

ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO

**METALOPROTEINASES 2 E 9: EXPRESSÃO, INIBIDORES TECIDUAIS E
INIBIÇÃO POR EXTRATOS NATURAIS NO CARCINOMA DE CÉLULAS
BASAIS E CARCINOMA ESPINOCELULAR**

Belo Horizonte

Abril de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

TESE DE DOUTORADO

**METALOPROTEINASES 2 E 9: EXPRESSÃO, INIBIDORES TECIDUAIS E
INIBIÇÃO POR EXTRATOS NATURAIS NO CARCINOMA DE CÉLULAS
BASAIS E CARCINOMA ESPINOCELULAR**

Belo Horizonte,
Abril de 2007

ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO

**METALOPROTEINASES 2 E 9: EXPRESSÃO, INIBIDORES TECIDUAIS E
INIBIÇÃO POR EXTRATOS NATURAIS NO CARCINOMA DE CÉLULAS
BASAIS E CARCINOMA ESPINOCELULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Universidade Federal de Minas
Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção
do grau de Doutor em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2007

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali e Prof. Dr. Adriano Mota Loyola, exemplos de postura ética, responsável e sensata diante da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, mentor e colaborador, pelos ensinamentos, pela dedicação e perseverança incansáveis, pela paciência e por todo apoio.

Ao Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso pela inestimável colaboração nas análises estatísticas e redação dos artigos relacionados ao trabalho de Tese.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos pacientes voluntários que participaram desta pesquisa.

A todos familiares, professores, colegas, estagiários, alunos e amigos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado, em especial: Juliana Sayuri Kuribayashi, Paulo César Borges Júnior, Ignez Caneloro, Ângela Maria Pereira

À CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço e dedico esta tese ao meu esposo Hélio e a meus filhos Augusto, Hélio Neto e Ana, que me proporcionaram tempo para dedicação a esse trabalho. Pela paciência, apoio e carinho, muito obrigada.

SUMÁRIO

	PAG
1 – Introdução	12
1.1– Carcinoma de pele.....	12
1.1.1 – Carcinoma basocelular	12
1.1.2 – Carcinoma Espinocelular.....	13
1.1.3 – Ocorrência de Metástases.....	13
1.2 – Metaloproteinasas de matriz (MMPs).....	15
1.3 – Inibição da atividade das MMPs.....	15
1.3.1 – Inibidores de metaloproteinasas teciduais (TIMPs).....	15
1.3.2 – Inibidores naturais de MMPs.....	17
1.3.3 – Inibidores naturais da carcinogênese.....	18
2 – Objetivos	21
3 – Material e Métodos	22
3.1 – Amostras.....	22
3.1.1 – Carcinoma basocelular.....	22
3.1.2 – Carcinoma espinocelular.....	23
3.1.2 – Pele normal.....	23
3.2 – Análises histológicas.....	23
3.3 – Imuno-histoquímica.....	24
3.4 – Avaliação da imunomarcção.....	24
3.5 – Análise zimográfica.....	25
3.5.1 – Padronização da técnica de zimograma.....	25
3.5.1.1 Coleta da saliva.....	25
3.5.2 – Obtenção dos extratos liofilizados.....	25
3.5.3 – Ensaio zimográficos.....	26
3.5.3.1 – Ensaio com metaloproteinasas 2 e 9.....	26
3.5.4 – Avaliação zimográfica.....	26

3.6 – Análise estatística.....	27
4 – Resultados	28
4.1 – Artigo científico submetido a periódico: Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares	29
4.2 – Artigo científico a ser submetido a publicação em periódico: Imunolocalização de MMP-2, -9 e de seus inibidores teciduais TIMP-2 e TIMP-1 em carcinomas espinocelulares de pele.....	51
4.3 – Artigo científico aceito para publicação em periódico: Inhibition of Matrix-Metalloproteinases by <i>Aloe vera</i> , <i>Annona muricata</i> , and Black Tea Aqueous Extracts.....	80
5. Considerações Finais.....	93
6. – Conclusões.....	94
7. – Referências Bibliográficas.....	95

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. <i>Camellia sinensis</i>	17
Figura 2. – <i>Aloe vera</i>	19
Figura 3. <i>Annona muricata</i>	20

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Documento comprobatório da aprovação do Comitê Institucional de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Número do protocolo – 100/02).....	111
Anexo 2: Termos de consentimento dos pacientes que serão submetidos a procedimento de retirada de lesão de pele e de cirurgia plástica.....	112
Anexo 3: Tabela 1.: Dados clínico-patológicos dos prontuários de pacientes com carcinoma basocelular.....	114
Anexo 4: Dados para serem usados no estoque das lesões para procedimentos bioquímicos.....	115
Anexo 5: Tabela 2.: Dados clínico-patológicos dos prontuários de pacientes com carcinoma espinocelular.....	116
Anexo 6: Tabela 3- Número de campos histológicos a serem contados.....	117
Anexo 7: Tabela 4.: Índices de positividade imuno-histoquímica para marcação de MMPs e TIMPs em carcinomas basocelulares.....	118
Anexo 8: Tabela 5.: Índices de positividade imuno-histoquímica para marcação de MMPs e TIMPs em carcinomas espinocelulares.....	119
Anexo 09: Tabela 6.: Análise das imagens digitalizadas das bandas segmentadas dos géis (Ensaio zimográficos com MMP-2 e -9).....	120
Anexo 10: Resumos resultantes dos trabalhos desenvolvidos durante a tese e apresentados em congressos.....	121
Anexo 11 – Carta de aceite de artigo para submissão.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

MMP – Metaloproteinase de matriz

CBC – Carcinoma basocelular

CEC – Carcinoma espinocelular

EGCG - Epigallocatequina-3-gallate

MEC – Matriz extracelular

MB – Membrana basal

DAB - Diaminobenzidina

HE - Hematoxilina e eosina

HPV - Papiloma vírus humano

IHQ: Imuno-histoquímica

TIMP – Inibidores teciduais de metaloproteinases

LLC – Carcinoma pulmonar de Lewis

SDS – Duodecil Sulfato de Sódio

RESUMO

O carcinoma basocelular (CBC) e o espinocelular (CEC) são neoplasias malignas localmente agressivas. As metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente as MMP-2 e 9 tem sido implicadas na progressão tumoral interferindo em eventos angiogênicos e metastáticos. Em contrapartida, os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) têm como principal função a inibição destas enzimas. Produtos obtidos de algumas plantas têm sido associados a funções anti-neoplásicas, possivelmente por reproduzir as atividades dos TIMPs sobre as MMPs. Os objetivos deste trabalho foram: 1. identificar a expressão imuno-histoquímica pela técnica streptavidina-biotina-peroxidase das MMPs 2 e 9 e seus inibidores (TIMP 1 e 2) em amostras parafinadas de CBC (26) e CEC (41); 2. identificar possíveis associações entre a imuno-expressão destas enzimas com variáveis clínico-patológicas dos pacientes; 3. investigar a inibição da atividade gelatinolítica das MMPs por ensaios zimográficos, utilizando como possíveis inibidores os extratos aquosos de chá preto (*C. sinensis*), *A. vera* e *A. muricata* em diferentes diluições. Nas amostras de CBC observou-se correlação significativa entre a idade e o tamanho da lesão ($R=0,532$; $p= 0,008$). A ocorrência de marcação de forte intensidade foi significativamente mais freqüente na epiderme do que na neoplasia para todos os antígenos investigados. Por outro lado, não houve diferença evidente na intensidade de marcação entre a periferia e o centro das ilhotas neoplásicas. Quanto à intensidade de imunomarcação, a expressão das TIMPs foi mais tênue do que as das MMPs. Em média, os índices de imunomarcação das enzimas estudadas foram de 43,7% ($\pm 30,4\%$) para MMP-2, 78,8% ($\pm 8,3\%$) para MMP-9, 82,5% ($\pm 5,5\%$) para TIMP-1, e 71,2% ($\pm 9,0\%$) para TIMP-2. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os índices de expressão de TIMP -1 e MMP 9 e de TIMP-2 e MMP -2. Não foram observadas correlações significativas entre as outras variáveis e a expressão imuno-histoquímica dos antígenos de interesse nestas amostras. Nos casos de CEC, observou-se similaridade de marcações para todos os tipos de antígenos expressados. Os índices de imunomarcação foram de 82,8% ($\pm 5,5$), 96,2% ($\pm 1,7$), 93,7 ($\pm 4,2$) e 82,7% ($\pm 8,5$) para MMP-2, -9, TIMP-1 e -2, respectivamente. Houve correlação significativa entre os índices de imunomarcação de MMP-9 e TIMP-1 ($R = 0,449$, $p = 0,0032$). As células do estroma neoplásico apresentaram imunomarcação para todos os antígenos pesquisados. Houve diferenças significativas entre MMP-2 *versus* MMP-9, TIMP-1 ou TIMP-2; entre MMP-9 *versus* TIMP-2; e ainda entre TIMP-1 *versus* TIMP-2 ($p < 0,0001$). A expressão das metaloproteinases e de seus inibidores teciduais em CBC não parece ser influenciada pelos parâmetros investigados e a co-localização de MMPs e seus inibidores em CEC pode sugerir que estas estão em equilíbrio. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão de sua associação com o comportamento biológico das neoplasias investigadas. Associação indireta foi observada entre a diluição de chá preto, *A. vera* e *A. muricata* e a inibição da atividade de MMP-2. A atividade de MMP-9 foi neutralizada por todas as soluções de forma dose-dependente. O presente estudo sugere que os efeitos antitumorais verificados pelos extratos testados podem ser parcialmente explicados por sua atividade inibitória nas MMPs.

Palavras-chave: Zimografia, Extratos de plantas, Imuno-histoquímica, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2.

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) of the skin are locally aggressive malignant neoplasms. Matrix metalloproteinases (MMP) have been strongly implicated in the tumoral progression since these enzymes interfere with invasive and angiogenic properties. On the other hand, tissue inhibitors of MMP (TIMP) may possess biologic properties enrolled in suppression of neoplastic growth. The aims of the present work were 1. to identify the expression of MMP-2 and -9, and TIMP-1 and -2 in samples of BCC and SCC by immunohistochemistry; 2. to evaluate possible associations between the immunoreexpression of MMP / TIMP and clinicopathologic parameters of BCC and SCC; and 3. to assess the gelatinolytic activity of homogenisates obtained from fresh samples of BCC and, in addition, to verify the inhibitory properties over this activity of infusions prepared with black tea, *Aloe vera*, or *Annona muricata*. The immunostaining of MMP was usually stronger than that of TIMP. Strong staining was more frequent for all of the studied enzymes in the ad non-neoplastic epithelium than in the neoplasms. In BCC, indices of positive immunostaining of neoplastic cells were 43.7% ($\pm 30.4\%$) for MMP-2, 78.8% ($\pm 8.3\%$) for MMP-9, 82.5% ($\pm 5.5\%$) for TIMP-1, and 71.2% ($\pm 9.0\%$) for TIMP-2. In SCC, these indices were 82.8% ($\pm 5.5\%$) for MMP-2, 96.2% ($\pm 1.7\%$) for MMP-9, 93.7% ($\pm 4.2\%$) for TIMP-1, and 82.7% ($\pm 8.5\%$) for TIMP-2. There were not significant correlations between immunostaining indices of these enzymes, except for a positive correlation between MMP-9 and TIMP-1 for SCC. In the same way, there were not significant associations between these indices and clinicopathologic features of the lesions. In SCC, there were significant differences between immunostaining indices of MMP-2 *versus* MMP-9, TIMP-1 or TIMP-2; between MMP-9 *versus* TIMP-2; and between TIMP-1 *versus* TIMP-2. The gelatinolytic activity of MMP was significantly inhibited by aqueous extracts of *Aloe vera* and black tea, and *Annona muricata*. In conclusion, the expression of MMP and TIMP do not evidently influence the biological behavior of the present cases. The concomitant expression of these enzymes suggests equilibrium between them in both BCC and SCC. Additional investigation is required to better understand the influence of degradative roles of MMP in these malignant lesions. The inhibition of the gelatinolytic activity of MMP by extracts of *Aloe vera* and black tea seems to indicate interesting antineoplastic properties for these plants.

Key-words : Zimography, Immunohistochemistry, plants extracts, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2.

1. - INTRODUÇÃO

1.1 –Carcinoma de pele

O número de novos casos de câncer de pele não melanoma [carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC)] estimados para o Brasil em 2006 é de 55.480 casos em homens e de 61.160 em mulheres, de acordo com as Estimativas de Incidência de Câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2005). Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens e 60 para cada 100 mil mulheres. O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens em todas as regiões do Brasil.

1.1.1 - Carcinoma basocelular

O CBC origina-se da camada basal da epiderme. Ocorre basicamente na face, usualmente como lesões isoladas, ocorrendo raramente na palma das mãos e planta dos pés. Pode aparecer sem razões aparentes, mas existem alguns fatores que influenciam seu aparecimento. O mais comum é a pele clara associada à exposição à luz solar freqüente (radiação actínica), principalmente nos pacientes com xeroderma pigmentoso em que CBC e CEC são comuns. A exposição à luz solar não é suficiente para a produção de CBC, o que é enfatizado pela rara ocorrência no dorso das mãos e dedos. São muitos os fatores adicionais que predispõem uma pessoa a desenvolver CBC e CEC como numerosas doses de radiação (raios X) e HPV (Papiloma vírus humano). Aproximadamente 40% dos pacientes que tiveram CBC terão uma ou mais outras lesões dentro de 10 anos. Este tipo de lesão ocorre geralmente em adultos. (LEVER et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1979).

1.1.2 – Carcinoma Espinocelular

O CEC é um tumor maligno originado de células da camada basal da epiderme, os queratinócitos. Responsável por 20% de todas as doenças malignas de pele é o mais freqüente em pessoas de meia idade e idosas. É o quinto neoplasma maligno no mundo. (JOHNSON et al., 1992). Evidentemente, a causa primária do carcinoma espinocelular de pele é a exposição à luz solar de forma acumulada durante a vida. Radiação ionizante, supressão imunológica, inflamação crônica e infecção por HPV (papiloma vírus humano) podem também levar ao desenvolvimento de CEC. É o segundo tipo mais comum de câncer de pele, pode se disseminar por via linfática e produzir metástase (LEVER et al., 1998). Não há marcador prognóstico de confiança no uso rotineiro para o CEC (HELLIWELL, 2001).

1.1.3. Ocorrência de metástases

Invasão nos tecidos vizinhos e sobrevivência ectópica das células neoplásicas são eventos cruciais para a progressão do tumor e sendo também pré-requisito para formação de tumores secundários, que são denominados metástases. Invasão e metástases são características da malignidade, sendo responsáveis pela falha nos tratamentos de combate ao câncer. Como regra geral, CBC não produz metástase, mas há exceções. A incidência de metástases de CBC relatada é de 0.03% a 0.55% (SCANLON et al., 1980). Uma revisão de 1984 descreve 175 casos com metástases (VON DOMARUS; STEVENS, 1984). CEC chega a ter taxa metastática superior a 16% (DINEHART; POLLACK, 1989).

Nas metástases de CBC, as difusões hematogênica e linfática mostram distribuição uniforme. Embora em torno de 50% dos pacientes com metástases de CBC as tenham nos nódulos linfáticos como seu primeiro local de disseminação, freqüentemente pulmão e ossos aparecem mais como o primeiro local de participação. Metástase no fígado ou outras vísceras e nos tecidos subcutâneos e na pele também ocorrem. Entretanto, estas áreas são geralmente envolvidas somente quando pelo menos três locais principais de metástase foram afetados (SAFAI; GOOD, 1977; LEVER et al., 1998).

Para que as metástases ocorram, as células neoplásicas devem ser hábeis para se soltar do tumor primário e invadir tecidos vizinhos através da membrana basal (MB) e matriz extracelular (MEC) intersticial. Então devem alcançar a circulação e ganhar novos e distantes sítios. Para se estabelecerem, deverão deixar a circulação e invadir através da MEC novamente. Além disso, devem responder a fatores de crescimento de forma coordenada, proliferar em uma colônia secundária, induzir angiogênese e se proteger da defesa do hospedeiro (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2000). No desenvolvimento do tumor, há constante comunicação entre as células neoplásicas e o estroma ao redor, incluindo componentes da matriz, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais. Fibroblastos participam da degradação da MEC secretando proteases e seus ativadores (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2000).

As células tumorais respondem com motilidade a uma variedade de agentes que podem ser derivados do hospedeiro e de fatores de crescimento, de componentes da MEC e de fatores secretados pelo próprio tumor (AZNAVOORIAN et al., 1990).

A importância de fatores de crescimento autócrinos conduz à hipótese de que células tumorais também secretam fatores autócrinos estimulantes de motilidade (LIOTTA et al., 1986a). Fatores de crescimento estimulam quimiotaxia, fornecem direção, motilidade e podem ter função na correção de rumo dos locais secundários.

Tamanho, ulceração ou história de recorrências múltiplas não são absolutamente pré-requisitos para metástase (DZUBOW, 1986). Não há descrição de tipo específico de CBC que produza metástase e não existe evidência de que a defesa imunológica está comprometida nessa situação (VON DOMARUS; STEVENS, 1984).

A autonomia da célula neoplásica é um pré-requisito para a formação das metástases e representa uma característica de tumores malignos. Há uma falta de autonomia das células de alguns CBCs e esta ausência é consistente com sua inabilidade de sofrer metástase na maioria dos casos. Apesar disso, trabalhos indicam que CBC e CEC expressam MMPs, especialmente MMP-2 e -9 (KOBAYASHI et al., 1996; VARANI et al., 2000; GUTTMAN et al., 2003; YUCEL et al., 2005). As metaloproteinases de matriz (MMPs) têm grande importância no desenvolvimento e formação de metástase de tumores, pois degradam colágeno tipo IV da MB e MEC. Aumento na atividade das

MMPs é detectado e mostra correlação com invasão e potencial metastático em vários tipos de câncer (VARANI et al., 2000).

1.2. Metaloproteinases de matriz (MMPs)

As MMPs constituem uma família de mais de 20 metaloenzimas que clivam vários componentes da MEC liberando fragmentos com atividades biológicas distintas que alteram estas funções. São secretadas como proenzimas latentes e requerem ativação através de clivagem proteolítica do domínio amino-terminal rico em cisteína e sua atividade depende da presença de zinco. Várias subclasses de MMPs têm sido definidas, agrupadas de acordo com a especificidade ao substrato: colagenases, gelatinases, estromelinas, MMP tipo membrana (MT-MMPs) e elastases. Há similaridade estrutural entre os membros da família (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2000).

Duas MMPs, as gelatinases A (MMP-2 de 72-Kd) e B (MMP-9 de 92-Kd), degradam colágeno tipo IV como substrato primário e são distintas pela sua capacidade de degradar gelatina (MCAWLECY; MATRISIAN, 2000). Como o colágeno tipo IV é um dos maiores constituintes da membrana basal, no qual componentes secundários como laminina, heparan sulfato, proteoglicanas são organizados, maior atenção tem sido focada nas MMPs 2 e 9 por sua provável relevância na associação com invasivo das neoplasias malignas (PUCCI-MINAFRA et al., 2000; KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003).

1.3. Inibição da atividade das MMPs

1.3.1. Inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs)

A atividade proteolítica das MMPs é primariamente controlada pelos inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Estes são pequenas proteínas de 21-28 KDa que bloqueiam a atividade das MMPs ligando-se ao sítio de zinco altamente conservado. Há atualmente quatro TIMPs conhecidos, todos possuem resíduos cisteínas conservados, requeridos para a formação de seis pontes dissulfeto. O domínio amino-terminal é

requerido para atividade inibitória das MMPs. Experimentos indicam que muitas regiões dos TIMPs estão envolvidas na formação de complexos com collagenases intersticiais, e que uma seqüência específica, a qual compreende duas das pontes dissulfeto da TIMP-1 é altamente efetiva em inibir a atividade collagenase (STAMENKOVIC, 2000).

Os TIMPs são secretados por células tumorais e pelo tecido hospedeiro, podendo se ligar a formas ativas ou latentes de muitas MMPs, funcionando como proteínas anti-metastáticas (BREW et al., 2000). Esta ação inibitória é seletiva e reversiva e a inibição acontece de maneira balanceada (1:1). A regulação coordenada entre TIMPs e MMPs direciona a clivagem e a liberação de fatores de crescimento importantes e também de receptores de superfície celular (CHANG; WERB, 2001).

A expressão dos TIMPs é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMPs e TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas com a remodelação não controlada da MEC, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses, conseqüentemente, há maior degradação da matriz extracelular, o que facilita a invasão e metástase (NAGASE; WOESSNER, 1999; STAMENKOVIC, 2000).

O TIMP do tipo 1 (TIMP-1) e do tipo 2 (TIMP-2) representam membros bem caracterizados desta família de inibidores, e apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs (HOWARD, 1991; FOLGUERAS 2004), embora a TIMP-1 forme preferencialmente complexo com a MMP-9, enquanto que TIMP-2 atue sobre a MMP-2. Ambos os inibidores têm atividade mitogênica sobre um grande número de tipos celulares, enquanto que super-expressão desses inibidores reduz o crescimento tumoral (GOMEZ et al., 1997). Finalmente, a TIMP-2 é considerada inibidora de invasão e metástase de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo* (ALBINI et al., 1991; DECLERCK, 1991) e também da angiogênese associada a tumores (MURPHY, 1993).

1.3.2. Inibidores naturais de MMPs

Além dos TIMPs, outras moléculas podem inibir a atividade de MMPs, e, dentre as naturais, os polifenóis são os mais conhecidos. *Camellia sinensis* (Figura 1) é uma planta rica em polifenóis, dela obtêm-se o chá verde, o chá preto e o “oolong”. Dentre seus polifenóis estão presentes as catequinas. Polifenóis atuam como antioxidantes *in vitro*, seqüestrando oxigênio reativo e quelando íons metal. Podem atuar inibindo enzimas pro-oxidativas (FREI; HIGDON, 2003). Estudos epidemiológicos com fumantes sugerem que a ingestão regular de chá verde os protege de danos oxidativos e poderia reduzir o risco de câncer e outras doenças causadas por radicais livres associados ao hábito de fumar (HAKIM et al., 2003). Demeule et al., (2000) relatam que catequinas, atuam com efeito quimioprotetor na iniciação, promoção e progressão tumoral. Estudo *in vivo* demonstrou que a *C. sinensis* inibe formação de tumor no pâncreas duodeno, fígado, estômago, pele, pulmões e próstata (CHHABRA; YANG, 2001).

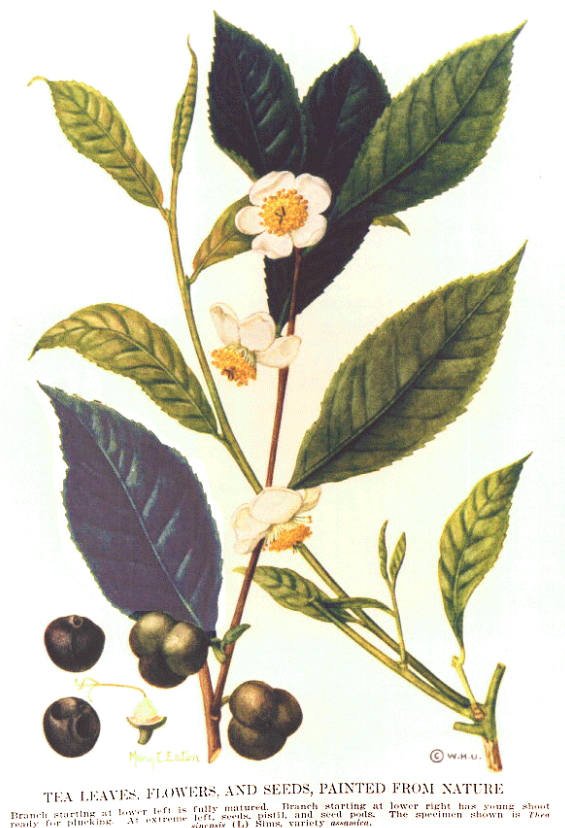


Figura 1 - *Camellia sinensis*
<http://www.teatalk.com/images/tprint.gif>

O chá preto é mais consumido no Brasil do que as outras variedades produzidas a partir da *C. sinensis*. Estudos comparativos entre o chá verde e o chá preto indicam que os dois reduzem o risco de vários tipos de câncer (SIDDIQUI et al., 2004).

