani F, Ghaderi A, Doroudchi M. p53 codon 72 polymorphism in basal cell carcinoma of the skin. *Pathol Oncol Res.* 2006; 12(1): 29-33.
- 73 Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene.* 2006 Mar.; 25(11): 1602-11.
- 74 Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, Krawczyk T, Kulig A, Rykala J et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Jan.; 95(1): 65-72.
- 75 Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2006 July; 26(4): 299-307.
- 76 Rodrigues MAM, Camargo JLV. Carcinogênese. In: Montenegro, MR, Franco M. *Patologia: processos gerais.* 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap.13, p.223-40.
- 77 Rodriguez S, Chen XH, Day IN. Typing dinucleotide repeat loci using microplate array diagonal gel electrophoresis: proof of principle. *Electrophoresis.* 2004 Apr.; 25(7-8): 975-9.
- 78 Rothenberg ML, Nelson AR, Hande KR. New drugs on the horizon: matrix metalloproteinase inhibitors. *Stem Cells.* 1999; 17(4): 237-40.
- 79 Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 May; 10(9): 3110-6.

- 80 Santos O, McDermott CD, Daniels RG, Appelt K. Rodent pharmacokinetic and anti-tumor efficacy studies with a series of synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis*. 1997 Sep.; 15(5): 499-508.
- 81 Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY et al. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett*. 1999 July; 455(1-2): 70-4.
- 82 Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev. Fac Odontol Bauru*. 2002 jan./mar.; 10(1): 1-6.
- 83 Stenback F, Makinen MJ, Jussila T, Kauppila S, Risteli J, Talve L et al. The extracellular matrix in skin tumor development-a morphological study. *J Cutan Pathol*. 1999 Aug.; 26(7): 327-38.
- 84 Stern MC, Benavides F, Klingelberger EA, Conti CJ. Allelotype analysis of chemically induced squamous cell carcinomas in F (1) hybrids of two inbred mouse strains with different susceptibility to tumor progression. *Carcinogenesis*. 2000 July; 21(7): 1297-301.
- 85 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516.
- 86 Su L, Zhou W, Park S, Wain JC, Lynch TJ, Liu G et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar.; 14(3): 567-70.

- 87 The Jackson Laboratory. JAX ® Mice Data Sheet [text on line]; [cited on 2006 Apr. 10]. Disponível em: <http://jaxmice.jax.org/strain/000673.html>
- 88 Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999 May; 35(3): 227-33.
- 89 Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 July; 87(14): 5578-82.
- 90 Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* 2002 May; 99(2): 157-66.
- 91 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May; 92(8): 827-39.
- 92 Weisburger EK. General principles of chemical carcinogenesis. In: Waalkes MP, Ward JM. *Carcinogenesis*. New York: Raven Press; 1994. Cap.1, p. 1-24.
- 93 Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991 May; 5(8): 2145-54.
- 94 Woessner JF Jr. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. San Diego: Academic Press; 1998. Cap.1, p.1-14.

- 95 Woodworth CD, Michael E, Smith L, Vijayachandra K, Glick A, Hennings H et al. Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte. *Carcinogenesis*. 2004 Sept.; 25(9): 1771-8.
- 96 Wylie S, MacDonald IC, Varghese HJ, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC et al. The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 1999 Mar.; 17(2): 111-7.
- 97 Yamagiwa K, Ichikawa K. On the experimental production of papilomas (in German). *Verh Jpn Pathol Ges*, v.5, p.142-8, 1915 apud Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997 May; 8(3): 444-72.
- 98 Yamanaka K, Mizol M, Kato K, Hasegawa A, Nakano M, Okada S. Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol Pharm Bull*. 2001 May; 24(5): 510-4.
- 99 Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol*. 2000 Dec.; 19(7): 623-9.
- 100 Ye S, Dhillon S, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM, Pickering RM et al. Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. *Cancer Res*. 2001 Feb.; 61(4): 1296-8.

- 101 Yu AE, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG. 72-kDa Gelatinase (Gelatinase A): structure, activation, regulation and substrate specificity. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998. Cap.4, p. 85-114.
- 102 Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999 Apr.; 99(14): 1788-94.
- 103 Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2003 May; 9(5): 899-904.
- 104 Zoumpourlis V, Solakidi S, Papathoma A, Papaevangeliou D. Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2003 July; 24(7): 1159-65.

Anexo A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP



CERTIFICADO

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 017/2005-PA/CEP, sobre “**Avaliação da relação entre a presença de polimorfismo no gene da metaloproteinase - 9 e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide quimicamente induzido pelo DMBA na pele de camundongos Hairless**”, sob a responsabilidade de **ANDRESA COSTA PEREIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de agosto de 2005.

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Pereira AC. *Analysis of the association between the metalloproteinase-9 gene polymorphism and the development of squamous cell carcinoma chemically induced by DMBA in hairless mice skin [thesis]*. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos. UNESP – São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

The metalloproteinase-9 (MMP-9) is an important enzyme during the basement membrane degradation, an essential step for cancer invasion. The aim of this study was to test the hypothesis that the CA repeat polymorphism in the MMP-9 gene promoter interferes on clinical and histopathological features of the squamous cell carcinoma. Ninety-four hairless mice were submitted to chemically induced skin carcinogenesis (DMBA 0,5%), once a week, during 16 weeks. At 17th week, the animals were photographed and the lesions were clinically evaluated (for size and ulceration presence). Then, the lesions were biopsied and, after the routine laboratorial processing, the histopathological evaluation (stage of invasion, pattern of invasion and differentiation grade) was performed. At the biopsy, 0.5cm of each animal tail was collected for DNA extraction and evaluation of the CA repeat polymorphism in the MMP-9 gene promoter. The data was analyzed by chi-square test to evaluate whether the MMP-9 alleles or genotypes were associated with clinical and histopathological features. There was an association of the allele with 25 CA repeats with moderately differentiated lesions. The data suggest that the MMP-9 gene polymorphism is related to the reduction on histological differentiation in squamous cell carcinoma induced by DMBA in hairless mice skin.

KEYWORDS: *squamous cell carcinoma, polymorphism, matrix metalloproteinase 9*