

PROGRESSÃO TUMORAL EM CÂNCER DE BOCA: AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA MUCOSA ORAL

LAÍS BORGES MUNIZ¹

PATRÍCIA TERRA ALVES²

ANA CRISTINA ROCHA CAMPOS³

SÉRGIO VITORINO CARDOSO⁴

RESUMO

Existem tecidos que apesar de aparentemente normais, podem apresentar alterações clínicas, microscópicas ou moleculares, que sinalizam uma possível transformação para neoplasia maligna. Os marcadores moleculares são, então, pesquisados na tentativa de se fazer uma previsão sobre qual lesão seria potencialmente mais agressiva. Exemplo seria a metalotioneína, tem sido associada com um pior prognóstico em diversos tipos de carcinomas, inclusive o de mucosa oral. Este estudo propôs avaliar a marcação da MT em tecidos normais, hiperplásicos, displásicos e carcinoma de células escamosas. A análise das marcações revelou um aumento da marcação da proteína nos tecidos na medida em que estes adquirem características de malignidade, levando a associação da presença da MT com um papel na progressão tumoral.

PALAVRAS CHAVE

Progressão tumoral, metalotioneína, leucoplasia, carcinoma epidermóide de mucosa oral.

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, 1720, CEP 38400-902, Uberlândia, MG. laismuniz@yahoo.com.br

² Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal de Uberlândia.

³ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia.

⁴ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia.

**TUMOR PROGRESSION IN ORAL CANCER: EVALUATION OF MOLECULAR
CHANGES RELATED TO THE DEVELOPMENT OF ORAL SQUAMOUS CELL
CARCINOMA**

LAÍS BORGES MUNIZ¹

PATRÍCIA TERRA ALVES²

ANA CRISTINA ROCHA CAMPOS³

SÉRGIO VITORINO CARDOSO⁴

ABSTRACT

There are tissues that despite apparently normal may have clinical, microscopic or molecular changes, signaling possible malignant transformation. Molecular markers are then researched in attempt to make a prediction about which injury would be more potentially aggressive. As an example, metallothionein (MT) has been associated with a worse prognosis in several types of carcinomas, including oral mucosa. This study evaluates the MT labeling in normal tissue, hyperplastic, dysplastic and squamous cell carcinoma. It revealed alterations that suggest a role for MT in carcinogenesis and tumor progression.

KEY WORDS

Tumor progression, metallothionein, oral leukoplakia, oral squamous cell carcinoma.

INTRODUÇÃO

O câncer de boca é um sério e crescente problema em várias partes do mundo (Canto & Devesa, 2002). No Brasil, apresenta-se como a sexta forma mais comum de câncer, à frente de outras doenças mais conhecidas da população em geral, tais como leucemias e melanomas, e mostra curso agressivo com notáveis morbidade e mortalidade (INCA, 2010; Warnakulasuryia, 2008; Wunsch-Filho et al., 2002). Mais de 90% dessas lesões são carcinomas epidermóides, derivados do epitélio de revestimento da mucosa oral, na grande maioria das vezes surgindo em decorrência de tabagismo crônico. Além de neoplasias malignas, uma ampla gama de alterações proliferativas podem ser observadas nesse tecido, desde hiperplasias até displasias intensas (Nagai, 1999). Essa última categoria é reconhecida como cancerizável, ou seja, passível de se transformar em carcinomas, um fenômeno amplamente registrado na literatura (Napier et al., 2008; Neville & Day, 2002; Warnakulasuryia et al., 2007). Compreender como ocorre o processo de surgimento do câncer (carcinogênese), bem como sua evolução para formas mais agressivas (progressão tumoral), é fundamental para a melhoria das ações preventivas e terapêuticas atualmente disponíveis (Warnakulasuryia, 2000).

A metalotioneína (MT) é uma proteína intracelular sem atividade enzimática, de baixo peso molecular, que possui alto conteúdo de enxofre e metais, principalmente o zinco, os quais compõem aproximadamente 20% do seu peso molecular (Vasák, 2005). Normalmente, está presente em muitos tecidos e tipos celulares, ainda que em pequenas quantidades (Laukens et al., 2009). A MT tem sido associada a pior prognóstico de várias formas de câncer, tendo em vista suas possíveis funções associadas a mecanismos indutores de proliferação, anti-apoptóticos, pró-angiogênicos e citoprotetores (Dutsh-Wicherek et al., 2008; Jasani e Schmid, 1997; Maret, 2007; Perderson et al., 2009; Theocharis et al., 2004; Zbinden et al., 2010). Nesse sentido, existem estudos anteriores que já demonstraram a presença da MT em carcinomas epidermóides da mucosa oral, inclusive associando sua superexpressão a pior prognóstico (Cardoso et al., 2002; Muramatsu et al., 2000; Sundelin et al., 1997). Da mesma forma, a expressão dessa molécula em epitélio normal e displásico de boca também já foi demonstrada, com evidências de que possa ter algum papel importante na conversão de lesões orais cancerizáveis em carcinomas (Johann et al., 2008; Pontes et al., 2009). Todavia, não existem estudos compreensivos, que tenham buscado traçar um perfil mais abrangente das possíveis variações na presença de MT em diferentes condições proliferativas da mucosa oral,