Outros agentes quimioterápicos são imunossupressivos, o que não acontece com o chá preto que, além de ser destituído deste efeito, age como imunorestaurador do hospedeiro (BHATTACHARYYA et al., 2004).

Em estudos com células de leucemia mielóide de murino (WEHI-3B JCS), comprovou-se a eficácia das teaflavinas do chá preto e a epigallocatequina-3-gallate (EGCG), catequina presente em maior quantidade no chá verde, em inibir crescimento induzindo apoptose (LEUNG et al., 2004). GARBISA et al. (2001) comprovaram que a EGCG é um potente inibidor das MMPs 2 e 9.

SAZUKA et al. (1997) ao testar o efeito de substâncias do chá preto em células de carcinoma pulmonar de Lewis de rato *in vitro*, constataram a inibição da invasividade destas células. Através de zimograma, verificaram que o tumor secretava MMPs, que também foram inibidas. Sugeriram então que o chá preto inibiu a invasividade por inibir as colagenases secretadas pelas células neoplásicas.

1.3.3. Inibidores naturais da progressão tumoral

Produtos naturais têm sido testados quanto a sua eficácia inibitória da carcinogênese. (LAMBERT et al., 2005; SEO et al., 2005). A *Aloe vera* (babosa) (Figura 2) tem sido objeto de estudos por seus efeitos benéficos, dentre eles o de exibir resposta antitumoral (CORSI et al.; 1998 KIM; KACEW; LEE; 1999; LEUNG et al., 2004). Shimpo et al. (2002) sugeriram que seus compostos poderiam ser usados como agentes quimioprotetores contra progressão tumoral.

Estudos *in vitro* têm demonstrado um efeito inibitório da Aloe emodin (constituente natural das folhas de babosa) sobre o crescimento de células de carcinoma de Merkel, sendo que a toxicidade é específica (WASSERMAN et al., 2002).



Figura 2 - *Aloe vera* (babosa)
<http://aloeveraseeds.co.uk/album/displayimage.php?pos=-3> \t "_blank"

Plantas do gênero *Annona* ao qual pertence à graviola [(*Annona muricata* (Figura 3)], possuem um grupo de substâncias denominadas acetogeninas anonáceas, com toxicidade seletiva para vários tipos de células cancerosas, como as do adenocarcinoma de próstata, de pâncreas (KIM et al., 1998), linhagens de células tumorais de carcinoma pulmonar de Lewis (WANG et al., 2002) e linhagens de hepatoma humano (CHANG; WU, 2001; CHIH et al., 2001).

Acetogeninas de diferentes espécies de graviola têm efeito quimioterápico superior a Doxorrubicina, uma das substâncias comumente usadas como quimioterápico. Em linhagem de células tumorais de mama (MCF-7) (GU et al., 1994) e cólon (HT-29), a potência quimioterápica foi em torno de 100.000 vezes (KIM et al., 2001). A eficiência da inibição de proliferação celular *in vitro* é de 10 a 10000 vezes maior que a de

Doxurrubicina, em PACA-2 (Carcinoma do pâncreas) conforme descrito por Hopp et al. (1997) e KIM et al. (1998).

O efeito inibidor das acetogeninas também foi comprovado por LIAW et al. (2002) e OBERLIES et al. (1997). YUAN et al. (2003) demonstraram que anonacina, uma acetogenina citotóxica (mono-tetrahydrofuno), causa morte celular em várias linhagens de células cancerosas.



Figura 3- *Annona muricata*

<http://www.fao.org/docrep/005/ac775e/AC775E03.htm>

2. - OBJETIVOS:

2.1 - Objetivo geral:

Verificar a expressão da MMP-2 e MMP-9 e de TIMP-1 e TIMP-2 em câncer de pele não melanomas e analisar a capacidade de produtos naturais em inibir essas MMPs.

2.2 - Objetivos específicos:

- a) Analisar a expressão imuno-histoquímica das metaloproteinases 2 e 9 e seus respectivos inibidores teciduais TIMP-2 e 1 em carcinoma basocelular (CBC) e em carcinoma espinocelular (CEC).
- b) Investigar a associação de variáveis clínico-patológicas de pacientes portadores de CBC com a expressão das MMP do tipo 2 e 9 e com as de TIMP do tipo 1 e 2, bem como avaliar possíveis associações desses marcadores nessas lesões.
- c) Demonstrar e comparar a inibição das metaloproteinases 2 e 9 por extratos aquosos de babosa (*Aloe vera*), chá preto (*Camellia sinensis*) e de graviola (*Annona muricata*), através de incubação dos géis obtidos por zimografia nestes extratos.

3. - MATERIAL E MÉTODOS

Esta investigação foi previamente submetida e aprovada pelo Comitê Institucional de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Número do protocolo – 100/02) (Anexo 1), com o termo de consentimento livre e esclarecido devidamente assinado pelos pacientes que foram submetidos aos procedimentos de retirada de pele normal (cirurgia plástica) e de exereses de cirurgias corretivas de lesões (CBC e CEC), autorizando a utilização dos espécimes no presente trabalho (Anexo 2).

3.1 – Amostras

3.1.1 – Carcinoma basocelular

Da casuística do Ambulatório de Pequenas Cirurgias do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), foram coletados prospectivamente 31 casos de CBC, sendo utilizados como critérios de inclusão tamanho clínico igual ou maior a 0,5cm, bem como confirmação de diagnóstico em exame histopatológico (OMS, 2006). Para caracterização da amostra, foram registradas as informações de idade e gênero do paciente, e ainda aquelas associadas ao aspecto clínico das lesões (Anexo 3). Todas as amostras foram obtidas por ressecção cirúrgica completa. Uma alíquota foi retirada da lesão e direcionada para os testes de zimografia, sendo obtidos dados (Anexo 4) do fragmento da lesão e então, imediatamente, congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C . A outra alíquota foi fixada em formalina a 10% e em seguida embebidas em parafina.

3.1.2 – Carcinoma espinocelular

Foram selecionados retrospectivamente, 41 casos de carcinoma espinocelular do arquivo do laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sendo utilizados como critérios de inclusão a confirmação do diagnóstico em exame histopatológico. Para caracterização da amostra, foram registradas as informações de idade e gênero do paciente e ainda aquelas associadas ao aspecto clínico da lesão (Anexo 5). Todas as amostras foram obtidas por ressecção completa e direcionadas para os exames histológicos de rotina.

3.1.2 – Pele normal

Foram coletadas prospectivamente seis amostras de fragmentos de pele normal de pacientes de pele clara, do abdome inferior, obtidas em cirurgia plástica, no ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas-UFU. Todas as amostras foram obtidas por ressecção completa, sendo as mesmas fixadas em formalina a 10% e em seguida embebidas em parafina, processadas rotineiramente para exame histológico.

3.2 - Análises histológicas

Para as análises histológicas das amostras de CBC, de CEC e de pele normal incluindo os ensaios imuno-histoquímicos, os fragmentos teciduais foram fixados em formalina (10%) e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 3 μ m foram obtidos e as secções montadas em lâminas de vidro foram submetidas à coloração pela técnica da hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica com fins diagnósticos. Para os ensaios imuno-histoquímicos, os cortes foram montados em lâminas previamente silanizadas.

O diagnóstico histopatológico de todas as amostras baseou-se nos critérios definidos pela OMS (KOSSARD et al., 2006), sendo também registrado o padrão histológico predominante.

3.3 – Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e então submetidos à recuperação antigênica com solução de tampão EDTA (1mM, pH 8.0) em ambiente de microondas (Potência máxima, 700W), perfazendo 3 ciclos de 5 minutos cada. Foi ainda realizado bloqueio da atividade de peroxidase e de biotina endógenas com água oxigenada (10V) e solução comercial (DAKO, Co Carpenteria, CA, USA.), respectivamente. As amostras foram então incubadas com os anticorpos primários (clones Ab-4 anti-MMP-2, 1:800; Ab-3 anti MMP-9, 1:2000; Ab-2 anti TIMP-1, 1:600; e Ab-2) anti TIMP-2; todos fabricados por Oncogene Inc.) por 18 horas, à temperatura ambiente. A amplificação da reação foi obtida com o sistema avidina-biotina-peroxidase, segundo as orientações do fabricante (Dako, Co Carpenteria, CA, USA.). A revelação da reação foi feita utilizando-se 3',3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co. MO, USA.). Os fragmentos teciduais foram então contra-corados em hematoxilina de Harris. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por solução de BSA a 1%, diluída em PBS (pH 7,4), e como controles positivos foram usadas amostras de carcinoma ductal de mama previamente conhecidos como positivos para os antígenos pesquisados.

3.4 - Avaliação da imunomarcção

Para avaliação da imunomarcção, foi observada a presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nas células neoplásicas, considerando localização epitelial e neoplásica. Para obtenção do número ideal de células a serem contadas, realizou-se projeto piloto no qual foram contadas todas as células de todos os campos histológicos de um tumor (anexo 6) (CBC e CEC). Então, para cada amostra, 10 campos histológicos foram analisados em grande aumento (objetiva original de 40x), resultando em aproximadamente 1000 células. Finalmente, a proporção entre células marcadas e não marcadas foi transformada em valores percentuais. Para cada um dos marcadores, foram

investigadas possíveis diferenças de sua expressão, tanto em termos de positividade quanto de intensidade (considerando-se a marcação da camada basal do epitélio adjacente à lesão como padrão de forte intensidade) entre a epiderme e o carcinoma (SOARES et al., 2006). Além disso, foram investigadas possíveis correlações entre a imunomarcação de MMP-9 e TIMP-1, e de MMP-2 e TIMP-2 no carcinoma.

3.5 - Análise zimográfica

3.5.1 – Padronização da técnica de zimograma.

Para padronização da técnica de zimografia, fizeram-se ensaios com as proteínas MMP-2 e MMP-9 puras e as presentes na saliva humana.

3.5.1.1 Coleta da saliva

A saliva foi coletada pelo “método de cuspe” segundo NAVAZESH (1993). Nenhum voluntário ingeriu previamente no dia do teste, qualquer substância estimulante ou contendo corantes. A higiene bucal foi feita corretamente. Dez minutos antes do teste coletou-se saliva estimulada com chiclete sem açúcar e gosto durante os primeiros 5 minutos (saliva basal), a saliva dos 2 primeiros minutos foi rejeitada. A restante foi colocada em mini-tubos resfriados, centrifugada à 14.000g, descartado o pelet e utilizado o sobrenadante. A proteína total foi mensurada pelo método de BRADFORD (1976), com amostras sendo lidas entre 10’20” e 10’30”, após se colocar o reagente de Bradford. Logo após a leitura, procedeu-se à zimografia e procedimentos de inibição das gelatinases presentes no gel.

3.5.2 - Obtenção dos extratos liofilizados

Infusões foram primeiramente produzidos com água deionizada, adicionando aos seguintes volumes: folhas frescas de *Aloe vera* (1:50), folhas secas de *Annona muricata* (1:5), e chá verde (1:10, obtido de Leão Ltda, Curitiba, Brazil). As soluções foram

filtradas e então liofilizadas por evaporação sob pressão reduzida. Na seqüência, os extratos foram diluídos (1mg/mL) em tampão de ativação (50mM Tris HCl, 6mM CaCl₂).

3.5.3 - Ensaio zimográficos

A atividade proteolítica de MMPs foi avaliada em ensaios zimográficos por eletroforese mini-gel (poliacrilamida 8%, gelatina 0,1%) em protocolos descritos previamente (HEUSSEN, DOWDLE, 1980) com algumas modificações. Eletroforese (BioRad Protean II, Hercules, USA) foi realizada sob condições redutoras (0.025M TRIS, 0.192 M glicina, e 0.1% SDS, pH 8.5) à 100V constante por 150min, à 4°C. Após isso os géis foram lavados duas vezes por 30min em 2.5% Triton X-100 (v/v) para remover o SDS e então foram incubados a 37°C, *overnight*.

3.5.3.1 Ensaio com metaloproteinases 2 e 9

Cada poço do gel foi carregado com 0,11µg/mL de cada MMP-2 ou -9 (Oncogene Research Products, San Diego, USA, referência PF023 e PF024, respectivamente), de acordo com instruções do fabricante. Atividade proteolítica foi estimulada por incubação no tampão de ativação, à 37°C por 12 horas.

Para avaliar o efeito inibitório dos produtos testados, os géis foram partidos e incubados em soluções contendo o tampão de ativação e extrato aquoso. Três diluições seriadas (fator de diluição 2) foram feitas nas mesmas condições. Os géis foram subsequentemente corados (0.25% Comassie blue G-250, 30% etanol, e 10% ácido acético, por 1h, sob suave agitação) e descorados (30% etanol, 10% ácido acético, por 2h).

3.5.4 - Avaliação zimográfica

Imagens digitais dos géis em tons de cinza (*grayscale*) foram obtidas (Scanjet 8200, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA). As bandas foram segmentadas, seguido pelo cálculo

da média de pixel e valores de coeficiente de variação para cada banda, através de rotinas criadas em ambiente de programação Scilab (WALDEMARIN et al., 2004) (Anexo 09).

3.6 - Análise estatística

Os testes de Kolmogorov-Sminorv, Qui-quadrado, t de Student, Kruskal-Wallis e de Spearman foram utilizados para se investigar a existência de associações, diferenças entre médias ou correlações entre as variáveis de interesse, respectivamente, sempre com nível de significância fixado em 5%, utilizando-se o software BioEstat (AIRES et al., 2005).

4. – RESULTADOS

Nossos resultados e discussões obtidos estão apresentados na forma de artigos científicos que foram aprovados ou submetidos a periódicos indexados.

- Artigo aceito (anexo 11) no periódico *Intercursos* (ISSN/ISBN: 16782402) em 14 de março de 2007: **Inhibition of Matrix-Metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata*, and Black Tea Aqueous Extracts**

- Artigo aceito para publicação em 18/04/2007 no JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL (ISSN 1676-2444) em 12 de dezembro de 2006: **Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares.**

- Artigo a ser submetido em periódico indexado: **Imunolocalização de MMP-2, -9 e de seus inibidores teciduais TIMP-2 e TIMP-1 em carcinomas espinocelulares de pele.**

Cada artigo foi estruturado com base nas normas do periódico a que foi ou será submetido. Após a apresentação dos artigos, seguir-se-ão as conclusões que atendem aos objetivos propostos no início deste trabalho, considerações finais e referências bibliográficas referentes ao trabalho geral. Em anexos (anexos: 3, 5, 7, 8) encontram-se os dados que geraram este trabalho de tese, a lista de resumos resultantes de trabalhos referentes à tese apresentados em congressos (anexo 10).

Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares

Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in basal cell carcinoma

Rosy Iára Maciel de Azambuja Ribeiro¹; Paulo César Borges Júnior²; Sérgio Vitorino Cardoso³; Ignez Candelori⁴; Foued Salmen Espíndola⁵; Geovanni Dantas Cassali⁶; Adriano Mota Loyola³✉

¹ Mestre em Biologia Celular; Doutora em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais.

² Mestre em Bioquímica e Genética pela Universidade Federal de Uberlândia.

³ Doutor em Patologia; Professor da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Bióloga, especialista em imunoistoquímica, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

⁵ Doutor em Bioquímica; Professor do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

⁶ Doutor em Patologia; Coordenador e professor do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFU, Uberlândia (MG).

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CBS 881-01) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico MCT/CNPq (465888-00-3).

Este trabalho é parte da tese de doutorado intitulada “METALOPROTEINASES 2 E 9: EXPRESSÃO, INIBIDORES TECIDUAIS E INIBIÇÃO POR EXTRATOS NATURAIS NO CARCINOMA DE CÉLULAS BASAIS E CARCINOMA ESPINOCELULAR.”, tese de doutorado a ser apresentada no Curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG, em 2007.

Esta investigação foi previamente submetida e aprovada pelo Comitê Institucional de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo # 12303).

RESUMO

INTRODUÇÃO: Aproximadamente 80% das neoplasias malignas de pele não-melanomas, são carcinomas basocelulares (CBC). Apesar das raras metastases, esses tumores são localmente agressivos. As metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente as MMP-2 e 9 são importantes no processo de invasão. Em contrapartida, os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) têm como principal função a inibição destas enzimas.

OBJETIVO: Investigar a associação de variáveis clínico-patológicas de pacientes portadores de CBC com a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram selecionados 31 casos de CBC, sendo então obtidos retrospectivamente os dados referentes à idade, sexo e tamanho da lesão. Cortes histológicos das lesões foram submetidos à reação imunoistoquímica pela técnica streptavidina-biotina-peroxidase para detecção dos antígenos de interesse. Índices de imunomarcção foram construídos e comparados com os dados previamente obtidos.

RESULTADOS: Observou-se correlação significativa entre a idade e o tamanho da lesão ($R=0,532$; $p=0,008$). Não foram observadas correlações significativas entre as outras variáveis e a expressão imunoistoquímica dos antígenos de interesse.

CONCLUSÃO: A expressão das metaloproteinases e de seus inibidores teciduais não parece ser influenciada pelos parâmetros investigados, estudos adicionais são necessários para melhor compreensão de sua associação com o comportamento biológico do CBC.

Unitermos: Carcinoma basocelular, Metaloproteinases de matriz 2 e 9, Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz 1 e 2, Imunoistoquímica

ABSTRACT

INTRODUCTION: Basal cell carcinomas (BCC) is a locally invasive disease. Matrix metalloproteinases (MMP) participate in the neoplastic invasion, and this function is counterbalanced by tissue inhibitors of MMP (TIMP).

OBJECTIVE: To describe the expression of MMP-2 and -9, and of TIMP-1 and -2 in BCC, and to investigate possible associations of these enzymes with clinico-pathologic aspects of the lesions.

METHODS: Thirty -one consecutive samples of BCC were obtained from the Plastic Surgery Service of our institution. Gender and age of the patients, site, size and histological typing of the lesions were registered. The expression of MMP and TIMP in the neoplastic cells, adjacent non-neoplastic epithelium, and fibroblasts were determined by immunohistochemistry.

RESULTS: In general, the intensity of immunostaining was higher for MMP than TIMP. The expression of all of the investigated enzymes was constant in the neoplastic tissue and in the adjacent non-neoplastic epithelium of the lesions. However, the intensity of immunostaining was reduced from the adjacent to the neoplastic epithelium. It was not observed significative correlation between the number of neoplastic cells expressing MMP-2 and TIMP-2, or MMP-9 and TIMP-1. In the same way, there was not significative association between these enzymes with histologic or clinical parameters. For MMP-9 and both TIMP, it was observed more frequent positivity in adjacent than distant fibroblasts.

CONCLUSION: The expression of the investigated MMP and TIMP does not seem to be associated by the biological parameters studied in this work. Additional scientific efforts should be made to better understand the invasive and metastatic phenomenon in BCC.

Uniterms: Basal cell carcinoma, Matrix metalloproteinases 2, 9; TIMP, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Carcinomas basocelulares (CBC) constituem aproximadamente 80% das neoplasias malignas de pele, excluindo-se os melanomas, sendo sua origem fortemente associada à exposição excessiva à radiação ultravioleta. Apesar de raramente metastáticos, são localmente agressivos em decorrência de seu fenótipo notadamente invasivo⁽¹⁴⁾.

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas correlacionadas geneticamente e cuja atividade é dependente de zinco. Diferem entre si estruturalmente e em sua habilidade em degradar um grupo particular de proteínas da matriz extracelular (MEC), sendo que juntas podem degradar todos os seus componentes protéicos. Essas enzimas têm sido associadas ao desenvolvimento de invasão e metástase neoplásicas. Em particular, a presença e, ou atividade de muitas das MMP tem sido demonstradas em carcinomas como o CBC e carcinoma espinocelular^(11, 19, 20, 26, 27). As MMP da classe das gelatinases, tais como as MMP do tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), apresentam capacidade peculiar de degradar o colágeno IV que compõe a lâmina basal, sendo por isso provavelmente relevante na aquisição do fenótipo invasivo das neoplasias malignas⁽¹²⁾.

Por outro lado, a expressão dos inibidores teciduais das MMP (TIMP) é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMP e TIMP tem sido identificadas em doenças associadas com a renovação não controlada da matriz extracelular como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses⁽¹⁷⁾. As TIMP do tipo 1 (TIMP-1) e do tipo 2 (TIMP-2)

representam membros bem caracterizados desta família de inibidores, e apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMP^(10, 7), embora a TIMP-1 forme preferencialmente complexo com a MMP-9, enquanto que TIMP-2 atue sobre a MMP-2. Ambos os inibidores têm atividade mitogênica em um grande número de tipos celulares, enquanto que superexpressão desses inibidores reduz o crescimento de células tumorais⁽⁸⁾. Finalmente, a TIMP-2 é considerada inibidora de invasão e metástase de células tumorais *in vitro* e *in vivo*^(2,6) e também da angiogênese associada a tumores⁽¹⁶⁾.

O objetivo deste trabalho foi investigar a associação de variáveis clínico-patológicas de pacientes portadores de CBC com a expressão das MMP do tipo 2 e 9, bem como com as de TIMP do tipo 1 e 2, e ainda avaliar possíveis associações desses marcadores nessas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Da casuística do Ambulatório de Pequenas Cirurgias do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram coletados prospectivamente 30 casos de CBC, sendo utilizados como critérios de inclusão tamanho clínico da lesão igual ou maior a 0,5cm, bem como confirmação de diagnóstico em exame histopatológico. Para caracterização da amostra, foram registradas as informações de idade e gênero do paciente, e ainda aquelas associadas ao aspecto clínico da lesão. Todos os pacientes apresentavam pele clara. Todas as amostras foram obtidas por ressecção completa,

sendo as mesmas fixadas em formalina a 10% e em seguida embebidas em parafina. Para as análises histológicas, incluindo os ensaios imunohistoquímicos, foram realizadas em cortes teciduais de 3µm de espessura, os quais compreendiam toda a extensão das lesões. O diagnóstico histopatológico baseou-se nos critérios definidos pela OMS, sendo também registrado o padrão histológico predominante⁽¹³⁾.

Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e então submetidos à recuperação antigênica com solução de tampão EDTA (1mM, pH 8.0) em ambiente de microondas, perfazendo 3 ciclos de 5 minutos cada. Foi ainda realizado bloqueio da atividade de peroxidase e de biotina endógenas com água oxigenada (10V) e solução comercial (DAKO, Co Carpenteria, CA, USA.), respectivamente. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de avidina, por um período de vinte minutos. As amostras foram então incubadas com os anticorpos primários (clones Ab-4 anti-MMP-2, 1:800; Ab-3 anti MMP-9, 1:2000; Ab-2 anti TIMP-1, 1:600; e Ab-2) anti TIMP-2; todos fabricados por Oncogene Inc.) por 18 horas, à temperatura ambiente. A amplificação da reação foi obtida com o sistema avidina-biotina-peroxidase, segundo as orientações do fabricante (Dako, EUA). A revelação da reação foi feita utilizando-se 3',3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co. MO). Os fragmentos teciduais foram então contra-corados em hematoxilina de Harris⁽⁴⁾. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por solução de BSA a 1%, diluída em PBS (pH 7,4), e como controles positivos foram usadas amostras de carcinoma ductal de mama previamente conhecidos como positivos para os antígenos pesquisados.

Avaliação da imunomarcção

Para avaliação da imunomarcção, foi observada a presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nas células neoplásicas e em fibroblastos próximos e naqueles distantes do tumor, independente de intensidade. Para cada amostra, 10 campos histológicos em grande aumento (objetiva original de 40x) foram analisados, resultando em aproximadamente 1000 células. Finalmente, a proporção entre células marcadas e não marcadas foi transformada em valores percentuais. Para cada um dos marcadores, foram investigadas possíveis diferenças de sua expressão entre a epiderme e o carcinoma, tanto em termos de positividade quanto de intensidade (considerando-se a marcação da camada basal do epitélio adjacente à lesão como padrão de forte intensidade). Além disso, foram investigadas possíveis correlações entre a imunomarcção de MMP-9 e TIMP-1, e de MMP-2 e TIMP-2 no carcinoma. Finalmente foi averiguada a possível associação entre a expressão dos marcadores nos fibroblastos e sua distribuição.

Análise estatística

Os testes de qui-quadrado, *t* de Student e de Spearman foram utilizados para se investigar a existência de associações, diferenças entre médias ou correlações entre as variáveis de interesse, respectivamente, sempre com nível de significância fixado em 5%, utilizando-se o software BioEstat⁽¹⁾.

RESULTADOS

Todos os pacientes apresentavam pele clara. Houve predomínio de pacientes homens (15 casos), com idade média global de 63,8 anos, variando entre 36 e 90 anos. As lesões

localizavam-se predominantemente na face (15 casos), seguida pelo tronco (6 lesões) e pelo membro superior (5 casos), sempre em superfícies corporais que usualmente encontram-se expostas ao Sol. O tamanho médio encontrado foi de 1,1cm, variando entre 0,5 a 3,0cm. Quando comparadas, observou-se correlação estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes e tamanho das lesões (Figura 1). Após o diagnóstico histopatológico, foram classificadas como lesões de padrão sólido - 15 amostras, 11 casos como esclerodermiforme, e ainda 4 amostras como micro-nodulares. Para análise estatística foram agrupadas de acordo com seu maior ou menor grau de invasibilidade, sendo 15 amostras de CBC sólido e outro grupo de 15 amostras de padrão esclerodermiforme e micro-nodulares.

As expressões de MMP-2 e 9 e de TIMP-1 e 2 foram detectadas na epiderme não neoplásica de todas as amostras, bem como em todos os epitélios neoplásicos à exceção de três amostras em relação à MMP-2. Entretanto, houve variação importante na intensidade de marcação desses antígenos (Figura 2). A ocorrência de marcação de forte intensidade foi significativamente mais freqüente na epiderme do que na neoplasia para todos os antígenos investigados, conforme mostrado na Tabela 1. Por outro lado, não houve diferença evidente na intensidade de marcação entre a periferia e o centro das ilhotas neoplásicas.

Quanto à intensidade de imunomarcação, de forma geral, a expressão das TIMP foi mais tênue do que as das MMP. Em média, os índices de imunomarcação (número relativo de células marcadas) das enzimas estudadas foram de 43,7% ($\pm 30,4\%$) para MMP-2, 78,8% ($\pm 8,3\%$) para MMP-9, 82,5% ($\pm 5,5\%$) para TIMP-1, e 71,2% ($\pm 9,0\%$) para TIMP-2. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os índices de

expressão de TIMP -1 e MMP 9 e de TIMP-2 e MMP -2. Quando os índices médios de imunomarcção desses antígenos foram comparados segundo o tipo histológico predominante (sólido *versus* esclerodermiforme e micronodulares), só foi detectada diferença estatisticamente significativa para TIMP-1 ($p = 0,04$ teste Mann Whitney) (Figura 3). A idade dos pacientes ou o tamanho das lesões também não apresentaram nenhuma correlação estatisticamente relevante com os marcadores estudados, embora uma correlação direta entre tamanho e expressão de TIMP-1 tenha se aproximado do limite de significância ($R = 0,38; p = 0,06$).

Para todos os marcadores, os fibroblastos adjacentes às células neoplásicas apresentaram maior freqüência de marcação disseminada do que aqueles encontrados em locais mais distantes. Entretanto, essa associação foi estatisticamente significativa apenas para a MMP-9 e para as TIMPs, conforme apresentado na tabela 2.

DISCUSSÃO

Os processos de crescimento, invasão e metástase tumorais envolvem diversos processos complexos que envolvem proliferação celular, digestão proteolítica e migração através dos componentes da matriz celular. As metaloproteinases de matriz são consideradas moléculas fundamentais em várias etapas da progressão tumoral, como crescimento, invasão e metástases, sendo o aumento de sua expressão geralmente associado a pior prognóstico⁽¹⁸⁾. O desequilíbrio entre MMP e seus inibidores teciduais parece ser essencial para a degradação da MEC que caracteriza as neoplasias malignas, proporcionando maior agressividade⁽²⁵⁾. Apesar dos CBC raramente apresentarem

comportamento agressivo, são lesões em que há crescimento tumoral e invasividade evidentes e, inúmeras vezes, preocupantes. No presente estudo, a expressão das enzimas MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foi identificada por imunohistoquímica em amostras parafinadas de carcinoma basocelular.

Na epiderme não neoplásica, a expressão de MMP e TIMP foi identificada constantemente nas camadas basais. Nesse sentido, outros autores também têm identificado a expressão constante de MMPs e TIMPs em amostras de pele não associadas a neoplasias epiteliais, fato que pode ser interpretado como expressão constitutiva dessas enzimas^(15, 21). Assim, e considerando que o carcinoma basocelular apresenta caracteristicamente diferenciação semelhante às células localizadas nessa região epitelial, optamos por enfatizar a avaliação dessas enzimas no parênquima neoplásico, enquanto que a maioria dos estudos anteriores optou por investigar exclusivamente a localização em fibroblastos do estroma. Nesse sentido, observamos expressão freqüente de todos os marcadores em carcinomas basocelulares (figura 2). Embora geralmente pouco agressivas, tais lesões podem apresentar notável fenótipo invasivo, sendo por isso denominadas historicamente de “úlceras roedoras”. O fato de que são geralmente diagnosticadas em estágios clínicos precoces pode também contribuir para a menor agressividade observada de forma geral nessas neoplasias. Não obstante, é possível que esses carcinomas reservem maior potencial invasivo tendo em vista a ocorrência de expressão de metaloproteinases na maioria de suas células, ainda que essa capacidade não se expresse clinicamente devido a mecanismos regulatórios desconhecidos. De fato, estudos prévios têm observado intensa atividade colagenolítica em CBC⁽³⁾.

A observação de que a imunomarcção de forte intensidade dos antígenos de interesse foi sempre mais freqüente na epiderme adjacente que nas neoplasias (Figura 2 A) pode indicar que, embora a expressão das metaloproteinases e de seus inibidores específicos ocorra constantemente nos carcinomas basocelulares, é possível que sejam desencadeados mecanismos específicos de proteção anti-tumoral nas próprias células transformadas que resultem em inibição da atividade colagenolítica nesses carcinomas, ainda que de forma parcial. Essa possibilidade corresponderia à menor agressividade biológica características dos carcinomas basocelulares.

Nesse sentido, a ausência de correlação significativa entre TIMP-1 e MMP-9, bem como entre TIMP-2 e MMP-2 parece também indicar que outros mecanismos subjacentes e ainda ignorados possam influenciar a expressão das próprias metaloproteinases. Sabe-se, por exemplo, que citocinas e outros fatores são influências relevantes sobre a síntese e atividade biológica dessas enzimas ⁽⁵⁾, ainda que a importância dessa função regulatória seja desconhecida nos carcinomas basocelulares. Estudos adicionais são necessários para se esclarecer essa questão. Adicionalmente, diversos trabalhos indicam que a TIMP-1 é uma proteína multifuncional que, além de seu efeito inibidor sobre as MMP, possui funções distintas, dentre elas a de estimular o crescimento tumoral, tendo sido observada associação entre altos níveis teciduais de TIMP-1 com pior prognóstico em vários tipos de neoplasia ^(18, 22-24).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre os índices de expressão no epitélio tumoral de TIMP -1 e MMP 9 e de TIMP-2 e MMP -2, ou seja, a diminuição da freqüência de ocorrência de marcação de forte intensidade de MMPs observada entre a epiderme adjacente e o tecido neoplásico não pôde ser associada ao aumento do número

de células positivas para as TIMPs no presente estudo. Estudos com carcinomas epidermóides de língua, consideram positivos somente os casos em que a intensidade de coloração do tumor era maior do que a encontrada no epitélio normal ⁽⁹⁾. Nossos resultados foram observados considerando positivos todos os casos com imunomarcação, independente da intensidade em relação ao epitélio normal, sendo que todas as amostras estudadas apresentaram positividade para todos os marcadores investigados.

Por outro lado, os fibroblastos mais próximos ao tecido neoplásico epitelial apresentaram mais freqüentemente imunomarcação disseminada quando comparados às células mais distantes (Figura 2 D). Essa observação parece indicar que as células carcinomatosas sejam capazes de influenciar a expressão gênica das células parenquimatosas, alterando especificamente a atividade metabólica relacionada à manutenção da matriz extracelular. De fato, outros estudos já demonstraram tal influência, inferindo-se daí que parte significativa da degradação dos componentes da matriz seja devida a esse mecanismo.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que, ainda que tenha sido identificada uma diminuição evidente na ocorrência de forte marcação entre a epiderme e o epitélio neoplásico, não houve correlação entre os marcadores utilizados, entre si e com os dados clínicos coletados, bem como com o tipo histológico das lesões, e que portanto estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da associação dessas enzimas com o comportamento biológico do CBC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIRES M, AYRES-JR M, AYRES DL, SANTOS AS. *BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Ed. Sociedade Civil Mamirauá / MCT / Imprensa Oficial do Estado do Pará. Belém. 323pp. 2005
2. ALBINI, A. et al. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst.* v. 5, n.83, p.775-9, 1991.
3. BAUER E. A. et al. Quantitation and immunochemical localization of human skin collagenase in basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* V. 69, n. 4, p. 363- 367, 1977.
4. BEHMER, A. O. et al. ;Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, S. P. Edit. USP. 1976.
5. CIRCOLO, A.; et al. Differential regulation of the expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* v. 266, n. 19, p.12283-8, 1991.
6. DECLERCK, Y. A. Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res.* v. 51, n. 8, p. 2151-7, 1991.
7. FOLGUERAS, A. R. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* V. 48, p: 411-424. 2004.

8. GOMEZ, D. E. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* v. 74, n. 2, p.111-22, 1997.
9. GUTTMAN, D. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol.* v. 40, n. 8, p. 798-803, 2004.
10. HOWARD, E. W. et al. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.* v. 266, n. 20, p.13070-5, 1991.
11. KARELINA, T. V. Localization of 92-kDa type IV collagenase in human skin tumors: comparison with normal human fetal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* V. 100, n. 2, p. 159-65, 1993.
12. KERKELÄ E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.* V.12, n. 2. p. 109-25, 2003.
13. KOSSARD S. et al. *Basal cell carcinoma*. In LeBoit P, Burg G, Weedon D, Sarasin A (Eds.). *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of Skin Tumors*. IARC Press: Lyon,. p. 13-19, 2006.
14. MACKIE, R. M. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* v. 92, n. 1, p. 92-6; 2006

15. MONHIAN, N. Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. *Arch Facial Plast Surg*. V. 7, n. 4, p. 238-43, 2005.

16. MURPHY, A. N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol*. v. 157, n. 2, p. 351-8, 1993.

17. Nagase, H.; Woessner, J. F. Jr.; Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem*. v. 274, n. 31, p. 21491-4, 1999.

18. NAKOPOULOU, L. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J. Pathol*. V. 197, n. 3, p. 307-13, 2002.

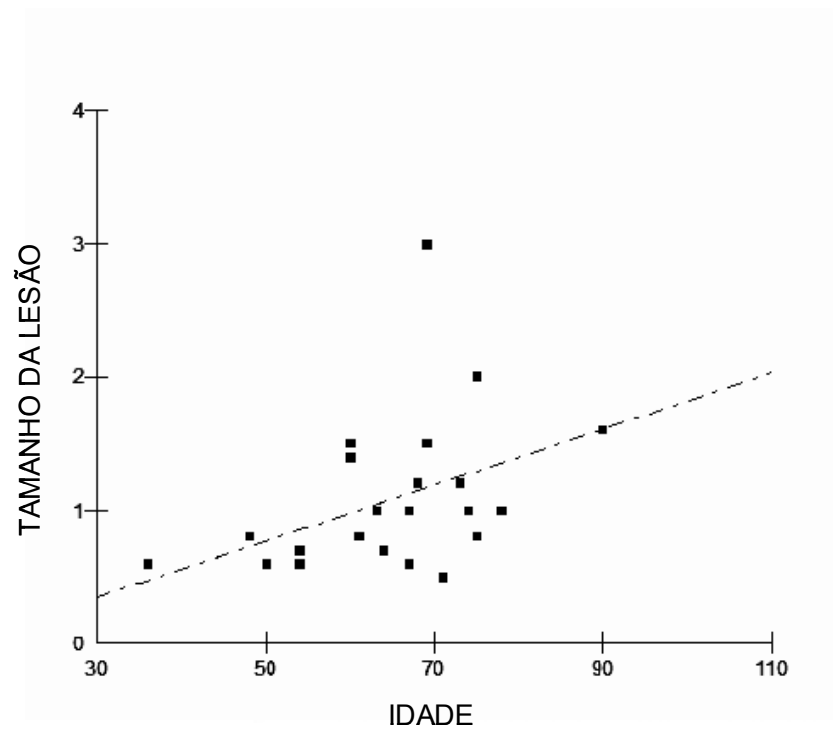
19. POULSOM, R. Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J. Clin. Pathol*. v. 46, n. 5, p. 429-36, 1993.

20. PYKE, C. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res*. v.52, n. 5, p. 1336-41, 1992.

21. RAITIO, A. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers. *Arch. Dermatol. Res*. v. 297, n. 6, p. 242-8, 2005.

22. REE, A. H. et al. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin. Cancer Res.* v. 3, n. 9, p.1623-8, 1997.
23. SCHROHL, A. S. Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* V. 2, n. 3, p. 164-72, 2003.
24. SCHROHL, A-S. Tumor Tissue Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 as a Prognostic Marker in Primary Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* v.10, p. 2289-2298, 2004.
25. STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* v.10, n. 6, p. 415-33, 2000.
26. WAGNER, N. S. Differential Expression of tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 by Cutaneous Squamous and Basal Cell Carcinomas. *J. Invest. Dermatol.* v. 106, p. 321-326, 1996.
27. Yucel, T. Matrix metalloproteinase expression in basal cell carcinoma: relationship between enzyme profile and collagen fragmentation pattern. *Exp. Mol. Pathol.* v. 79, n. 2, p. 151-60, 2005.

Figura 1 - Distribuição de casos de carcinoma basocelular de acordo com a idade dos pacientes e o tamanho da lesão ($R = 0,532$, $p = 0,008$, teste de Spearman).



FIGURAS E LEGENDAS

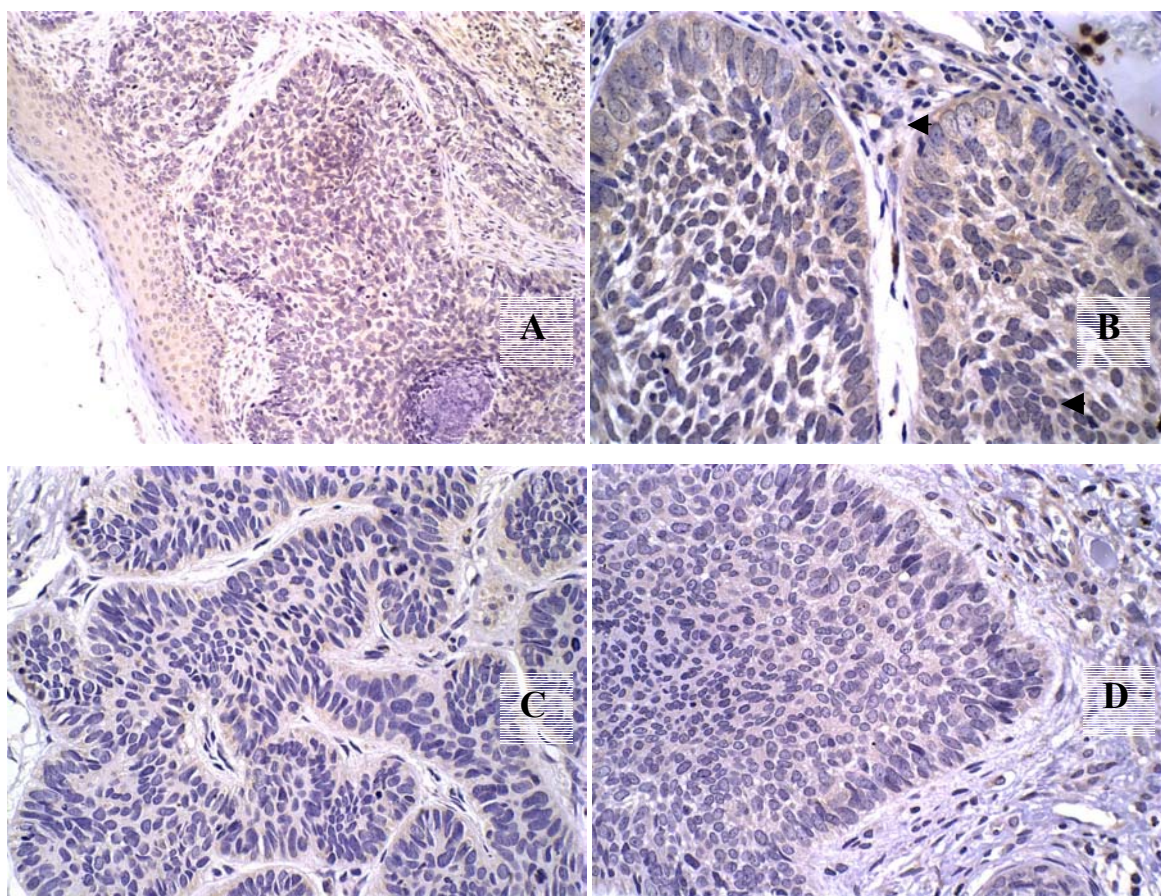


Figura 2 – Imunolocalização dos antígenos: A - MMP-2; B - MMP-9; C - TIMP-1 e D - TIMP-2 em carcinoma basocelular. Notar imunolocalização de MMP-9 e TIMP-2 em fibroblastos vizinhos ao tumor (setas). (Figura 4A, aumento de 200x, figuras 4B, C e D, aumento de 600x).

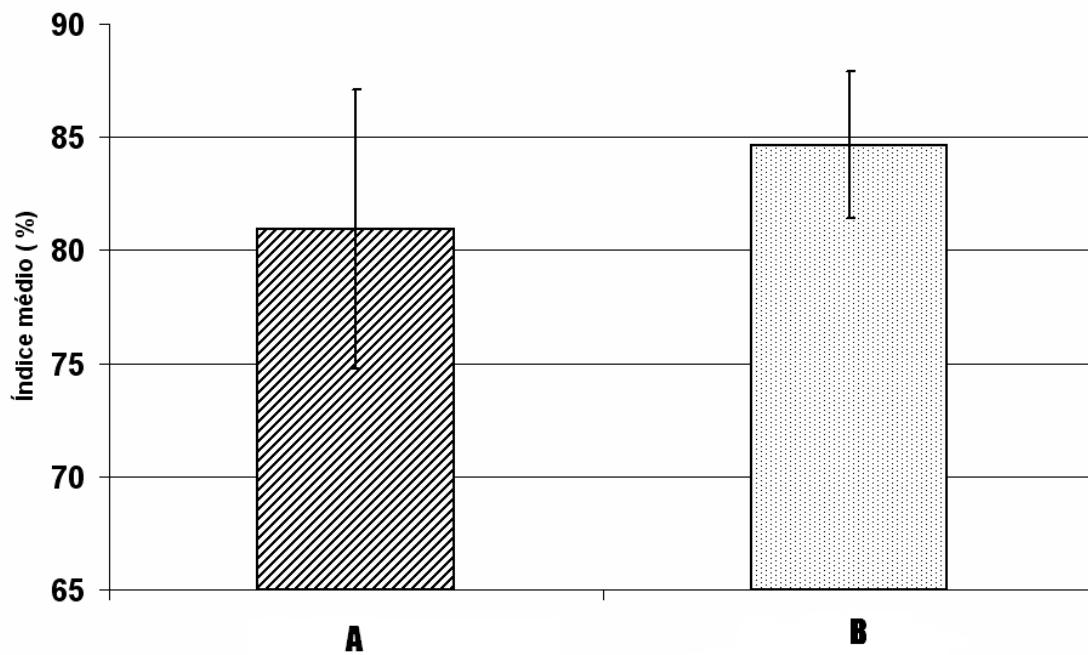


Figura 3- A- Carcinomas basocelulares de padrão sólido; B- Carcinomas basocelulares de padrão esclerodermiformes e micro-nodulares. Observou-se diferença estatística para TIMP-1 ($p=0,04$) entre A e B.

Tabela 1 – Distribuição de carcinomas basocelulares e dos respectivos epitélios adjacentes, de acordo com a intensidade de marcação de metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais (+ = marcação fraca; ++ = marcação forte).

	MMP-2*		MMP-9*		TIMP-1*		TIMP-2*	
	+	++	+	++	+	++	+	++
Epiderme	15	11	5	21	22	4	8	18
CBC	23	0	22	4	26	0	26	0

* $p < 0,05$ (teste de qui-quadrado).

Tabela 2 - Distribuição de fibroblastos em carcinomas basocelulares, relacionando o padrão de imunomarcção de metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais com a localização destas células em relação à neoplasia (D = marcação disseminada, O / A = marcação ocasional ou ausente).

	MMP-2		MMP-9*		TIMP-1*		TIMP-2*	
	D	O / A	D	O / A	D	O / A	D	O / A
Adjacentes	11	20	27	4	10	21	13	18
Distantes	5	25	11	19	2	28	4	26

* $p < 0,05$ (teste de qui-quadrado)

Obs: um caso não apresentava tecido conjuntivo suficiente para esta análise.

Corresponding author:

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Faculdade de Odontologia - Área de Patologia Bucal

Av. Pará, 1720 – Bloco 2U – Campus Umuarama

CEP 38401-136 - Uberlândia / MG, Brasil

adrianol@hc.ufu.br

4.2. Artigo a ser submetido

IMUNOLocalização de MMP-2, -9 e de seus inibidores teciduais TIMP-2 e TIMP-1 em carcinomas espinocelulares de pele.

Rosy Iára Maciel de Azambuja Ribeiro¹; Sérgio Vitorino Cardoso²; Ademir Rocha³,
Geovanni Dantas Cassali⁴; Adriano Mota Loyola.²✉

¹ Mestre em Biologia Celular; Doutoranda em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais.