de forma a permitir avançar no conhecimento de sua participação nos processos de carcinogênese e progressão tumoral nesse tecido.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica da proteína MT em tecido normal, leucoplasias e carcinoma epidermóide de boca, com o propósito de melhor compreender a participação desta proteína na aquisição do fenótipo maligno da mucosa oral.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo do estudo aqui relatado foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, tendo sido aprovado conforme parecer 368/09. Além disso, constitui parte de uma linha de pesquisa que tem por objetivo avaliar a importância de marcadores moleculares na progressão tumoral da cavidade oral.

Todas as análises microscópicas descritas abaixo foram executadas utilizando-se de microscópio Leica DM750 acoplado a câmera digital de 5 megapixels (apenas para fotodocumentação), com objetivas de 4×, 10×, 20× e 40× de magnificação.

1. Definição da amostra

Quatorze amostras de cada lesão de interesse (folículos pericoronários, hiperplasias friccionais, leucoplasias, carcinomas epidermóides primários da mucosa oral e metástases linfonodais dessas lesões) foram selecionadas para o presente estudo, mediante busca ativa em registros disponíveis no Laboratório de Patologia do Hospital Odontológico / Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Dos exemplares teciduais mantidos em arquivo, fixados em formalina e embebidas em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3µm de espessura, os quais foram dispensados em lâminas previamente tratadas com silano (3-aminopropiltriétoxi-silano), para ensaios posteriores. Para cada amostra, uma lâmina foi corada em hematoxilina e eosina. Dois observadores previamente calibrados avaliaram qualitativamente todas as amostras para confirmação da característica normal, hiperplásica,

displásica, neoplásicas e metastática do tecido epitelial disponível (Gale et al., 2005 *IN* Barnes et al., 2005). Após essa etapa confirmatória, procedeu-se à busca de informações demográficas (sexo e idade) e clínicas (sítio anatômico e estadiamento clínico) dos casos, disponíveis nos formulários de solicitação de exame encaminhados ao referido Laboratório.

2. Imunoistoquímica

Para a evidenciação imunoistoquímica do antígeno metalotioneína, empregou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com recuperação antigênica em microondas com tampão EDTA (1mM, pH 8,4), utilizando-se anticorpo monoclonal E9, diluído a 1:800 (Dako, Carpinteria, EUA). A marcação nas camadas basal e parabasal do próprio epitélio de revestimento, e especialmente células mioepiteliais presentes em fragmentos de glândulas salivares menores das amostras, foram consideradas como controle positivo interno. A omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle negativo.

A análise da marcação foi executada de forma qualitativa, considerando-se a distribuição da positividade segundo as camadas celulares, e também semiquantitativa, buscando-se graduar a maior intensidade de positividade presente em cada uma das amostras, independente de sua estratificação nas amostras.

3. Análise Estatística

Para identificar possíveis diferenças na intensidade média de marcação de MT entre os grupos avaliados, foi realizado teste de Kruskal-Wallis. Probabilidade de hipótese nula verdadeira menor que 5% foi considerada estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Pacientes com lesões hiperplásicas distribuíam-se similarmente entre homens (52%) e mulheres, com idade média de 41,5 anos (\pm 20,2 anos). Portavam lesões predominantemente

em mucosa inserida (45%) e mucosa de bochecha (39%), além de lesões em língua ou assoalho (12%). Já as leucoplasias foram discretamente mais frequentes em mulheres (59%), em idade média de 54,5 anos (\pm 14,0 anos), com as lesões mais comumente observadas em mucosa inserida (52%), seguindo-se por lesões em bochecha ou língua e assoalho (33% para ambos os sítios). Finalmente, pacientes com carcinoma eram predominantemente homens (63%), com idade média de 57,8 anos (\pm 10,1 anos), portando lesões situadas mais comumente em língua e assoalho, depois mucosa inserida e então mucosa de bochecha. Além disso, a grande maioria (81,7%) dos carcinomas foram diagnosticadas como doença avançada (TNM III ou IV), com sobrevida variando entre 0 e 142 meses.