²Doutor em Patologia; Professor da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

³ Doutor em Patologia; Professor do departamento de Clínica Médica, Disciplina de Patologia Especial, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Doutor em Patologia; Coordenador e professor do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma de células escamosas (CEC) de pele é um tumor maligno, de comportamento invasivo, e um potencial relativamente baixo de metástases. As metaloproteinases de matriz (MMP-2 e -9) são importantes no processo de invasão. Em contrapartida, os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) têm como principal função a inibição destas enzimas.

OBJETIVO: Identificar a expressão de MMP-2 e -9, bem como de TIMP-1 e -2, em CEC, tentando identificar possíveis associações entre a expressão dessas enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram coletados retrospectivamente 41 casos. Cortes histológicos das lesões foram submetidos à reação imunoistoquímica pela técnica streptavidina-biotina-peroxidase para detecção dos antígenos de interesse. Índices de imunomarcção foram construídos e comparados com os dados previamente obtidos.

RESULTADOS: Observou-se similaridade de marcações para todos os tipos de antígenos expressados. Os índices de imunomarcção foram de 82,8% ($\pm 5,5$), 96,2% ($\pm 1,7$), 93,7 ($\pm 4,2$) e 82,7% ($\pm 8,5$) para MMP-2, -9, TIMP-1 e -2, respectivamente. Houve correlação significativa entre os índices de imunomarcção de MMP-9 e TIMP-1 ($R = 0,449$, $p = 0,0032$). As células do estroma neoplásico apresentaram imunomarcção para todos os antígenos pesquisados. Houve diferenças significativas entre MMP-2 *versus* MMP-9, TIMP-1 ou TIMP-2; entre MMP-9 *versus* TIMP-2; e ainda entre TIMP-1 *versus* TIMP-2 ($p < 0,0001$).

CONCLUSÃO: A co-localização de MMPs e seus inibidores observados neste trabalho pode sugerir que estas estão em equilíbrio. Apesar da expressão semelhante, a intensidade de marcação dos TIMPs foi mais intensa nos CEC do que nos epitélios adjacentes ao tumor, indicando uma possível resposta do hospedeiro a invasão. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão de sua associação com o comportamento biológico do CEC.

Unitermos: Carcinoma espinocelular, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, Imunoistoquímica.

INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento das neoplasias malignas, em particular no processo de invasão, a integridade estrutural da matriz extracelular (MEC) é rompida, permitindo a invasão dos tecidos vizinhos (VARANI, 2000). As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem um grupo de enzimas direta ou indiretamente implicadas em muitas das mudanças do interstício, particularmente decorrentes da degradação da MEC, incluindo aquelas observadas na progressão neoplásica (CHANG; WERB, 2001; LUKASHEV; WERB, 1997). Conhecer as fontes celulares destas enzimas e sua distribuição no ambiente da lesão é importante para a compreensão de sua participação na biologia do tumor.

As MMPs são importantes em muitos aspectos da biologia desde a proliferação e diferenciação celular e remodelação da MEC à vascularização e migração celular. Esses eventos ocorrem muitas vezes em desenvolvimento normal e durante progressão tumoral. Um dos mecanismos da ação de MMPs, subjacentes a esses eventos, é a liberação e a clivagem proteolítica de fatores de crescimento, de tal forma que estes podem tornar-se disponíveis às células (YU; STAMENKOVIC, 2000).

Fisiologicamente, a atividade das MMPs é finamente controlada por seus inibidores teciduais específicos (TIMPs) na proporção de um para um (WOESSNER, NAGASE, 2000; GOLDBERG et al., 1992; KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1993; MATRISIAN, 1992). O equilíbrio entre MMPs e TIMPs parece ser importante para a manutenção da integridade tecidual (FODA; ZUCKER, 2001). A quebra deste equilíbrio pode resultar em doenças associadas com remodelação não controlada da matriz, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas, ulceração tecidual e fibroses (WOESSNER; NAGASE, 2000; WOESSNER, 2002).

Estudos indicam que TIMPs inibem invasão celular, tumorigênese, metástases e angiogênese e que essas atividades podem ser parcialmente atribuídas a inibição de MMPs. TIMPs exibem uma variedade de outras atividades celulares (BREW et al., 2000), como promotor de crescimento celular, atividade mitogênica (HAYAKAWA et al., 1992), mas também tem papel importante na redução de crescimento tumoral (EDWARDS et al., 1996; VALENTE et al., 1998).

O carcinoma de células escamosas (CEC) de pele é um tumor maligno derivado da proliferação atípica de queratinócitos epidérmicos, de comportamento invasivo, e é associado com uma apreciável taxa de metástase (0,5-16%) (ALAM; RATNER, 2001), sendo a segunda forma mais comum de câncer de pele na população caucasiana (20% das malignidades cutâneas) e o quinto neoplasma maligno no mundo (XU et al., 2003).

O comportamento biológico dos CECs é semelhante ao dos carcinomas espinocelulares originados de outros epitélios escamosos, e sua diferenciação histológica é baseada principalmente na intensidade de queratinização (NEVES; LUPI; TALHARI, 2001). O CEC é usualmente um tumor mais agressivo e de crescimento mais rápido do que o CBC, mas menos do que o melanoma (DEREN et al., 2003). Um dos parâmetros para prever um típico CEC metastático é o tamanho de no mínimo 15 mm, espessura vertical de no mínimo 2 mm, pouca diferenciação, presença de desmoplasia e invasão com eosinófilos e plasmócitos (QUAEDVLIEG et al., 2006).

A expressão de MMP-2 e -9 e de seus respectivos inibidores teciduais têm sido estudado extensivamente em diversos tumores (JINGA et al., 2006; LIOKUMOVICH et al., 1999; FUNADA; NISHIMURA; e YOKOYAMA, 2004; ZHANQ et al. 2003), mas poucos estudos investigaram seu papel no comportamento biológico do carcinoma espinocelular de pele. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de identificar a expressão de MMP-2 e -9, bem como de seus respectivos inibidores, TIMP-1 e -2, em carcinomas espinocelulares de pele, tentando identificar possíveis associações entre a expressão dessas enzimas e assim agregar conhecimento do seu papel no desenvolvimento dessa importante doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletados retrospectivamente 41 casos de CEC de pele do laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, diagnosticados e registrados no período de 2000 a 2004. Como critérios de inclusão foram considerados a confirmação de diagnóstico em exame histopatológico (LE BOIT et al., 2005) e presença de tecido em quantidade suficiente para análise morfológica microscópica e morfométrica para expressão dos antígenos MMPs e TIMPs. Dos casos levantados, 29 acometeram homens e 12 mulheres, com idades variando entre 28 e 88 anos, e média de 66,7 anos. Aproximadamente metade dos tumores (53,7%) foi localizada na região de cabeça e pescoço. O tamanho médio observado foi de 1,8 cm, com dimensão mínima de 0,3 cm e máxima de 5 cm no maior diâmetro. Vinte e quatro casos mostraram-se como tumores bem diferenciados (58,5%), 15 (36,6%) moderadamente diferenciados, com apenas dois casos (4,9%) pouco diferenciados. Amostras de pele não neoplásica obtidas em cirurgias plásticas abdominais de áreas minimamente expostas ao sol também foram analisadas para comparação. Todos os fragmentos teciduais neoplásicos foram fixados em formalina (10%) e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 3 μ m foram obtidos e as secções montadas em lâminas de vidro foram submetidas à coloração pela técnica da hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica com fins diagnósticos. Para os ensaios imunohistoquímicos, os cortes foram montados em lâminas previamente silanizadas.

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e então submetidos à recuperação antigênica com solução de tampão EDTA (1mM, pH 8.0) em ambiente de microondas, perfazendo 3 ciclos de 5 minutos cada. Foi ainda realizado bloqueio da atividade de peroxidase e de biotina endógenas com água oxigenada (10V) e solução

comercial (DAKO, Co Carpenteria, CA, USA.), respectivamente. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de avidina, por um período de vinte minutos. As amostras foram então incubadas com os anticorpos primários (clones Ab-4 anti-MMP-2, 1:800; Ab-3 anti MMP-9, 1:2000; Ab-2 anti TIMP-1, 1:600; e Ab-2 anti TIMP-2; todos fabricados por Oncogene Research Products (Cambridge, MA)) por 18 horas, à temperatura ambiente. A amplificação da reação foi obtida com o sistema avidina-biotina-peroxidase, segundo as orientações do fabricante (Dako, EUA). A revelação da reação foi feita utilizando-se 3',3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis MO. EUA). Os fragmentos teciduais foram então contra-corados em hematoxilina de Harris. Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por solução de BSA a 1%, diluída em PBS (pH 7,4), e como controles positivos foram usadas amostras de carcinoma ductal de mama previamente conhecidos como positivos para os antígenos pesquisados.

Avaliação da imunomarcção

Análise qualitativa: Nas amostras de pele normal e não neoplásica adjacente ao tumor, foram observados os seguintes parâmetros para a imunomarcção: localização celular epitelial (camadas basal, espinhosa, granulosa, queratina), compartimentos celulares (membrana, citoplasma, núcleo). Nas amostras teciduais dos tumores considerou-se intensidade, topografia da marcação celular nas ilhotas tumorais (camada basal ou externa, interna e pérolas), compartimentos celulares (membrana, citoplasma e núcleo), e na área do estroma adjacente à neoplasia. Nos fibroblastos presentes no estroma, a análise foi realizada tendo como referência a existência de marcações localizadas ou difusas.

Análise semi-quantitativa: Esta avaliação foi realizada apenas para o epitélio neoplásico. Como referência para avaliação, considerou-se a intensidade de expressão antigênica da camada basal do epitélio adjacente à lesão que apresentou-se positiva em todas as amostras de neoplasia como padrão de forte intensidade. Assim, na avaliação dos tumores, foram estabelecidos dois padrões de marcação: forte (++), quando o padrão de marcação reproduzia ou era mais intenso do que aquele do queratinócito basal epitelial; e fraca (+), quando a intensidade era menor. Desta forma, avaliou-se a frequência com que estes tipos de padrões de expressão foram observados para os diferentes antígenos pesquisados.

Análise quantitativa: Para avaliação quantitativa da imunomarcação, foi observada a presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nas células neoplásicas, independentemente de sua intensidade. Para cada amostra foram analisados 10 campos histológicos em grande aumento (aumento original de 400x), resultando em aproximadamente 1000 células. Finalmente, a proporção entre células marcadas e não marcadas foi transformada em valores percentuais, tidos como índice de marcação antigênica (CARDOSO et al., 2002).

Análise estatística

Os testes de qui-quadrado, *t* de Student, Kruskal-Wallis e de Spearman foram utilizados para se investigar a existência de associações, diferenças entre médias ou correlações entre as variáveis de interesse, respectivamente, sempre com nível de significância fixado em 5%, utilizando-se o software BioEstat (AIRES et al., 2005).

RESULTADOS:

Expressão de MMP-2

A expressão de MMP-2 foi identificada no citoplasma e na membrana celular dos queratinócitos da pele normal e da epiderme adjacente ao tumor e nas células neoplásicas (Figura 1). Na epiderme, células da camada basal, em geral, não mostraram expressão deste antígeno na membrana plasmática. Em direção a superfície, a expressão foi citoplasmática e membranácea. Nas ilhotas tumorais a localização da expressão variou em função do grau de diferenciação. Naquelas em que a diferenciação era patente, as células com padrão escamoso mais típico (células maiores) apresentavam tendência à redução na intensidade com aumento da expressão em membrana (Figura 1 C). Nas células menores as marcações tendiam a ser citoplasmáticas com eventuais localizações membranáceas. Em muitas ilhotas celulares com presença de diferenciação, as células basalóides (reproduzindo basais e parabasais) mostravam ausência ou com fraca marcação. Ocasionalmente, ilhotas formadas por células menores, a expressão se dava tanto citoplasmática quanto membranácea (Figura 1 D).

Expressão de MMP-9

As células do epitélio normal (Figura 2A), com exceção da camada granulosa, mostraram marcação citoplasmática e nuclear, de forma heterogênea, num padrão de mosaico. Na neoplasia, a expressão prevalente foi citoplasmática, raramente nuclear. As camadas celulares com diferenciação mais acentuada tendiam a perder a expressão de MMP-9 (Figura 2B e C). Nenhuma marcação foi observada nas pérolas de queratina (Figura 2D).

Expressão de TIMP-1

A Figura 3 mostra o padrão de imunomarcação de TIMP -1 no epitélio não neoplásico adjacente à lesão. Nessa localização, a expressão prevalente de TIMP-1 foi citoplasmática, predominantemente homogênea. Nas células neoplásicas a expressão deste antígeno foi também predominantemente citoplasmática e homogênea, de fraca

intensidade. Naquelas que apresentavam padrão escamoso mais típico, a imunomarcação apresentava tendência   redução e ausência de expressão (Figura 3 B e C).

Expressão de TIMP-2

No epitélio não neoplásico adjacente   lesão e em pele normal, a expressão são não foi observada nos queratinócitos da camada pavimentosa e nas áreas queratinizadas. Nas demais camadas, os queratinócitos apresentaram expressão citoplasmática. Um padrão grosseiramente em mosaico foi notado, tendo em vista que queratinócitos não marcados também foram observados nestas regiões. No epitélio neoplásico, a expressão foi em geral fraca e prevalente nas células menos diferenciadas.  reas com diferenciação escamosa mais t pica, a expressão tendia a redução e ausência. (Figura 4).

Avaliação semiquantitativa da intensidade de expressão

A avaliação semi-quantitativa da intensidade de expressão pode ser observada na Tabela 1. Para MMP-2, as amostras de epiderme não neoplásica adjacente ao tumor foram todas marcadas fortemente, enquanto que nos carcinomas houve casos em que a marcação foi fraca ou inexistente; entretanto, essa diferenç a não foi significativa em termos estatísticos. A freq ncia de imunomarcação de forte intensidade foi muito semelhante entre a epiderme adjacente e para os carcinomas, em relação   MMP-9. Para TIMP-1 e TIMP-2, observou-se claramente que houve aumento na freq ncia de marcação de forte intensidade da epiderme adjacente para os carcinomas, observação essa que foi estatisticamente significativa (Tabela 1).

Em todos os casos analisados pode-se observar similaridade de marcações para todos os tipos de antígenos expressados, independentemente do padrão de invasão tumoral. Lesões dispostas em aglomerados celulares sólidos de maiores dimensões marcaram de forma semelhantes aqueles aglomerados celulares menores.

Análise quantitativa da imunomarcação no parênquima tumoral

Em média, os índices de imunomarcação (número relativo de células marcadas das enzimas estudadas) foram de 82,8% ($\pm 5,5$), 96,2% ($\pm 1,7$), 93,7 ($\pm 4,2$) e 82,7% ($\pm 8,5$) para MMP-2, -9, TIMP-1 e -2, respectivamente. Houve correlação significativa entre os índices de imunomarcação de MMP-9 e TIMP-1 (0,449, $p= 0,0032$, teste de

Spearman). Houve diferença significativa nos índices médios de marcação dos antígenos estudados ($p < 0,0001$, teste de Kruskal-Wallis). (Figura 5).

Padrão de imunomarcação das MMPs e TIMPs no estroma

Na análise da imunomarcação das células do estroma neoplásico, observou-se que apenas para MMP-2 houve maior frequência de casos com marcação ocasional ou ausente. Para MMP-9 e TIMP-1, houve predomínio de casos com marcação disseminada e, para, TIMP-2, apenas marcação disseminada foi identificada. Quando a frequência de marcação disseminada foi comparada estatisticamente entre os marcadores de interesse, houve diferença significativa entre MMP-2 *versus* MMP-9, TIMP-1 ou TIMP-2; e ainda entre TIMP-1 *versus* TIMP-2 (Figura 5), conforme análise pelo teste de qui-quadrado com correção do valor de p pelo método de Bonferroni (significativos apenas os valores de p menores que 0,008).

DISCUSSÃO

A degradação proteolítica da MEC é um passo essencial para a invasão e metástase na progressão tumoral. Neste processo, as MMPs elaboradas pelas células tumorais atuam na regulação do metabolismo da MEC e tem função importante no comportamento biológico destas células. Desta forma, parecem intervir de forma decisiva no processo de invasão e metástases, *in vivo* e *in vitro* (CURRAN; MURRAU, 2000; BIRKEDAL-HANSEN, 1993; MATRISIAN, 1992). Tem sido proposto que células de câncer iniciam a disseminação no meio adjacente pela expressão de MMPs (LIOTTA; KOHN, 2001).

Gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) são particularmente importantes neste processo, visto que degradam o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, além de colágenos intersticiais. Nesse sentido, a literatura tem mostrado que síntese de MMP-2 correlaciona-se com capacidade metastática e invasiva de diferentes tipos de neoplasias em sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo* (KURSCHAT et al., 2002), e que os níveis da expressão e atividade da MMP-9 estão aumentados em tumores malignos de diferentes histogêneses. Estes aspectos têm sido identificados tanto nas células do parênquima quanto do estroma tumoral. (JINGA et al., 2006). Trabalhos com hibridação *in situ* mostram que expressão de MMPs é mais comum em células estromais. Células neoplásicas podem induzir a expressão de MMPs diretamente ou secretando fatores solúveis que induzem expressão de MMPs nas células do estroma (NELSON et al., 2003).

Os carcinomas espinocelulares são tumores localmente invasivos. Se não tratados, invadem os tecidos subcutâneos como músculos, ossos e cartilagens, podendo dar origem a metástases. Observações da expressão das MMPs 2 e 9 e de TIMPs têm sido feitas isoladamente, não em conjunto, e poucas investigações sobre a sua presença em carcinomas de pele têm sido identificados (JOHNSON et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1996; VARANI et al., 2000; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003; WAGNER et

al., 1996; HELLIWELL et al., 2001). Conhecer as fontes celulares destas enzimas e sua distribuição no ambiente da lesão é importante para a compreensão de sua participação na biologia do tumor. Visto isso, propôs-se no presente estudo, identificar a expressão das enzimas MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 por imuno-histoquímica em amostras de carcinomas espinocelulares cutâneos.

Nossos resultados demonstraram expressão das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) em todos os casos analisados. Estes achados corroboram estudos anteriores que também evidenciaram ambas as proteinases nestas lesões (KERLELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003). As gelatinases degradam colágeno tipo IV e destroem a membrana basal como prelúdio à invasão. A ação de MMP-2 e -9 associam-se bem, e em particular, com o potencial metastático de células tumorais (NAKAGAWA et al., 1996; LENGYEL et al., 1995). Outros estudos realizados em carcinomas de estômago, mama, cólon, fígado, bexiga e pâncreas também têm obtido resultados similares (PAPATHOMA, 2000; JINGA et al., 2006).

Também observamos que a imunomarcação com MMP-9 foi homogênea no tumor e epitélios de pele normal e adjacente ao tumor, com exceção da camada granulosa e áreas queratinizadas do epitélio e pérolas de queratina no tumor. Já Kobayashi et al. (1996), ao contrário, encontraram marcação de MMP-9 na camada granulosa e em algumas células da camada basal e nos carcinomas, ao redor das pérolas de queratina e camadas proliferativas. A marcação de MMP-9 observada no tumor e estroma junto com os achados anteriores sobre MMP-2, sugerem fortemente que ambas as proteinases participam ativamente no processo de progressão tumoral e sua associação com o componente proliferativo e periférico do tumor destaca seu papel no crescimento e invasão local da lesão.

Nossos resultados apontam diferença significativa nos índices médios de marcação de MMP-2 e 9 sendo maior em MMP-9 do que em MMP-2, corroborando os resultados demonstrados em CEC oral (HONG et al., 2000). Este mesmo trabalho mostra que a superexpressão de MMP-9 correlaciona com metástase nos linfonodos. Já Kawamata et al. (1998) apontam que MMP-2 pode servir como marcador de metástase para CEC oral. Além do mais, a expressão de MMP-2 correlaciona com agressividade em CEC cutâneo (FUNDYLER; KHANNA; SMOLLER, 2004).

No presente trabalho, MMP-2 e -9 também foram identificadas em células estromais nos diferentes tumores analisados, tanto nos fibroblastos quanto em diferentes tipos de células do infiltrado inflamatório presente, corroborando os resultados encontrados em estudo em carcinoma basocelular (PYKE et al.,1992). Nossa análise mostrou que em um maior número de lesões MMP-9 mostrou um padrão de distribuição estromal difuso, diferentemente do padrão localizado observado para MMP-2, podendo então sugerir que a expressão de MMP-9 no estroma seja mais passível de alteração durante a evolução tumoral, embora não tenhamos feito uma comparação pormenorizada entre a expressão dessa enzima no estroma da epiderme não neoplásica e aquela associada aos carcinomas. Além disso, este padrão de distribuição ainda não havia sido descrito para carcinomas espinocelulares de pele, havendo uma aparente ausência de discussão deste achado na literatura. Para CECs de boca, expressão de MMP-2 e -9 tem sido observada também como marcação celular no estroma adjacente ao fronte invasivo tanto em fibroblastos como em células do infiltrado inflamatório presente. Em geral, os autores têm atribuído este achado a um pior prognóstico (KOBAYASHI et al., 1996; SAMANTARAY et al., 2004). Além disso, células inflamatórias expressando MMP-9 estão envolvidas em processos de carcinogênese epitelial (BERGERS; COUSSENS, 1999). Neste sentido, se realmente a expressão mais difusa de MMP-9 em relação à MMP-2, nos casos observados, pode ser considerada evidência de maior atividade da primeira, é possível que a mesma seja mais importante para a determinação da agressividade biológica dos carcinomas epidermóides de pele.

Nos casos de CECs de pele analisados na presente investigação, pode-se perceber TIMP-1 e -2 expressos na maior parte das neoplasias. No epitélio neoplásico, a imunomarcagem de TIMP-1 e -2 foi forte, expressa em toda a lesão, não sendo possível identificar um setor da neoplasia com marcação diferenciada. No estroma, em especial, embora os mesmos antígenos mostrassem uma distribuição difusa, a marcação foi mais intensa, o oposto do que se identificou no tecido neoplásico. Estes achados, particularmente, foram similares aos descritos por outros (WAGNER et al., 1996; HELLIWELL et al., 2001). Kobayashi et al. (1996) observaram apenas expressão epitelial. Embora estes achados já tenham sido descritos isoladamente na literatura, em nosso trabalho, tivemos a oportunidade de avaliar semi-quantitativamente, o padrão de expressão das MMPs e seus inibidores, no intuito de verificar possíveis papéis e

interações destes antígenos na progressão tumoral. Os estudos citados acima reportam a associação entre MMP-9 e -2 na agressividade tumoral, traduzido pela invasividade e potencial metastático. Todavia, comparativamente aos CECs de boca e outras localizações (pulmão, intestino), os CEC de pele são relativamente inócuos, apresentando um potencial metastático muito reduzido (ALAM; RATNER, 2001). Não obstante, MMPs-1, -2 e -3 tem sido identificadas em amostras de CEC cutâneos metastáticos, tanto no epitélio neoplásico como nas células estromais (TSUKIFUGI, et al., 1999). Lesões metastáticas têm apresentado expressões de MMP-2 mais intensas que os casos primários, embora não apresentando significado estatístico (FUNDYLER et al., 2004). Nosso estudo não permite obter conclusões nesta linha, já que a amostra analisada no tempo definido não apresentou nenhum tumor metastático associado. Neste sentido, estudos com longo prazo de seguimento ou utilizando amostras de casos metastáticos deveriam ser conduzidos a fim de melhor avaliar estas possibilidades.

Similarmente, dados associando a expressão de TIMPs com comportamento e prognóstico dos cânceres de pele não melanoma são escassos. TIMPs-1, -2 e -3 tem sido descritos no estroma periférico ao CECs cutâneos. Paralelamente, esta expressão tem sido mais alta nos CBC, considerados menos infiltrativos que os CECs (WAGNER et al., 1996), e baixa nos CECs bucais, comparativamente mais invasivos que os cutâneos (SUTINEN et al., 1998; YOSHIKAZI et al., 2001). No presente estudo tivemos a oportunidade de verificar a expressão conjunta de MMPs e TIMPs. Enquanto TIMPs foram fracamente expressas no epitélio neoplásico, uma forte expressão, de forma difusa foi flagrada no estroma, sugerindo um papel modulador negativo para a invasividade, e que sua expressão estromal seja reativa, podendo atuar como inibidora da angiogênese e invasividade tumoral (WAGNER et al., 1996; HELLIWELL et al., 2001). Dados na literatura reportam que TIMP tem efeitos estimulatórios em crescimento celular (BERTAUX et al., 1991) além de efeitos inibitórios na atividade MMPs (MATRISIAN, 1992)

Embora a literatura mostre dados *in vitro* e *in vivo* desses antígenos, as diferenças teciduais na sua expressão podem sugerir uma regulação específica, tecido dependente, que ainda não parece bem compreendida.

Cada MMP pode ter papel diferente dependendo do tipo celular ou do estado da transformação desta célula. Por exemplo, MMP-9 pode induzir a angiogênese ou inibi-la pela geração do angiostatina (PATTERSON, SANG, 1997). Aumentada a expressão das MMPs, pode ser conferido invasividade às células tumorais e, paradoxalmente, a ação destas pode levar a produção das moléculas que limitem o seu crescimento. Similarmente, se uma determinada MMP for expressa por uma célula tumoral, a enzima pode contribuir com a invasão, enquanto que, quando expressado por uma célula estromal pode ter um outro papel, tal como regulatório ou mesmo protetor, na defesa do hospedeiro.

Em conclusão, a co-localização de MMPs e seus inibidores nos CEC aqui estudados pode sugerir que estas estão em equilíbrio, auxiliando na explicação do padrão mais lento de crescimento tumoral dos CEC cutâneos. Apesar da expressão semelhante, a intensidade de forte marcação dos TIMPs foi mais intensa nos CEC do que nos epitélios adjacentes ao tumor, indicando uma possível resposta do hospedeiro a invasão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES. M.; AYRES,-JR. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. BioEstat 4.0: **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Ed. Sociedade Civil Mamirauá / MCT / Imprensa Oficial do Estado do Pará. Belém. 323pp. 2005

ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous cell carcinoma. *N Engl. J. Méd*, 2001. 344:975–983

BERGERS, G.; COUSSENS, L. M. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev.*, 2000. 10(1):120-7.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSE, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993. 4: 197–25.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 477:267-283.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001, 11(11):S37-43.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion. *J Pathol*, 2000. 189(3):300-8.

DEREN, O.; TUNCEL, A.; GENÇAGA, S.; ADANALI, G.; ERDOĞAN, B. Disseminated squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg*, 2003. 29(12):1241-3

EDWARDS, D. R.; BEAUDRY, P. P.; LAING, T. D.; KOWAL, V.; LECO, K. J.; LECO, P. A.; LIM, M. S. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996. 3:S9-15. Review.

FODA, H. D.; ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *DDT*, 2001. 6. 9. 478-482.

FUNADA, Y.; NISHIMURA, Y.; YOKOYAMA, M. Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in Klotho mice. *Kobe J Med Sci*, 2004. 50(3-4):59-67

FUNDYLER, O.; KHANNA, M.; SMOLLER, B. R. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Modern Pathology*, 2004. 17: 496-502.

GOLDBERG, G. I.; STRONGIN, A.; COLLIER, I. E.; GENRICH, L. T.; MARMER, B. L. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*, 1992. 267(7):4583-91.

HAYAKAWA, T.; YAMASHITA, K.; TANZAWA, K.; UCHIJIMA, E.; IWATA, K. Growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*, 1992. 298: 29-32.

HELLIWELL, T. R. Molecular markeres of metastasis in squamous carcinomas. *J. Pathol*, 2001. 194: 289-93.

HONG, J. H.; TSAI, C. S.; WANG, C. C.; LAI, C. H.; CHEN, W. C.; LEE, S. P.; CHANG, T. C.; TSENG, C.J. Comparison of clinical behaviors and responses to radiation between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas of the cervix. *Chang Gung Med J*, 2000. 23(7):396-404.

JINGA, D. C.; BLIDARU, A.; CONDREA, I.; ARDELEANU, C.; DRAGOMIR, C.; SZEGLI, G.; STEFANESCU, M.; MATAACHE, C. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(2):499- 510.

JOHNSON, T. M.; ROWE, D. E.; NELSON, B. R.; SWANSON, N. A. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J. Am Acad Dermatol*, 1992. 26(3 Pt 2):467-84.

KAWAMATA, H.; UCHIDA, D.; HAMANO, H.; KIMURA-YANAGAWA, T.; NAKASHIRO, K. I.; HINO, S.; OMOTERARA, F.; YOSHIDA, H.; SATO, M. A Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol.*, 1998. 13(4):699-704.

KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*, 2003: 12: 109–125.

KLEINER, D. E. JR; STETLER-STEVENSON, W. G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. 5(5):891-7. Review.

KOBAYASHI, T.; ONODA, N.; TAKAGI, T.; HORI, H.; HATTORI, S.; NAGAI, Y.; TAJIMA, S.; NISHIKAWA, T. Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch Dermatol Res*, 1996. 288(5-6):239-44.

KOSSARD S. et al. Basal cell carcinoma. In LEBOIT, P.; BURG, G.; WEEDON, D.; SARASIN, A. (Eds.). *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of Skin Tumors*. IARC Press: Lyon,. p. 13-19, 2006.

KURCHAT, P.; WICHENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol*, 2002. 197(2):179-87.

LENGYEL, E.; SCHMALFELDT, B.; KONIK, E.; SPATHE, K.; HARTING, K.; FENN, A.; BERGER, U.; FRIDMAN, R.; SCHIMITT, M.; PRECHTEL, D.; KUHN, W. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2001. 82(2):291-8.

LIOKUMOVICH, P.; GOLDBERG, I.; DAVIDSON, B.; GOTLIEB, W. H.; ZAHAVI, T.; BEN-BARUCH, G.; REDER, I.; KOPOLOVIC, J. Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. *J. Clin. Pathol*, 1999. 52:198-202.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature (Lond.)*, 2001. 411: 375-379.

LUKASHEV, M. E.; WERB Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, 1998. 8:437-441.

MATRISIAN, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 1992. 14(7):455-63. Review.

NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; FUJIMOTO, N.; OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. *J Neurooncol*, 1996. 28(1):13-24.

NELSON, K. L.; RANGANATHAN, A. C.; MANSOURI, J.; RODRIGUEZ, A. M.; PROVIDENCE, K. M.; RUTTER, J. L.; PUMIGLIA, K.; BENNETT, J. A.; MELENDEZ, J. A. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res.*, 2003. 9(1):424-32.

NEVES, R. G. ;LUIPI O ;TALHARI, S. Câncer da Pele. 1. ed. Rio de janeiro: Editora MEDSI, 2001. v. 1. 702 p.

PAPATHOMA, A. S.; PETRAKI, C.; GRIGORAKIS, A.; PAPAKONSTANTINO, H.; KARAVANA, V.; STEFANAKIS, F.; SOTSIOU, F.; PINTZAS, A. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res*, 2000 20(3B):2009-13.

PATTERSON, B. C.; SANG, Q. X. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/Types IV Collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*, 1997. 272: 28823-5.

PYKE, C. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.*, 1992.v.52, n. 5, p. 1336-41.

QUAEDVLIEG, P. J. F.; CREYTENS, D. H. K. V. ; EPPING, G. G.; PEUTZ-KOOTSTRA, C. J.; NIEMAN, F. H. M., THISSEN, M. R. T. M., KREKELS, G. A. Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. *Histopathology*. 2006, 49(3): 256–264.

RALHAN, R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004. 130:37-44.

SAMANTARAY, S., SHARMA, R., CHATTOPADHYAYA, T. K., GUPTA, D. S. SUTINEN, M.; KAINULAINEN, T.; HURSKAINEN, T.; VESTERLUND, E.; ALEXANDER, J. P.; OVERALL, C. M.; SORSA, T.; SALO, T. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br. J. Cancer*, 1998. 77(12):2239-45

TSUKIFUGI, R. TAGAWA, K.; HATAMOCHI, A.; SHINKAI, H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br. J. Cancer* 1999 Jun;80(7):1087-91

VALENTE, P., FASSINA, G., MELCHIORI, A., MASIELLO, L., CILLI, M., VACCA, A., ONISTO, M., SANTI, L., STETLER-STEVENSON, W. G., AND

ALBINI, A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer*, 1998.75: 246–253.

VARANI, J. Interaction of tumor cells with the extracellular matrix. *Revis Biol Celular*, 1987. 12:1–113.

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

WAGNER, N. S. Differential Expression of tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 by Cutaneous Squamous and Basal Cell Carcinomas. *J. Invest. Dermatol*, 1996. 106: 321-326.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.

XU, Y. P.; ZHAO, X. Q.; SOMMER, K.; MOUBAYED, P. Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003. 4(4):491-501

YOSHIZAKI, T.; MARUYAMA, Y.; SATO, H.; FURUKAWA, M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2001 Jan 20;95(1):44-50.

YU, W.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 2000. 15;14(2):163-76.

ZHANQ, S.; LI, L.; LIN, J. Y.; LIN, H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World*

Tabela 1 - Distribuição de carcinomas espinocelulares e dos respectivos epitélios adjacentes, de acordo com a intensidade de marcação de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e -9) e de seus inibidores teciduais (TIMP-1 e -2) (+ = marcação fraca; ++ = marcação forte).

Grupos	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2	
	+	++	+	++	+	++	+	++
Epiderme	0	41	11	30	41	0	32	9
CEC	5	36	8	33	3	38	8	33
<i>p</i> *	0,08		0,45		< 0,0001		< 0,0001	

* Teste de qui-quadrado.

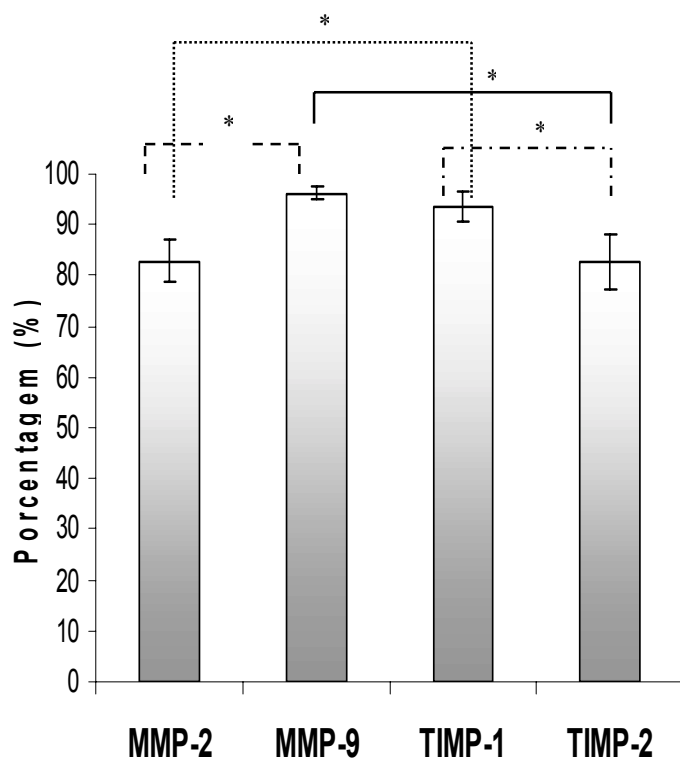


Figura 5 – Índices médios de imunomarcção (número relativo de células marcadas das enzimas estudadas) dos antígenos estudados (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2). * $p < 0,0001$. (teste de Kruskal-Wallis)

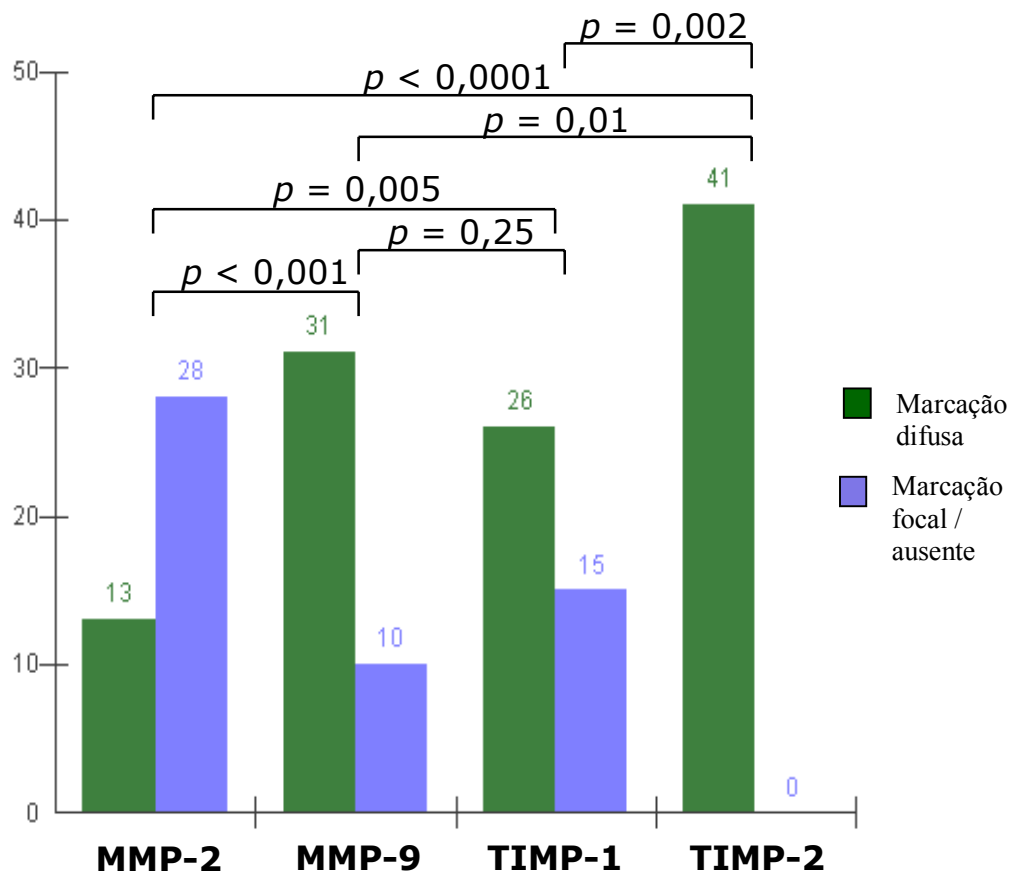


Figura 6 – Frequência de imunomarcagem disseminada ou ocasional/ausente das células do estroma neoplásico, em amostras de carcinomas espinocelulares. Teste de qui-quadrado.

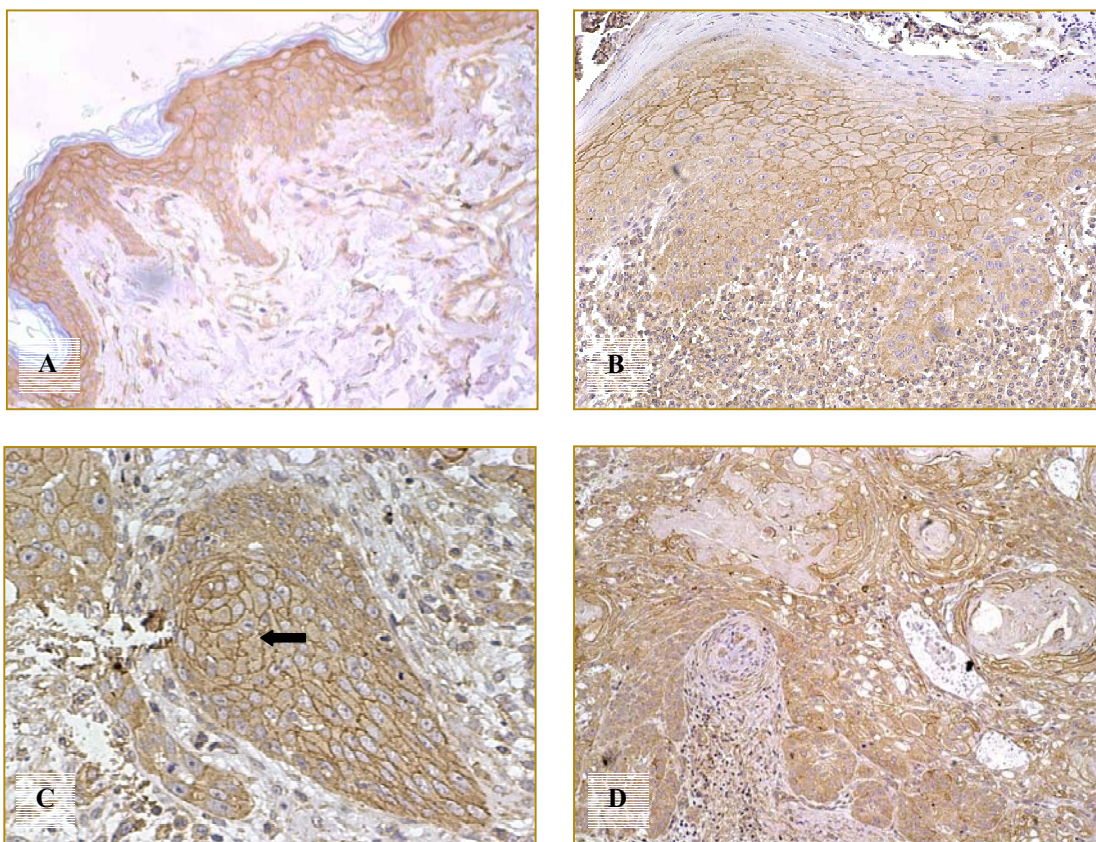


Figura 1 - Expressão de MMP-2 - Foi identificada no citoplasma e na membrana celular dos queratinócitos da pele normal (A) e da epiderme adjacente ao tumor(B) e nas células neoplásicas (B e C). Nas ilhotas tumorais (C), as células com padrão escamoso mais típico apresentavam tendência à redução na intensidade com aumento da expressão em membrana (seta). Em muitas ilhotas celulares com presença de diferenciação, as células mostravam ausência ou com fraca marcação (D).

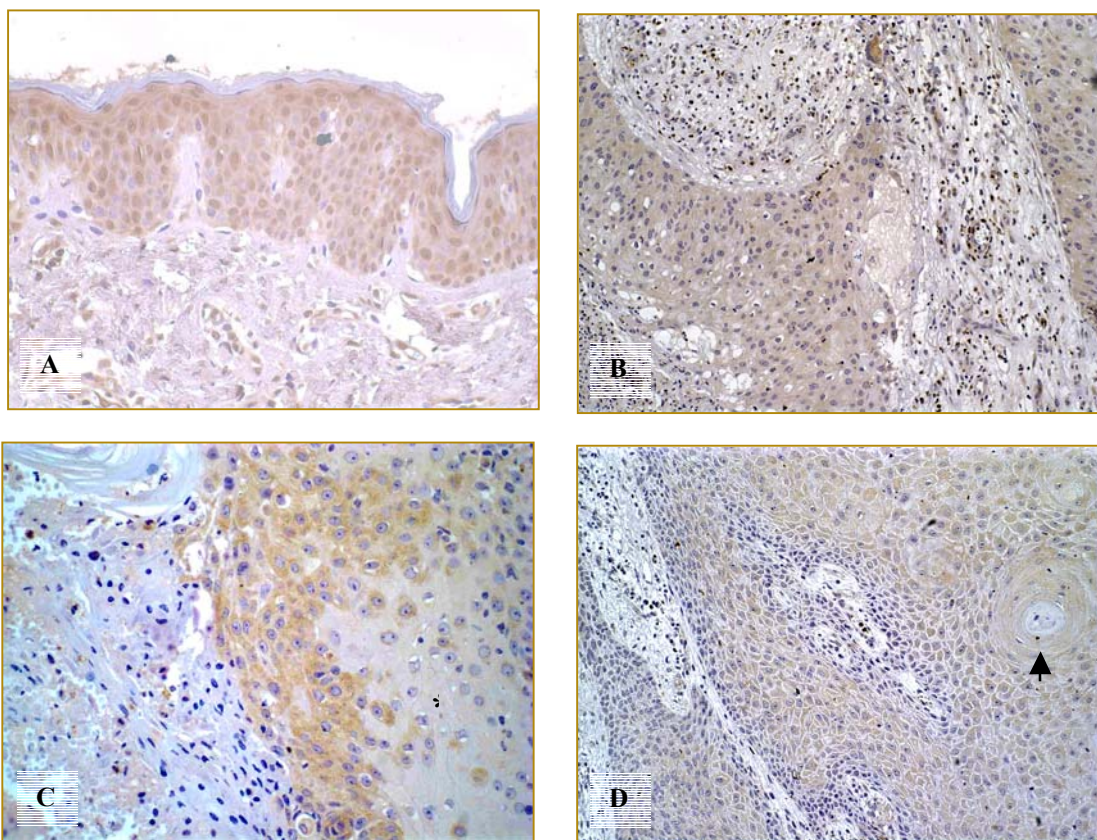


Figura 2- Expressão de MMP-9 - As células do epitélio normal, com exceção da camada granulosa, mostraram marcação citoplasmática e nuclear, de forma heterogênea, num padrão de mosaico (A). Na neoplasia, a expressão prevalente foi citoplasmática, raramente nuclear (B e C). As camadas celulares mais centrais nas ilhotas neoplásicas tendiam a não apresentar expressão de MMP-9 (C, asterisco). Nenhuma marcação foi observada nas pérolas de queratina (D, seta).

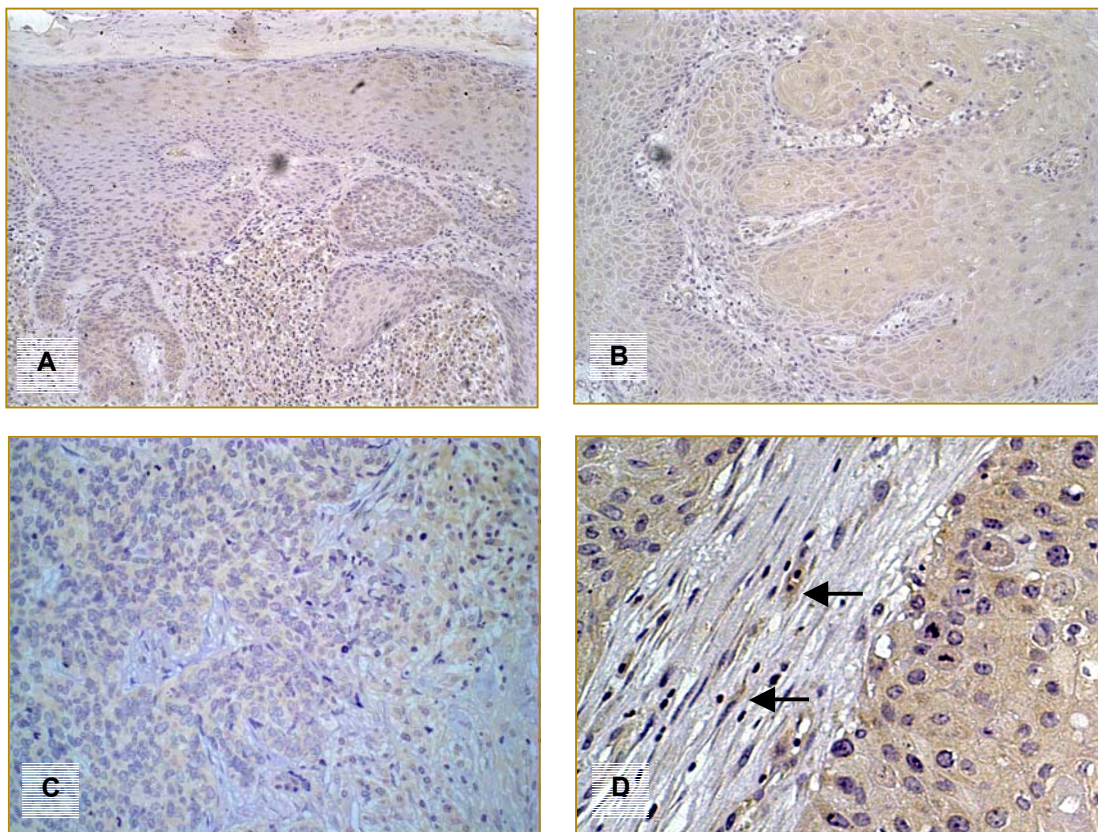


Figura 3- Expressão de TIMP-1- A Figura A mostra o padrão de imunomarcção de TIMP -1 no epitélio não neoplásico adjacente à lesão. Nessa localização, a expressão prevalente de TIMP-1 foi citoplasmática. Nas células neoplásicas a expressão deste antígeno foi também predominantemente citoplasmática e homogênea, de fraca intensidade (B). Naquelas que apresentavam padrão escamoso mais típico, a imunomarcção apresentava tendência à redução e ausência de expressão (C). Em D, células do estroma marcadas (setas).

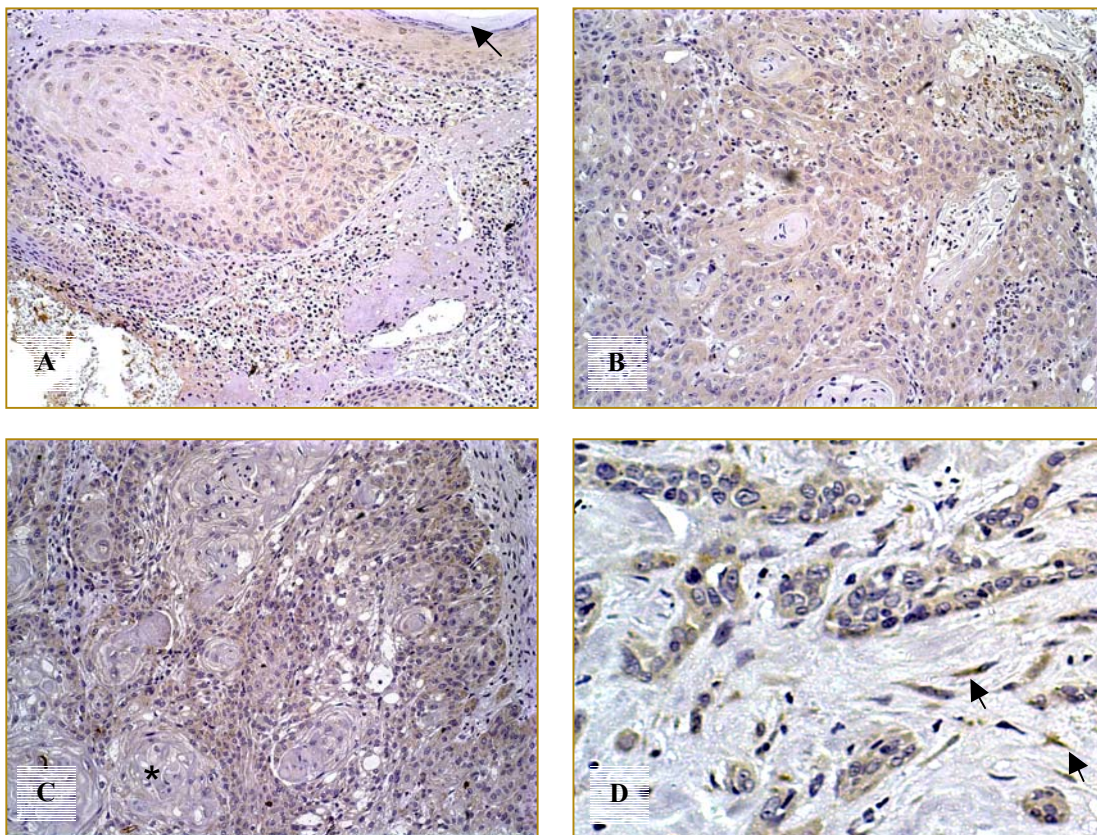


Figura 4- Expressão de TIMP-2 - No epitélio não neoplásico adjacente à lesão, a expressão só não foi observada nos queratinócitos da camada pavimentosa / queratinizada (seta, A). Nas demais camadas, os queratinócitos apresentaram expressão citoplasmática (B). No epitélio neoplásico, a expressão foi em geral fraca ou ausente e prevalente nas células menos diferenciadas (C, asterisco). Em D, observar a expressão em células do estroma (setas).

Artigo aceito no periódico *Intercursos* (ISSN/ISBN: 16782402) em 14 de março de 2007

Inhibition of Matrix-Metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata*, and Black Tea Aqueous Extracts

Rosy Iára M. A. Ribeiro, M. S. - Federal University of Minas Gerais, Brazil

Juliana S. Kuribayashi, Student – Immunology Institute, University of São Paulo

Paulo C. Borges Júnior, M.S. - Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology,
Federal University of Uberlândia, Brazil

Marcelo Emílio Beletti, PhD; Institute of Biomedical Sciences, Federal University of
Uberlândia, Brazil

Foued S. Espindola, Ph.D. – Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology -
Federal University of Uberlândia, Brazil.

Geovanni Dantas Cassali, Ph.D.; Institute of Biological Sciences – federal University of
Minas Gerais, Brazil.

Adriano M. Loyola, Ph.D. – Laboratory of Pathology - Federal University of
Uberlândia, Brazil.

Corresponding author: Dr. Adriano Mota Loyola

Laboratório de Patologia

Universidade Federal de Uberlândia

Av. Pará, 1720, bloco HC

CEP – 38405-900 – Uberlândia (MG), BRAZIL

Tel: 55 34 32182703 / fax: 55 34 32182263

e-mail: motaadriano@yahoo.com.br

Research supported by FAPEMIG and CNPq.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases may exert important roles in both physiologic and pathologic extracellular matrix remodeling. They have been implicated in tumoral progression of many human malignancies interfering on angiogenic, invasive and metastatic events. Products obtained from the some plants have been consistently associated to anti-neoplastic roles, possibly by reproducing the neutralizing activity of tissue inhibitors over MMPs. In the present work, we investigate the inhibition of the MMP-2 and -9 gelatinolytic activity by *Aloe vera*, black tea, and *Annona muricata* aqueous extracts (AE) diluted in activation buffer (AB, with calcium). The proteolytic activity of MMP was evaluated on zymographic assays. To evaluate the inhibitory effect of the tested products, gels were sectioned and incubated in the solutions containing the AB and AE from three serial dilutions. Indirect association was observed between the dilution of *A. vera* and black tea and MMP-2 activity inhibition. *A. muricata* exerted only small inhibition on MMP-2 effect in the two smallest dilutions. The MMP-9 activity was consistently neutralized by all of the natural solutions in a dose-dependent way. The present results suggest that the antitumoral effects verified for *A. vera*, *A. muricata*, and black tea AE may be partially explained by their inhibitory activity on MMP.

Keywords: Matrix metalloproteinases; *Aloe vera*; *Annona muricata*; Black tea; Plants, Inhibition

INTRODUCTION

The term matrix-metalloproteinases (MMP) describes a family of at least 20 enzymes, which are able to degrade extracellular matrix (ECM) constituents. MMP may exert important roles in both physiologic and pathologic ECM remodeling [1]. MMP-2 and MMP-9 are synthesized and secreted into the ECM by many cells (e. g. keratinocytes, monocytes, macrophages, fibroblasts, as well as many neoplastic cells) [2]. They are especially able to degrade type IV collagen, the main constituent of the basal membranes (BM). In this process, reveal molecules with varied functions, for instance growth and migration factors, for which it has been attributed important roles in carcinogenesis [3]. Thus, MMP have been consistently implicated in tumoral progression of many human malignancies, such as colonic, esophageal, breast, head and neck, and lung carcinomas [4,5], interfering on angiogenic, invasive, and metastatic events [6, 7]. Tissue inhibitors of MMP (TIMP) are the main counterparts of MMP.

TIMP are also known to exert roles in embryogenesis, carcinogenesis, and inflammation. In this context, the balance between MMP and TIMP activities may be critical in the determining EMC remodeling or degradation, in normal and pathological conditions [8, 9].

Many natural products have been tested against carcinogenesis [10, 11]. Plants from the gender Aloe, such as the aloe vera (*Aloe vera*), are examples studied for its anti-tumoral effects [12, 13]. Annona plants (e. g. *Annona muricata*, known in Brazil as “graviola”) presents annonaceous acetogenins on its constitution, and this substances

depict welldefined anti-neoplastic properties [14]. Similar capacity has been identified in *Camellia sinensis*, a polyphenol-rich vegetable from which is obtained the green and black teas, largely consumed in Brazil. Investigations have been shown that both infusions significantly reduce the relative risk for many cancers [15, 16]. Among polyphenols, the catechins exert chemoprotective effects against tumoral initiation, promotion and progression [17]. Epidemiologic studies have demonstrated that frequent ingestion of green-tea was significantly associated with lower risk for prostatic carcinoma development [18]. Experiments with rodents have been shown that substances present in *C. sinensis* inhibit tumoral growth and invasiveness [19, 20]. This effect was attributed to a neutralizing activity over the MMP secreted by neoplastic cells [21].

In this way, some natural products have been consistently associated to anti-tumoral effects, possibly by reproducing TIMP functions. These findings reinforce the necessity of further studies to clarify how vegetable extracts may actuate on different physiologic and pathologic contexts. In the present work, we investigate the inhibition of the MMP2 and -9 gelatinolytic activity by *Aloe vera*, black tea, and *Annona muricata* aqueous extracts.

2. MATERIAL AND METHODS

Lyophilized extract production

Infusions were firstly produced with deionized water, added to the following volumes: fresh leaves of *Aloe vera* (1:50), dry leaves of *Annona muricata* (1:5), and black tea (1:10, obtained from Leão Ltda, Curitiba, Brazil). The solutions were clarified

by filtration and then lyophilized by evaporation under reduced pressure. In sequence, the extracts were diluted (1mg/mL) in activation buffer (50mM Tris HCl, 6mM CaCl₂).

Metalloproteinase assays

The proteolytic activity of MMP was evaluated on zymographic assays by mini-gel electrophoresis (polyacrylamide 8%, gelatin 0.1%). Electrophoresis (BioRad Protean II, Hercules, USA) was running under reducing conditions (0.025M TRIS, 0.192 M glycine, and 0.1% SDS, pH 8.5) at constant 100V for 150min, at 4°C. Thereafter, the gels were washed twice for 30min in 2.5% Triton X-100 (v/v) to remove the SDS and then incubated overnight at 37°C. Each well was loaded with 0.1µg/mL of either MMP- 2 or -9 (Oncogene Research Products, San Diego, USA, references PF023 and PF024, respectively), according to manufacturer instructions. Proteolytic activity of MMP were stimulated by gel incubation in the activation buffer, at 37°C, for 12 hours.

To evaluate the inhibitory effect of the tested products, gels were sectioned and incubated in the solutions containing the activation buffer and the aqueous extract. Three serial dilutions (dilution factor of 2) were performed in the same conditions. The gels were subsequently stained (0.25% Coomassie blue G-250, 30% ethanol, and 10% acetic acid, for 1h, under slow rotation) and bleached (30% ethanol, 10% acetic acid, for 2h).

Zymographic evaluation

Grayscale digital images were obtained from the gels (Scanjet 8200, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA). Threshold segmentation of the bands were firstly performed, followed by the calculation of pixel mean and variation coefficient values for each band, with a local-developed specific computing routine [22].

3. RESULTS

Clear bands in a dark background were seen in the mini-gels after enzymatic activation, representing the gelatinolytic activity of MMP-2 and -9 (Figure 1). MMP inhibition was evaluated by comparative analyses of the non-digested gel substrate between experimental and control bands. Direct association was observed between the dilution of *Aloe vera* and black tea aqueous extracts and MMP-2 activity inhibition. *Annona muricata* exerted only small inhibition on MMP-2 effect in the two smallest dilutions. The MMP-9 activity was consistently neutralized by all of the natural solutions in a dose-dependent way.

4. DISCUSSION

Many species of medicinal plants have been used as alternative therapies for many types of cancer [11]. The mechanisms involved are widely unknown. In this way, there is an eminent necessity of novel investigations related to the effects of these phytotherapies on the different stages of carcinogenesis and tumoral progression. In the present paper, we report the inhibitory activity of *Aloe vera*, *Annona muricata*, and black tea on the gelatinolytic activity of MMP-2 and -9. We observed that all of the aqueous extracts obtained from these products were able to inhibit the MMP activity. *Aloe vera* was associated with the highest level of neutralizing effect, followed by the black tea, and *Annona muricata*. The activity of MMP were asserted by the observation of clear bands on a dark background, and the size of the bands were inversely proportional to the inhibitory activity, and directly associated to the dilutions performed in all but *Annona muricata* extract test for MMP-2 (Figure 1).

Zymographic evaluation has been proposed with pre-incubation of the tested enzymes with their neutralizers [23, 24]. In the present work, we incubated the aqueous extracts in the gels after running the MMP. This method apparently did not interfere with the results, since the MMP inhibition was reproduced with the different test dilutions, as expressed by a dose-response curve. Attempts to comparatively evaluate the efficiency of the enzymatic inhibition by the tested extracts must be cautioned observed. Plants with varied chemical and structural characteristics, depicting active principles that are not entirely known, were studied. In this sense, different weights were used to obtain the lyophilized extract, and this is acknowledge to interfere on the dilution of the active(s) principle(s).

Catechins are polyphenols present in *Camelia sinensis*. It is well established in the literature that these substances are able to inhibit the gelatinolytic activity of MMPs. Moreover, they actuate as antioxidants and impair cellular growth, morphogenesis, and tumoral promotion. In the green tea, the epigallocatechin-3-gallate (EGCg) is the catechins with the highest neutralizing effect on MMP. This action is possible by irreversible complexation with MMP-2 [23]. In black tea production, there is a notable reduction on the polyphenol concentration due to fermentative reactions. Notwithstanding this fact, the black tea was presently able to strongly inhibit MMP. This finding suggest that even at apparently low doses the EGCg, either isolated or associated with other catechins, is efficient on enzyme neutralization. Therefore the production of black tea did not interfere with this capacity.

Aloe vera, a plant recognized by its healing capacities, has been studied by its citotoxic effects on tumoral cells [25]. In this work, we observed that *Aloe vera* also presents a notable, dose-dependent, inhibitory activity on MMP. It may partially explain its

proposed antitumoral capacity [26]. These findings endorse the necessity for further research on the antineoplastic roles of this plant.

The *Annona muricata* extract did not inhibit the gelatinolytic activity of MMP-2. Over MMP-9, about 50% of inhibition was observed in the first dilution, following a dosedependent response, as observed for *Aloe vera* and black tea. Acetogenins present on this plant are associated with significant antitumoral effects, such as selective toxicity against many types of neoplastic cells [27, 28]. Comparative studies with doxorubicin observed 103 to 105 higher inhibition with *Annona muricata* [29, 30, 31]. Since MMP participate in the neoplastic fundamental process of invasion and progression, as well as we have demonstrated the inhibitory effect of this plant on MMP-9, it should be relevant to evaluate the neutralizing activity on MMP of the different acetogenins present in the *Annona muricata* extract.

In conclusion, the herein presented results suggest that the antitumoral effects verified for *Aloe vera*, *Annona muricata*, and black tea aqueous extracts may be partially explained by their inhibitory activity on MMP. This finding evokes additional studies to clarify the relationship of these plants and the underlying mechanisms of cancer development and progression, since new therapeutic approaches may appear from these investigations.

6. REFERENCES

- [1] MCCAWLEY LJ AND MATRISIAN LM. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540.
- [2] KERKELÄ E AND SAARIALHO-KERE U. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer, *Exp Dermatol.* 12: 109-125.
- [3] VISSE R AND NAGASE H. 2003. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- [4] SAMANTARAY S, SHARMA R, CHATTOPADHYAYA TK, GUPTA DS AND RALHAN R. 2004. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:37-44.
- [5] LI BH, ZHAO P, LIU SZ, YU YM, HAN M AND WEN JK. 2005. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis, *World J Gastroenterol* 11: 3046-3050.
- [6] CHANG C AND WERB Z. 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11: S37-43.
- [7] MOOK OR, FREDERIKS WM AND VAN NOORDEN CJ. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis, *Biochim Biophys Acta.* 1705: 69-89.
- [8] BREW K, DINAKARPANDIAN D AND NAGASE H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:267-283.
- [9] ZHOU HE AND NOTHNICK WB. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. 2005. *Front Biosci.* 10: 569-575.

- [10] LAMBERT JD, HONG J, YANGY G, LIAO J AND YANG CS. 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations, *Am J Clin Nutr.* 81:284S-291S.
- [11] SEO UK, LEE YJ, KIM JK, CHA BY, KIM DW, NAN KS AND KIM CH. 2005. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol.* 97: 101-106.
- [12] KIM HS, KACEW S AND LEE BM. 1999. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (Aloe barbadensis miller, Lentins edodes, Ganoderma lucidum and Coriolus versicolor), *Carcinogenesis.* 20:1637-1640.
- [13] CORSI MM, BERTELLI AA, GAJA G, FULGENZI A AND FERRERO ME. 1998. The therapeutic potential of Aloe Vera in tumor-bearing rats, *Int J. Tissuie React.* 20: 115-118.
- [14] LIAW CC, CHANG FR, LIN CY, CHOU CJ, CHIU HF, WU MJ AND WU, YC . 2002. New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.* 65: 470-475.
- [15] SIDDIQUI IA, AFAQ F, ADHAMI VM, AHMAD N AND MUKHTAR H. 2004. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health, *Antioxid Redox Signal.* 6:571-582.
- [16] WU AH, YU MC, SENG CC, HANKIN J, PIKE MC. 2003. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans, *Int J Cancer.* 106: 574-579.
- [17] DEMEULE M, BROSSARD M, PAGE M, GINGRAS D AND BELIVEAU R. 2000. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins, *Biochim Biophys Acta.* 1478: 51-60.
- [18] HEILBRUN LK, NOMURA A AND STEMMERMANN GN. 1986. Black tea consumption and cancer risk: a prospective study, *Br J Cancer.* 54:677-683.

- [19] LIAO S, UMEKITA Y, GUO J, KOKONTIS JM AND HIIPAKKA RA. 1995. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate, *Cancer Lett.* 96: 239-243.
- [20] GARBISA S, SARTOR L, BIGGIN S, SALVATO B, BENELLI R AND ALBINI A. 2001. Tumor gelatinases and invasión inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate, *Cancer.* 91: 822-832.
- [21] SAZUKA M, IMAZAWA H, SHOJI Y, MITA T, HARA Y AND ISEMURA M. 1997. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins, *Biosci Biotechnol Biochem.* 61: 1504-1506.
- [22] WALDEMARIN KCA, BELETTI ME AND COSTA LF. 2004. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs, *Real-Time Imaging*, 10: 197-204.
- [23] CHENG XW, KUZUYA M, KANDA S, MAEDA K, SASAKI T, WANG, QL, TAMARA-MORI N, SHIBATA T, IGUCHI A. 2003. Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2. *Arch Biochem Biophys.* 415: 126-132.
- [24] TATE P, GOD J, BIBBR, LU Q AND LARCOM LL. 2004. Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts, *Cancer Lett.* 212:153-158.
- [25] REYNOLDS T AND DWECK A C. 1999. Aloe vera leaf gel: a review update, *J Ethnopharmacol.* 68:3-37.
- [26] PECERE T, GAZZOLA MV, MUCIGNAT C, PAROLIN C, VECCHIA FD, CAVAGGIONI A, BASSO G, DIASPRO A, SALVATO B, CARLI M AND PALU G.

2000. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors, *Cancer Res.* 60: 2800-2804.

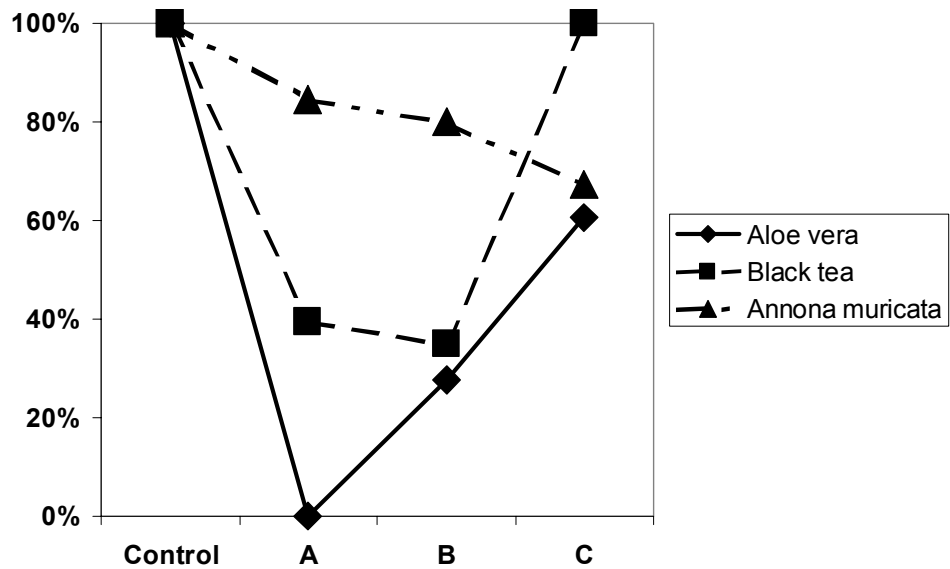
[27] CHANG FR AND WU YC. 2001. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*, *J Nat Prod.* 64: 925-931.

[28] WANG LQ, MIN BS, LI Y, NAKAMURA N, QIN GW, LI CJ AND HATORI M. 2002. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona Montana*, *Bioorg Med Chem.* 10: 561-565.

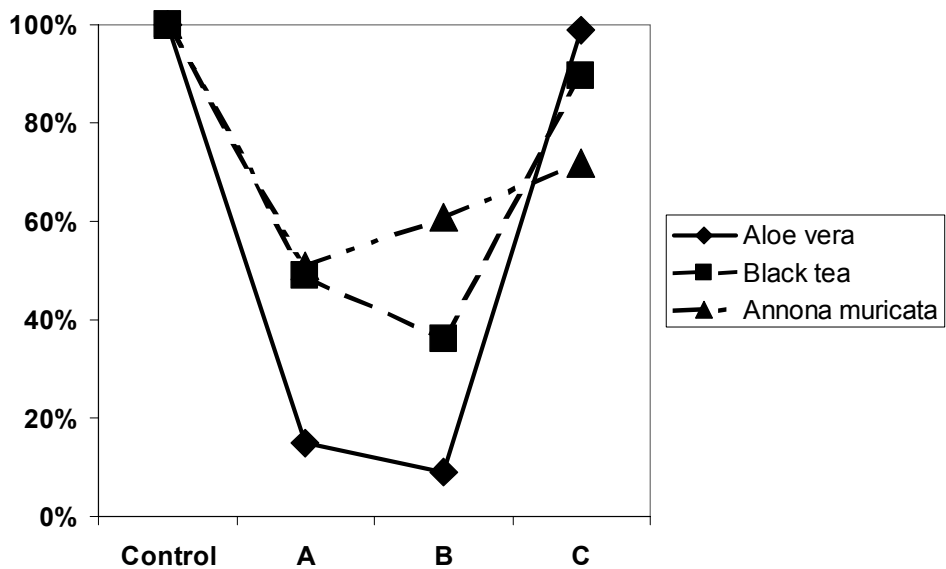
[29] WASSERMAN L, AVIGAD S, BEERY E, NORDENBERG J AND FENIG E. 2002. The effect of aloe emodin on the proliferation of a new merkel carcinoma cell line, *Am J Dermatopathol.* 24:17-22.

[30] GU ZM, FANG XP, HUI YH AND MCLAUGHLIN JL. 1994. 10-, 12-, and 29-hydroxybullatacinones: new cytotoxic Annonaceous acetogenins from *Annona bullata* Rich (Annonaceae), *Nat Toxins.* 2:49-55.

[31] KIM DH, SON JK AND WOO MH. 2001. Annomocherin, annonacin and annomontacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds, *Arch Pharm Res.* 24: 300-306.



a



b

Figure 1 – Inhibition of MMP (a- MMP-2, b- MMP-9) activity by aqueous extract of *Aloe vera*, black tea, and *Annona muricata*. The x axis represents the pixel count (%) of the bands as compared to the control . The y axis represents the dilutions of the aqueous extracts: “control” = only activation buffer, “A” = 1mg/mL, “B” = 0,5mg/mL, “C” 0,25mg/mL.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho constatou-se a presença de metaloproteinases 1 e 2 e seus respectivos inibidores teciduais TIMP-1 e -2 tanto em carcinoma basocelular (CBC) como em carcinoma espinocelular (CEC). Nas análises dos resultados da correlação entre os marcadores utilizados em amostras de CBC, verificou-se ser esta inexistente entre eles, bem como não houve associação significativa entre a expressão dos mesmos e dados clínicos e histológicos das lesões, e que, portanto, estudos adicionais são necessários para melhor compreensão da interação dessas enzimas com o comportamento biológico dessa neoplasia. Também se constatou a co-localização das MMPs e de seus inibidores nos CEC estudados, podendo-se sugerir que estas estão em equilíbrio entre si nessa lesão, o que favoreceria a explicação do padrão mais lento de crescimento tumoral dos CEC cutâneos em relação àqueles de outros sítios. Apesar da expressão semelhante, casos com marcação intensa de TIMPs foi mais freqüente nos CEC do que nos epitélios adjacentes ao tumor, indicando uma possível resposta do hospedeiro a invasão.

Os resultados dos testes zimográficos e de inibição da atividade gelatinolítica sugerem que os efeitos sobre as diversas fases da carcinogênese do chá preto, *Aloe vera* e *Annona muricata*, conforme apontado na literatura, podem ser parcialmente explicados pela atividade inibitória sobre as MMPs. Estes achados justificam a realização de estudos adicionais para elucidar a relação dessas plantas e os mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir o seguinte:

- I. A presença de MMP-2 e -9 e de TIMP-1 e -2 em carcinomas basocelular e espinocelular através da técnica de imuno-histoquímica.
- II. Não houve correlação significativa entre as metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores teciduais, TIMP-1 e -2, nem associação entre a expressão dessas enzimas e os dados clínicos coletados.
- III. A co-localização de MMPs e seus inibidores nos carcinomas estudados.
- IV. Casos com marcação intensa das TIMPs foram mais freqüentes nos CEC do que nos epitélios adjacentes aos respectivos tumores.
- V. Os extratos aquosos do chá preto, *Aloe vera* e *Annona muricata* inibem a atividade gelatinolítica das gelatinases, o que foi demonstrado através da técnica de zimografia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES M.; AYRES-JR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. **BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Ed. Sociedade Civil Mamirauá / MCT / Imprensa Oficial do Estado do Pará. Belém. 323pp. 2005

ALAM, M., RATNER, D. **Cutaneous squamous cell carcinoma.** *N Engl. J. Méd,* 2001. 344:975–983

ALBINI, A.; MELCHIORI A.; SANTI, L.; LIOTTA, L. A.; BROWN, P. D.; STETLER-SEVENSON, W. G. **Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2.** *J Natl Cancer Inst,* 1991. 5 (83):775-9.

AZNAVOORIAN, S.; STRACKE, M. L.; KRUTZSCH, H.; SCHIFFMANN, E.; LIOTTA, L. A. **Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells.** *J Cell Biol,* 1990. 110(4):1427-38.

BAST, R. C.; KUFER, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI, E., editors. **Cancer Medicine.** 5th ed. Canada: c2000.

BAUER, E. A.; GORDON, J. M.; REDDICK, M. E.; EISEN, A. A. **Quantitation and immunocytochemical localization of human skin collagenase in basal cell carcinoma.** *J. Invest. Dermatol,* 1977.V. 69, n. 4, p. 363- 367.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M.C.; FREITAS, A. G. DE NETO. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo: EDART; 1976. p.239.

BHATTACHARYYA, A.; MADAL, D.; LAHIR, Y. L.; SA, G., DAS, T. **Black tea protects immunocytes from tumor-induced apoptosis by changing Bcl-2/Bax ratio.** *Cancer Lett,* 2004. 209(2):147-54.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSE, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. **Matrix metalloproteinases: a review**. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. 4: 197–25.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive metode for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem, 1976. 72: 248-254.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. **Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function**. Biochim Biophys Acta, 2000. 477:267-283.

CARDOSO, S. V. **Estudo da expressão imuno-histoquímica da metalotioneína em carcinoma epidermóide bucal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001, 105 p. (Dissertação Mestrado em Patologia).

CHANG, C.; WERB, Z. **The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis**. Trends Cell Biol. 2001, 11(11):S37-43.

CHANG, F. R.; WU, Y. C. **Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from Annona muricata**. J Nat Prod, 2001.64(7):925-31.

CHENG, X. W.; KUZUYA, M.; KANDA, S.; MAEDA, K.; SASAKI, T.; WANG, Q. L.; TAMARA-MORI, N.; SHIBATA, T.; IGUCHI, A. **Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2**. Arch Biochem Biophys, 2003. 415: 126- 132.

CHHABRA, S. K.; YANG, C. S. **Tea and prostate cancer**. Epidemiol Rev, 2001. 23(1):106-109.

CHIH, H. W.; CHIU, H. F.; TANG, K. S.; CHANG, F. R.; WU, Y. U. **Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line 2.2.15 by apoptosis induction**. Life Sci, 2001. 69(11):1321-31

CIRCOLO, A.; WELGUS, HG; PIERCE, GF; KRAMER, J.; STRUNK RC. **Differential regulation of the expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor.** *J. Biol. Chem.*, 1991. 266 (19):12283-8.

CORSI, M. M.; BERTELLI, A. A.; GAJA, G.; FULGENZI, A.; FERRERO, M. E. **The therapeutic potential of Aloe Vera in tumor-bearing rats.** *Int J. Tissue React*, 1998. 20: 115-118.

BERGERS, G; COUSSENS, LM. **Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases.** *Curr Opin Genet Dev.*, 2000. 10(1):120-7.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. **Matrix metalloproteinases in tumour invasion.** *J Pathol*, 2000. 189(3):300-8.

DECLERCK, Y. A. **Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor.** *Cancer Res*, 1991. 51 (8): 2151-7.

DEMEULE, M.; BROSSARD, M.; PAGÉ, M.; GINGRAS, D.; BÉLIVEAU, R. **Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000. 1478:51-60.

DEREN, O.; TUNCEL, A.; GENÇAGA, S.; ADANALI, G.; ERDOĞAN, B. **Disseminated squamous cell carcinoma of the skin.** *Dermatol Surg*, 2003. 29(12):1241-3

DINEHART, S. M.; POLLACK, S. V. **Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip. An analysis of twenty-seven cases.** *J Am Acad Dermatol*. 1989 Aug;21(2 Pt 1):241-8.

DZUBOW, L. M. **Metastatic basal cell carcinoma originating in the supra-parotid region.** *J Dermatol Surg Oncol*, 1986. 12 (12):1306-8.

EDWARDS, D. R.; BEAUDRY, P. P.; LAING, T. D.; KOWAL, V.; LECO, K. J.; LECO, P. A.; LIM, M. S. **The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth.** *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996. 3:S9-15. Review.

FODA, H. D.; ZUCKER, S. **Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis.** *DDT*, 2001. 6. 9. 478-482.

FOLGUERAS, A. R. **Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies.** *Int. J. Dev. Biol*, 2004. 48: 411-424.

FUNADA, Y.; NISHIMURA, Y.; YOKOYAMA M. **Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in Klotho mice.** *Kobe J Med Sci*, 2004. 50(3-4):59-67

FUNDYLER, O.; KHANNA, M.; SMOLLER, B. R. **Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas.** *Modern Pathology*, 2004. 17: 496-502.

FREI, B.; HIGDON, J. V. **Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies.** *J Nutr*, 2003.133(10):3275S-84S.

GARBISA, S.; SARTOR, L.; BIGGIN, S.; SALVATO, B.; BENELLI, R.; ALBINI, A. **Tumor gelatinases and invasión inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate.** *Cancer*. 91 (2001) 822-832.

GOLDBERG, G. I.; STRONGIN, A.; COLLIER, I. E.; GENRICH, L. T.; MARMER B. L. **Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin.** *J Biol Chem*, 1992. 267(7):4583-91.

GOMEZ, D. E. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** *Eur J Cell Biol*, 1997. 74 (2):111-22.

GU, Z. M.; GANG, X. P.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. **10-, 12-, and 29-hydroxybullatacinones: new cytotoxic Annonaceous acetogenins from *Annona bullata* Rich (Annonaceae)**. *Nat Toxins*, 1994. 2(2):49-55.

GUTTMAN, D.; TEM, Y.; SHPITZER, T.; ULANOVSKI, D.; DRUZD, T.; FEINMESSER, R. **Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue**. *Oral Oncol*, 2004. 40(8):798-803.

HAKIM, I. A.; HARRIS, R. B.; BROWN, S.; CHOW, H. H.; WISEMAN, S.; AGARWAL, S.; TALBOT, W. **Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study**. *J Nutr*. 2003 Oct;133(10):3303S-3309S.

HAYAKAWA, T., YAMASHITA, K., TANZAWA, K., UCHIJIMA, E., and IWATA, K. **Growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum**. *FEBS Lett*, 1992. 298: 29–32.

HEILBRUN, L. K.; NOMURA, A.; STEMMERMANN, G.N. **Black tea consumption and cancer risk: a prospective study**. *Br J Cancer*, 1986. 54:677-683.

HELLIWELL, T. R. **Molecular markeres of metastasis in squamous carcinomas**. *J. Pathol*, 2001. 194: 289-93.

HONG, J. H.; TSAI, C. S.; WANG, C. C.; LAI, C. H.; CHEN, W. C.; LEE, S. P.; CHANG, T. C.; TSENG, C. J. **Comparison of clinical behaviors and responses to radiation between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas of the cervix**. *Chang Gung Med J*, 2000. 23(7):396-404.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z. M.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J.L. **Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*,**

showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, **PACA-2**. *J Nat Prod*, 1997. 60(6):581-6.

HOWARD, E. W.; BULLEN, E. C.; BANDA, M. J. **Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2**. *J. Biol. Chem*, 1991. 266 (20):13070-5.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas de incidência de câncer no Brasil em 2006**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>> Acesso em: 03 dez. 2006.

JINGA, D. C.; BLIDARU, A.; CONDREA, I.; ARDELEANU, C.; DRAGOMIR, C.; SZEGLI, G.; STEFANESCU, M.; MATAACHE, C. **MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors**. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(2):499- 510.

JOHNSON, T. M.; ROWE, D. E.; NELSON, B. R.; SWANSON, N. A. **Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa)**. *J. Am Acad Dermatol*, 1992. 26(3 Pt 2):467-84.

KARAMERIS, A.; PANAGOU, P.; TSILALIS, T.; BOUROS D. **Association of expression of metalloproteinases and their inhibitors with the metastatic potential of squamous-cell lung carcinomas. A molecular and immunohistochemical study**. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 156(6):1930-6.

KARELINA, T. V. **Localization of 92-kDa type IV collagenase in human skin tumors: comparison with normal human fetal and adult skin**. *J. Invest. Dermatol*, 1993.100 (2): 159-65.

KAWAMATA, H.; UCHIDA, D.; HAMANO, H.; KIMURA-YANAGAWA, T.; NAKASHIRO, K. I.; HINO, S.; OMOTERARA, F.; YOSHIDA, H.; SATO, M. **A Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis**. *Int J Oncol.*, 1998. 13(4):699-704.

KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. **Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer.** *Exp Dermatol*, 2003; 12: 109–125.

KLEINER, D. E. JR.; STETLER-STEVENSON, W. G. **Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases.** *Curr Opin Cell Biol*, 1993. 5(5):891-7. Review.

KIM, G. S.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; SASTRODIHARDJO, S. **Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*.** *J Nat Prod*, 1998. 61(4):432-6.

KIM, H. S.; KACEW, S.; LEE, B. M. ***In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* miller, *Lentins edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*).** *Carcinogenesis*, 1999. 20:1637-1640.

KIM, D. H.; SON, J. K.; WOO, M. H. **Annomocherin, annonacin and anomontacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds,** *Arch Pharm Res*. 24 (2001) 300-306.

KOBAYASHI, T.; ONODA, N.; TAKAGI, T.; HORI, H.; HATTORI, S.; NAGAI, Y.; TAJIMA, S.; NISHIKAWA, T. **Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors.** *Arch Dermatol Res*, 1996. 288(5-6):239-44.

KOSSARD S. et al. *Basal cell carcinoma.* In LE BOIT, P.; BURG, G.; WEEDON, D.; SARASIN A (Eds.). *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of Skin Tumors.* IARC Press: Lyon,. p. 13-19, 2006.

KURCHAT, P.; WICHENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. **Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography.** *J Pathol*, 2002. 197(2):179-87.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANGY, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. **Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations.** Am J Clin Nutr, 2005.81:284S-291S.

LENGYEL, E., SCHMALFELDT, B.; KONIK, E.; SPATHE, K.; HARTING, K.; FENN, A.; BERGER, U.; FRIDMAN, R.; SCHIMITT, M.; PRECHTEL, D.; KUHN, W. **Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer.** Gynecol Oncol, 2001. 82(2):291-8.

LEVER, D. E.; ELENITSAS, R.; JAWORSKY, C.; LIPPINCOTT J. R. **Histopathology of the skin.** 8. ed. Raven, 1998. 1073 p.

LEUNG, M. Y.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. **Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from Aloe vera L. var. chinensis (Haw.) Berg.** Glycobiology, 2004. 14(6):501-10.

LI, B. H.; ZHAO, P.; LIU, S. Z.; YU, Y. M.; HAN, M.; WEN, J. K. **Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis.** World J Gastroenterol, 2005. 11: 3046-3050.

LIAO S, UMEKITA Y, GUO J, KOKONTIS JM AND HIIPAKKA RA. **Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate.** Cancer Lett, 1995. 96: 239-243.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. F.; WU, Y. C. **New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*,** J. Nat. Prod, 2002. 65: 470-475.

LIOKUMOVICH, P.; GOLDBERG, I.; DAVIDSON, B.; GOTLIEB, W. H.; ZAHAVI, T.; BEN-BARUCH, G.; REDER, I.; KOPOLOVIC, J. **Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis.** J. Clin. Pathol, 1999. 52:198-202.

LIOTTA, L.A.; MANDLER, R.; MURANO, G.; KATZ, D.A.; GORDON, R.K.; CHIANG, P.K.; SCHIFFMANN, E. **Tumor cell autocrine motility factor**. Proc Natl Acad Sci USA, 1986. 83(10):3302-6.

LIOTTA L. A.; KOHN E. C. **The microenvironment of the tumor-host interface**. Nature (Lond.), 2001. 411: 375-379.

LUKASHEV, M. E.; WERB Z. **ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour**. Trends Cell Biol, 1998. 8:437-441.

MCCAULEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. **Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!** Current Opinion in Cell Biology, 2000. 13:534-540.

MACKIE, R. M. **Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation**. Prog Biophys Mol Biol, 2006. 92(1):92-6.

MATRISIAN, L. M. **The matrix-degrading metalloproteinases**. Bioessays, 1992. 14(7):455-63. Review.

MONHIAN, N. **Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients**. Arch Facial Plast Surg, 2005. 7 (4): 238-43.

MOOK, O. R.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. **The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis**. Biochim Biophys Acta, 2004. 1705: 69-89.

MURPHY, A. N. **Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation**. J. Cell. Physiol, 1993. 157 (2): 351-8.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. JR.; **Matrix metalloproteinases**. J. Biol. Chem, 1999. 274 (31): 21491-4.

NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; FUJIMOTO, N.; OKADA, Y. **Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix.** *J Neurooncol*, 1996. 28(1):13-24.

NAKOPOULOU, L. **Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis.** *J. Pathol*, 2002. 197 (3): 307-13.

NAVAZESH, M. **Methods for collecting saliva.** *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 694:72-7.

NELSON, K. L.; RANGANATHAN, A. C.; MANSOURI, J.; RODRIGUEZ, A. M.; PROVIDENCE, K. M.; RUTTER, J. L.; PUMIGLIA, K.; BENNETT, J. A.; MELENDEZ, J. A. **Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis.** *Clin Cancer Res.*, 2003. 9(1):424-32.

NEVES, R. G.; LUPI O ; TALHARI, S. **Câncer da Pele.** 1. ed. Rio de janeiro: Editora MEDSI, 2001. v. 1. 702 p.

OBERLIES, N. H.; CROY, V. L.; HARRISON, M. L.; MCLAUGHLIN, J. L. **The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells.** *Cancer Lett*, 1997. 115(1):73-9.

PAPATHOMA, A. S.; PETRAKI, C.; GRIGORAKIS, A.; PAPAKONSTANTINO, H.; KARAVANA, V.; STEFANAKIS, F.; SOTSIU, F.; PINTZAS, A. **Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer.** *Anticancer Res*, 2000 20(3B):2009-13.

PATTERSON, B. C.; SANG, Q. X. **Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/Types IV Collagenase (MMP-9).** *J Biol Chem*, 1997. 272: 28823-5.

PECERE, T.; GAZZOLA, M. V.; MUCIGNAT, C.; PAROLIN, C.; VECCHIA, F. D.;

CAVAGGIONI, A.; BASSO, G.; DIASPRO, A.; SALVATO, B.; CARLI M.; PALU, G. **Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors.** *Cancer Res*, 2000. 60: 2800-2804.

PIRELI, S. A. **Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods.** *J Pathol*, 1997. 183:116-123.

POULSOM, R. **Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin.** *J. Clin. Pathol*, 1993. 46 (5): 429-36.

PUCCI-MINAFRA, I.; MINAFRA, S.; LA ROCCA, G.; BARRANCA, M.; FONTANA, S.; ALAIMO, G.; OKADA, Y. **Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis.** *Matrix Biol*, 2000. 20:419-427.

PYKE, C. **Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization.** *Cancer Res.*, 1992.v.52, n. 5, p. 1336-41.

QUAEDVLIEG, P. J. F.; CREYTENS, D. H. K. V. ; EPPING, G. G.; PEUTZ-KOOTSTRA, C. J.; NIEMAN, F. H. M., THISSEN, M. R. T. M., KREKELS, G. A. **Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips.** *Histopathology*. 2006, 49(3): 256–264.

RAITIO, A. **Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers.** *Arch. Dermatol. Res*, 2005. 297 (6):. 242-8.

REE, A. H.; FLORENES, VA; BERQ JP; MAELANDSMO, GM; NESLAND, JM; FODSTAD, O. **High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases.** *Clin. Cancer Res*, 1997. 3 (9):1623-8.

REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. ***Aloe vera* leaf gel: a review update.** J Ethnopharmacol, 1999. 68:3-37.

SAFAI, B.; GOOD, R. A. **Basal cell carcinoma with metastasis. Review of literature.** Arch Pathol Lab Med, 1977. 101(6):327-31.

SAMANTARAY, S.; SHARMA, R.; CHATTOPADHYAYA, T. K.; GUPTA, D. S. ; RALHAN, R. **Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma.** J Cancer Res Clin Oncol, 2004. 130:37-44.

SAMPAIO, I. B. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 1^a Edição. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. p. 12-13.

SAZUKA, M.; IMAZAWA, H.; SHOJI, Y.; MITA, T.; HARA, Y.; ISEMURA, M. **Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins.** Biosci Biotechnol Biochem, 1997. 61:1504-1506.

SCANLON, E. F.; VOLKMER, D. F.; OVIEDO, M. A.; KHANDEKAR, J. D.; VICTOR, T. A. **Metastatic basal cell carcinoma.** J Surg Oncol, 1980. 15: 171-80.

SCHWARTZ, R. A.; BURGESS, G. H.; MILGROM, H. **Breast carcinoma and basal cell epithelioma after x-ray therapy for hirsutism.** Cancer, 1979. 44(5):1601-5.

SEO, U. K.; LEE, Y. J.; KIM, J. K.; CHA, B. Y.; KIM, D. W.; NAM, K. S.; KIM, C. H. **Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9.** J Ethnopharmacol, 2005. 97(1): 101-106.

SIDDIQUI, I. A.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. **Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health.** Antioxid Redox Signal, 2004. 6: 571-582.

SHIMPO, K.; IDA, C.; CHIHARA, T.; BEPPU, H.; KANEKO, T.; KUZUYA, H. **Aloe arborescens extract inhibits TPA-induced ear oedema, putrescine increase and tumour promotion in mouse skin.** *Phytother Res*, 2002.16(5):491-3.

SOARES, F. A., CUNHA, I. W., GUIMARÃES, G. C., NONOGAKI, S., CAMPOS, R. S. M., LOPES, A. **The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis.** *Virchows Arch*, 2006. 449:637–646.

SCHROHL, A. S. **Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer.** *Mol. Cell Proteomics*. 2003. 2 (3): 164-72.

SCHROHL, A. S. **Tumor Tissue Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 as a Prognostic Marker in Primary Breast Cancer.** *Clin. Cancer Res*. 2004.10: 2289-2298.

STAMENKOVIC, I. **Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *Semin Cancer Biol*, 2000. 10(6):415-33.

STETLER-STEVENSON, W. G.; BROWN, P. D.; ONISTO, M.; LEVY, A. T.; LIOTTA, L. A. **Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *FASEB J.*, 1993. 7(15):1434-41.

SUTINEN, M.; KAINULAINEN, T.; HURSKAINEN, T.; VESTERLUND, E.; ALEXANDER, J. P.; OVERALL, C. M.; SORSA, T.; SALO, T. **Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis.** *Br. J. Cancer*, 1998. 77(12):2239-45

TATE, P.; GOD, J.; BIBB, R.; LU, Q.; LARCOM, L. L. **Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts,** *Cancer Lett*, 2004. 212:153-158.

TSUKIFUGI, R.; TAGAWA, K.; HATAMOUCHI, A.; SHINKAI, H. **Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis.** Br. J. Cancer, 1999. 80(7):1087-91

VALENTE, P.; FASSINA, G.; MELCHIORI, A.; MASIELLO, L.; CILLI, M.; VACCA, A.; ONISTO, M.; SANTI, L.; STETLER-STEVENSON, W. G.; ALBINI, A. **TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis.** Int. J. Cancer, 1998.75: 246–253.

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

VARANI, J. **Interaction of tumor cells with the extracellular matrix.** Revis Biol Celular, 1987. 12:1–113.

VISSE, R.; NAGASE H. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** Circulation Research, 2003. 92:827-839.

VON DOMARUS, H.; STEVENS, P. J. **Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature.** J Am Acad Dermatol, 1984. 10(6):1043-60.

WAGNER, N. S. **Differential Expression of tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 by Cutaneous Squamous and Basal Cell Carcinomas.** *J. Invest. Dermatol*, 1996. 106: 321-326.

WALDEMARIN, K. C. A.; BELETTI, M. E., COSTA, L. F. **Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs.** Real-Time Imaging, 2004. 10: 197-204.

WANG, L. Q.; MIN, B. S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G. W.; LI, C. J.; HATTORI, M. **Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana***. *Bioorg Med Chem*, 2002. 10(3):561-5.

WASSERMAN, L.; AVIGAD, S.; BEERY, E.; NORDENBERG, J.; FENIG, E. **The effect of aloe emodin on the proliferation of a new merkel carcinoma cell line**. *Am J Dermatopathol*, 2002. 24: 17-22.

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

WOESSNER, J. F Jr. **MMPs and TIMPs--an historical perspective**. *Mol Biotechnol*. 2002. 22(1):33-49. Review

WOESSNER, J. F., NAGASE, H. **Matrix Metalloproteinases and TIMPs**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.

WU, A. H.; YU, M. C.; SENG, C. C.; HANKIN, J.; PIKE, M. C. **Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans**. *Int J Cancer*, 2003. 106: 574-579.

XU, Y. P.; ZHAO, X. Q.; SOMMER, K.; MOUBAYED, P. **Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis**. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003. 4(4):491-501

YOSHIZAKI, T.; MARUYAMA, Y.; SATO, H.; FURUKAWA, M. **Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma**. *Int J Cancer*. 2001 Jan 20;95(1):44-50.

YU, W.; STAMENKOVIC, I. **Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis**. *Genes Dev*, 2000. 15;14(2):163-76.

YUAN, S. S.; CHANG, H. L.; CHEN, H. W.; YEH, Y. T.; KAO, Y. H.; LIN, K. H.; WU, Y. C.; SU, J. H. **Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway.** Life Sci, 2003. 72(25):2853-61.

YUCEL, T.; MUTNAL, A.; FAY, K.; FLIGIEL, S. E.; WANG, T.; JOHNSON, T.; BAKER, S. R.; VARANI, J. **Matrix metalloproteinase expression in basal cell carcinoma: relationship between enzyme profile and collagen fragmentation pattern.** Exp Mol Pathol, 2005. 79(2):151-60.

ZHANQ, S.; LI, L.; LIN, J. Y.; 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. 9(5):899-904.

ZHOU, H. E.; NOTHNICK, W. B. **The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis.** Front Biosci, 2005. 10: 569-575.

Anexo 1 – Documento comprobatório da aprovação do Comitê Institucional de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Número do protocolo – 100/02)

Universidade Federal de Uberlândia
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 11 de novembro de 2002.

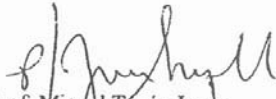
Processo nº 100/2002 - Final

PROJETO DE PESQUISA: *“Estudo da Relação da Metalproteinase 2 e 9 no carcinoma de células Basais de cabeça e pescoço e seus respectivos inibidores teciduais (TIMPS) e sua inibição por catequinas presentes no chá preto”.*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Adriano Mota Loyola

PARECER:

O projeto acima identificado, foi aprovado para ser realizado, conforme os autores se comprometem. Solicita-se que a coleta do TCLE não seja feita “momentos antes” da cirurgia, mas com certa antecedência (p.ex. em consultas antes da cirurgia).


Prof. Miguel Tanús Jorge
Coordenador do CEP/UFU

Anexo 2 - TERMOS DE CONSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Odontologia

Área de Patologia Buço-Maxilo-Facial

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

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

Projeto de Pesquisa: “Estudo das relações das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 no carcinoma de células basais de cabeça e pescoço e seus respectivos inibidores teciduais (TIMPs) e sua inibição por extratos vegetais

Coordenador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Responsável: Profa. Rosy Iara Maciel A Ribeiro

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,

concordo em participar desta pesquisa científica como voluntário. Estou ciente de que me submeterei a um procedimento de retirada de lesão de pele durante o qual será coletado um fragmento de pele que se destinará aos procedimentos do projeto de pesquisa de lesões actínicas. Tenho conhecimento pleno de que as intervenções cirúrgicas serão realizadas em ambiente ambulatorial (HC-UFU), sob os cuidados do profissional de saúde responsável, e que terei acesso aos resultados provenientes do exame de material colhido. Estou ciente que a minha identidade será preservada e que se eu recusar em participar, não terei prejuízos em relação ao meu tratamento.

Outrossim, não receberei benefícios financeiros em participar desta pesquisa e, desde já, autorizo a utilização dos dados coletados para o seu desenvolvimento e publicação.

Voluntário: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Odontologia

Área de Patologia Buço-Maxilo-Facial

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

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

Projeto de Pesquisa: “Estudo das relações das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 no carcinoma de células basais de cabeça e pescoço e seus respectivos inibidores teciduais (TIMPs) e sua inibição por extratos vegetais.

Coordenador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Responsável: Profa. Rosy Iara Maciel A Ribeiro

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,

concordo em participar desta pesquisa científica como voluntário. Estou ciente de que me submeterei a um procedimento de cirurgia plástica durante o qual será coletado um fragmento de pele que se destinará ao controle do projeto de pesquisa de lesões actínicas. Tenho conhecimento pleno de que as intervenções cirúrgicas serão realizadas em ambiente hospitalar (HC-UFU), sob os cuidados do profissional de saúde responsável, e que terei acesso aos resultados provenientes do exame de material colhido. Estou ciente que a minha identidade será preservada e que se eu recusar em participar, não terei prejuízos em relação ao meu tratamento. Outrossim, não receberei benefícios financeiros em participar desta pesquisa e, desde já, autorizo a utilização dos dados coletados para o seu desenvolvimento e publicação.

Voluntário: _____

Anexo 3 –

Tabela 1 – Dados clínico-patológicos compilados dos prontuários de pacientes com carcinoma basocelular

Caso	tipo	Local	Maior dimensão		Sexo	Dt/nasc	Idade
			(cm)				
01.5920b	Sólido	MS	1,5		F	24/9/1934	69
01 5676	Sólido	NI*	1,2		M	26/10/1932	71
01.6129a	SU	Face	1		F	16/10/1940	63
01.5956a	SU	Face	0,5		M	26/10/1932	71
01.6130a	Sólido	Tórax	0,6		F	21/12/1953	50
01.6130c	SA	Tórax	0,6		F	21/12/1953	50
01.6133a	Bifocal, sólido	Tórax	0,6		M	16/2/1967	36
01.6414b	Ulcerado	Face	0,7		M	24/4/1949	54
01.6414c	Sólido	Face	0,6		M	24/4/1949	54
01.6415a	Sólido	MS	1,4		M	18/5/1943	60
01.6416a	Sólido	MS	1,0		F	27/11/1925	78
02.0476a	SU	Face	1,5		F	24/6/1943	60
02 0878A	Sólido	Face	1,0		M	08/12/1924	79
02.0879b	Sólido	NI*	1,8		M	6/11/1939	64
02 0879 B	Sólido	NI*	1,8		M	6/11/1939	64
02 1378A	Sólido	NI*	2,5		M	5/1/1935	68
02.2069a	SU	Face	0,8		M	25/12/1955	48
02.2111a	SA	MS	2,0		M	3/3/1928	75
02.3820a	Sólido	Face	1,2		M	25/1/1935	68
02.4693a	Sólido	Face	0,6		M	11/10/1936	67
02.4965a	SU	Face	0,8		F	1/3/1942	61
02.6182a	SU	Face	1,8		F	NI	NI
02.7305a	SU	Tronco	0,7		F	26/3/1949	54
03.1010	Sólido	NI*	1,5		M	22/7/1936	67
03.2759a	SU	Face	3,0		M	23/6/1934	69
03.2890a	Sólido,	Tronco	0,8		F	28/8/1928	75
03.2892a	Adenóide	Cabeça	0,7		M	11/6/1939	64
03.3048b	SU	Face	1,0		M	14/9/1929	74
03.3190a	Sólido	Face	1,2		M	23/12/1930	73
03.3372b	SU	MS	1,6		F	29/4/1913	90
03.3724b	SU	MS	1,0		M	22/7/1936	67

*NI- Não informado SU- Sólido Ulcerado AS – Sólido Adenóide

Anexo 4- . Dados para serem usados no estoque das lesões para procedimentos bioquímicos, quando da coleta de material (lesões, fragmentos de pele).

Ficha: _____ Prontuário _____

DADOS RELATIVOS À LESÃO

Amostra n°: _____ Data: _____

Peso do fragmento: _____ Volume do tampão H (homogeneização) _____

Volume do sobrenadante: _____

Quantidade de Proteína Total/ Concentração da amostra.

LH – Lesão homogeneizado: _____ / _____

LS – Lesão sobrenadante: _____ / _____

LP – Lesão Pellet: _____ / _____

DADOS RELATIVOS À PELE SEM LESÃO (borda):

Amostra n°: _____ Data: _____

Peso do fragmento: _____ Volume do tampão H (homogeneização) _____

Volume do sobrenadante: _____

Quantidade de Proteína Total/ Concentração da amostra.

LH – Lesão homogeneizado: _____ / _____

LS – Lesão sobrenadante: _____ / _____

LP – Lesão Pellet: _____ / _____

Anexo 5:

Tabela 2 - Dados clínico-patológicos compilados dos prontuários de pacientes com carcinoma espinocelular.

Caso	tipo	local	Tamanho (cm)	sexo	Dt/nasc	Idade
03.4598	BD U	Face	1,3	F	14/8/1930	74
03.1406	MD	Tronco	NI	F	NI	NI
00.0954	MD	Tronco	2,5	M	15/10/1944	60
01.1371	MD	Cabeça	1,0	M	24/8/1927	77
01.6292	BD	Cabeça	0,9	M	NI	NI
02.5532	MD	Tronco	0,7	F	23/1/1923	81
03.0339	BD	Tronco	1,3	M	8/8/1955	49
03.0422	BD	Tronco	2,4	M	19/1/1936	68
03.0578x	BD	Face	NI	M	NI	NI
03.0764	BD	Face	5,0	M	14/8/1948	56
03.0993	MD	Face	0,6	M	10/7/1922	82
03.1380	MD U	Tronco	3,1	M	8/8/1955	49
03.1580	BD	Tronco	0,6	M	7/4/1953	51
03.1925	MD	Face	0,5	F	15/4/1933	71
03.2386	MD U	Face	2,0	M	19/4/1929	75
03.2549	BD U	face	0,8	M	18/5/1920	84
03.2552	BD	Face	0,9	F	20/8/1941	63
03.2645	BD U	Tronco	2,3	M	6/11/1919	85
03.3257	BD	Face	2,0	M	24/2/1944	60
03.3264	BD	pele	1,8	M	9/5/1916	88
03.3375x	BD	pele	NI	M	NI	NI
03.3385x	BD	pele	NI	M	NI	NI
03.4131	BD U	Tronco	3,5	M	25/8/1953	51
03.4210	I	Face	NI	F	26/5/1933	71
03.4277x	BD	pele	NI	M	NI	NI
03.4289a	BD U	Face	0,5	M	15/4/1930	74
03.4289b	MD	Face	0,7	M	15/4/1930	74
03.4577	BD U	Face	1,5	M	5/3/1916	88
03.4578x	BD	pele	NI	M	NI	NI
03.4819	PD U,	Face	1,3	F	6/10/1976	28
03.6153	MD	face	NI	M	28/9/1936	68
03.6153	MD	Cabeça	2,3	M	28/9/1936	68
03.6458	BD U	Membro inferior	5,0	F	9/1/1947	57
03.7088	BD	pele	1,0	F	1/4/1940	64
03.7838	MD U	Face	1,4	F	28/1/1922	82
03.7841	BD U	Cabeça	2,3	F	6/7/1932	72
04.1163	MD	pele	5,0	F	6/10/1976	28
04.2896	MD U	Face	2,0	M	28/10/1924	80
04.3213	BD	Face	0,6 cm	M	6/7/1950	54
04.4043	MD Invasor	Face	2,0	M	5/3/1940	64
04.4227	BD	Tronco	0,3	M	NI	NI

BD – Bem diferenciado

MD – Moderadamente diferenciado

PD – Pouco diferenciado

I -Indiferenciado

F- Sexo feminino

M- Sexo masculino

NI- Não informado

Anexo 6- Número de campos histológicos a serem contados

Tabela 3 - Cálculo para obtenção do número ideal de campos histológicos a serem contados

	5	10	15	20	25	30	35	40	45
1	3,6	4,55	3,38	4,35	3,87	4,39	3,41	3,24	3,76
2	3,88	3,58	4,79	3,24	5,55	4,32	3,26	4,88	3,86
3	7,36	4,16	6,38	4,44	3,72	4,23	4,5	5	3,8
4	3,66	5,39	3,41	3,29	5,24	3,59	3,79	3,9	5,16
5	4,65	2,6	4,41	4,68	2,87	4,77	4,97	4,05	3,97
6	3,33	3,55	6,21	3,43	4,58	2,83	3,11	4,15	4,3
7	2,31	2,67	1,02	3,38	3,86	4,17	3,61	4,18	4,4
8	11,11	3,19	3,92	2,05	4,16	3,96	3,67	4,48	4,54
9	2,59	6,83	2,99	4,68	4,45	4,23	2,42	3,55	5,32
10	5,08	4,17	4,53	4,87	5,09	3,13	4,11	4,97	4,19
MÉDIA	4,757	4,069	4,104	3,841	4,339	3,962	3,685	4,24	4,33
DP	2,651691	1,291609	1,568893	0,902988	0,812082	0,602141	0,722653	0,597885	0,547195
CV	55,74294	31,74267	38,2284	23,5092	18,71587	15,1979	19,61067	14,10107	12,63729

Anexo 7 - Tabela 4 – Índices de positividade imuno-histoquímica para a marcação de MMPs e TIMPs em carcinomas basocelulares.

Lâmina	MMP-2 (%)	TIMP-2 (%)	MMP-9 (%)	TIMP-1 (%)
01 5676 A	71,26	62,85	83,88	87,11
01 5920 B	25,85	59,05	80,93	81,77
01 5956	62,35	66,06	75,61	88,6
01 6129 A	79,4	84,2	79,3	83,14
01 6130 C	27,7	71,9	80,8	83,73
01 6130 A	74,42	68,07	58,91	82,71
01 6133 B	0	65,2	82,86	87,25
01 6414 B	10,35	88	67,81	84,95
01 6414 C	48,5	71,35	71,94	77,39
01 6416 A	10,95	84,1	83,19	75,25
02 0476	77,58	64,26	63,21	81,49
02 0878 A	71,73	72,49	85,21	82,58
02 0879 A	12,7	84,7	87,28	88,15
02 0879 B	38,45	60,05	81,05	88,84
02 1378 A	81,35	71,65	87,24	79,5
02 2069	73,05	77,9	86,9	75,16
02 2111	2,05	78,6	77,93	84,02
02 3820 A	0	82,75	83,78	81,6
02 4693 A	11,2	66,3	80,88	76,68
02 4965 A	65,23	69,57	82,37	84,74
02 6182 A1	62	68,2	86,59	85,91
01 6415 A	68,35	60,55	82,35	78,2
02 7305 A	0	68,8	86,59	70,04
03 1010 A	58,49	52,83	72,47	83,75
03 2759	0	82,5	86,41	92,59
03 2890 A	73,85	84,9	81,52	89,44
03 2892 A	67,99	74,52	60,5	72,44
03 3048 B	61,25	81,25	76,97	81,55
03 3190 A	45,65	64,6	85,11	82,74
03 3372 B	85,3	69,7	91,18	85,71
03 3724 B	63,4	58,4	74,03	87,8
Média	46,1	71,5	79,5	82,7
Desvio Padrão	30,1	9,4	8,1	5,2

Análise estatística

	<i>R</i>	<i>p</i>
MMP-2 x TIMP-2	-0,112	0,548
MMP-2 x MMP-9	-0,041	0,826
MMP-2 x TIMP-1	-0,061	0,746
TIMP-2 x MMP-9	0,164	0,377
TIMP-2 x TIMP-1	-0,038	0,84
MMP-9 x TIMP-1	0,086	0,644

Anexo 8: Tabela 5 - – Índices de positividade imuno-histoquímica para a marcação de MMPs e TIMPs em carcinomas espinocelulares.

Lâmina	MMP-9 (%)	TIMP-1 (%)	MMP-2 (%)	TIMP-2 (%)
0.0954B	92,89	87,01	86,51	77,36
01.1371x	94,2	91,6	81,47	82,38
01.6292b	91,22	88,67	75,04	82,86
02.5532b	96,53	88,8	86,33	76,74
03.0339x	96,58	92,31	69,53	84,07
03.0422x	95,61	94,97	87,27	87,65
03.0578x	95,97	93,79	79,01	80,46
03.0764x	96,09	94,82	89,06	83,57
03.0993x	97,3	89,11	74,14	80,25
03.1380x	93,32	92,64	70,65	77,43
03.1403x	96,91	97,37	76,51	77,55
03.1580x	94,54	93,74	82,53	75,73
03.1925x	96,55	93,88	74,58	80,51
03.2386x	95,21	93,88	86,23	81,24
03.2549c	96,24	97,6	82,64	80,88
03.2552x	96,58	92,4	82,2	86,54
03.2645x	98,51	81,34	80,46	79,37
03.3257x	97,48	94,6	86,14	91,15
03.3264x	97,8	96,1	86,54	91,95
03.3375x	97,49	97,62	76,62	77,29
03.3385x	94,96	91,6	78,42	40,99
03.4131x	96,76	96,72	78,35	70,54
03.4210x	97,73	94,6	82,77	81,26
03.4277x	98,88	93,77	82,9	89,44
03.4289x	97,32	78,08	79,8	84,11
03.4289b	95,14	94,54	84,5	92,52
03.4577x	96,86	95,37	81,96	83,94
03.4578x	97,92	95,08	82,89	89,15
03.4578x	95,1	96,93	92,35	83,33
03.4819x	94,93	96,79	79,27	90,82
03.6153x	97,4	91,99	85,47	91,3
03.6153b	96,68	94,71	91,17	90,82
03.6458d	98,7	91,98	87,83	85,12
03.7088x	98,26	97,2	93,75	86,78
03.7838x	96,39	96,51	83,34	80,59
03.7841x	95,75	98,86	86,07	83,4
04.1163x	97,26	96,1	87,62	89,16
04.2896x	94,92	94,25	85,26	90,53
04.3213x	93,18	98,85	81,74	86,68
04.4043x	97,96	97,04	90,12	83,8
04.4227x	96,93	96,71	84,44	80,54
Média	96,25	93,66	82,77	82,7
desvpad	1,3	2,9	4,3	5,2

Análise estatística

	<i>R</i>	<i>p</i>
MMP-2 x TIMP-2	0,095	0,556
MMP-2 x MMP-9	0,191	0,233
MMP-2 x TIMP-1	0,229	0,15
TIMP-2 x MMP-9	0,239	0,132
TIMP-2 x TIMP-1	0,164	0,305
MMP-9 x TIMP-1	0,449	0,0032

Anexo 09 – Análise das imagens digitalizadas das bandas segmentadas dos géis (Ensaio zimográfico com MMP-2 e -9).

Tabela 6 – Inibição da atividade gelatinolítica de MMP-2 por diferentes diluições de extratos vegetais (valores apresentados em porcentagem em relação à atividade da enzima ativada, sem inibição).

Diluição do extrato	Extratos aquosos		
	Chá preto	Babosa	Graviola
1	0	39.45	84.57
1:2	27.61	34.94	79.97
1:4	60.47	120	67.41
1:8	93.23	91.60	148.15

Tabela 7 – Inibição da atividade gelatinolítica de MMP-9 por diferentes diluições de extratos vegetais (valores apresentados em porcentagem em relação à atividade da enzima ativada, sem inibição).

Diluição do extrato	Extratos aquosos		
	Chá preto	Babosa	Graviola
1	48.89	14.75	50.94
1:2	36.10	8.91	60.82
1:4	89.48	98.87	71.70
1:8	66.97	112.43	108.97

Anexo 10 – Resumos resultantes dos trabalhos desenvolvidos durante a tese e apresentados em congressos

RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I. ; LOYOLA, A. M. ; ESPINDOLA, F. S. ; CASSALI, G. D. ; CARDOSO, S. V. . Carcinoma Basocelular: Expressão das MMPs e TIMPs e sua correlação com aspectos clínicos. In: VIII Simpósio Mineiro de Oncologia, 2006, Belo Horizonte. Prática Hospitalar: "Contribuição do tratamento Sistêmico para a Cura do Câncer", 2006. v. Especi.

RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I. ; LOYOLA, A. M. ; ESPINDOLA, F. S. ; CASSALI, G. D. ; BORGES JUNIOR, P. C. ; Kuribayashi, J, S. ; BELLETTI, M. E. . AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 POR EXTRATOS AQUOSOS DE *Aloe vera*, CHÁ PRETO E *Annona muricata*. In: II Simpósio de Plantas Mediciniais e V Encontro da Rede Fitocerrado, 2005, Uberlândia. <http://www.plantasmedicinais.ufu.br/anais.html>, 2005.

RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I. ; BORGES JUNIOR, P. C. ; Kuribayashi, J, S. ; ESPINDOLA, F. S. ; LOYOLA, A. M. ; CARDOSO, S. V. ; BELETTI, M. E. . Inhibition of Matrix-metalloproteinases by *Aloe vera*, *Annona muricata* and black tea aqueous extracts. In: 4th São Paulo Research Conference - Cancer Today, from molecular to treatment, 2005, São Paulo. Applied Cancer Research supplement. São Paulo : Antonio Prudente Foundation A. CV. Camargo Cancer Hospital Treatment and Research Center, 2005. v. 2. p. 99.

RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I. ; LOYOLA, A. M. ; ESPINDOLA, F. S. ; CASSALI, G. D. ; Kuribayashi, J, S. ; BELETTI, M. E. ; BORGES JUNIOR, P. C. ; CARDOSO, S. V. . Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in basal cell carcinoma of skin and its inhibition by plant extracts. In: IV São Paulo Research Conference Cancer Today From Molecular Biology to Treatment, 2005, São Paulo. Applied Cancer Research Supplement. São Paulo : A P F A C Camargo Cancer Hospital Treatment And Research Center, 2005. v. 2. p. 83-84.

RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I.; LOYOLA, A. M.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D. ; KURIBAYASHI, J. S. ; BORGES JUNIOR, P. C. Evaluation of inhibition of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by Aloe vera, Black tea and Annona muricata aqueous extracts. In: XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular e IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, 2004, Campinas. Anais do XII Congresso de Biologia Celular - 2004 RIBEIRO, R. I. M. A. MACIEL, R.I. ; LOYOLA, A. M. ; ESPINDOLA, F. S. ; Kuribayashi, J. S. ; BORGES JUNIOR, P. C. . Inibição da atividade de gelatinases da saliva humana (Zimogramas) pelo liofilizado de chá preto (*Camellia sinensis*). In: Encontro anual da FeSBE, 2002, Salvador. Anais da FeSBE, 2002.

Anexo 11 – Carta de aceite de artigo científico em periódico