A marcação imunohistoquímica da metalotioneína foi observada em quase todas as amostras, no citoplasma e, ou, núcleo das células epiteliais, em intensidade variável, gerando padrão em mosaico de positividade (FIGURA 1).

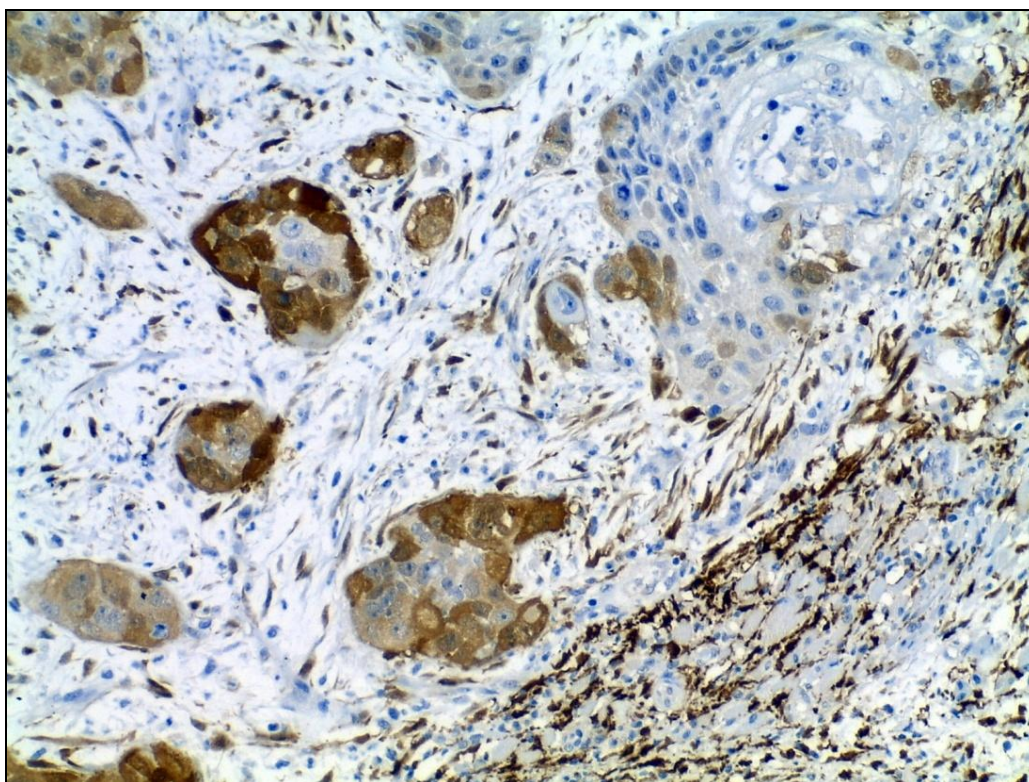


FIGURA 1 – Positividade citoplasmática e, ou, nuclear, de intensidade variável da metalotioneína em amostras de carcinoma epidermóide de mucosa oral, denotando padrão “em mosaico” da marcação dessa molécula (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 40 \times).

Nas amostras de epitélio normal e hiperplásico, a marcação ocorreu de forma homogênea na camada basal e na camada parabasal imediatamente superior, se atenuando nas camadas mais externas; de forma interessante, amostras de epitélio hiperplásico mostraram intensa marcação nuclear, além de citoplasmática (FIGURA 2). Nos epitélios displásicos, e especialmente nas regiões de displasia intensa, esse padrão se alterava, havendo então células positivas distribuídas de forma aparentemente desorganizada em praticamente todas as camadas epiteliais, novamente com evidente e intensa marcação nuclear (FIGURA 3). Já no epitélio adjacente aos carcinomas, observou-se que ocorre positividade similar ao epitélio das lesões não neoplásicas (marcação de camadas basal e parabasal), mas que essa diminui de forma importante ou mesmo desaparece abruptamente na área imediatamente vizinha à invasão tumoral (FIGURA 4). Nos carcinomas, a positividade era encontrada, de forma geral, nas células periféricas das ilhotas e cordões neoplásicos, especialmente nas áreas mais invasivas (FIGURA 5), havendo marcação mais intensa e freqüente quando as células se organizavam em ilhotas com número reduzido de células (FIGURA 6). Nos implantes metastáticos, a marcação também se apresentou intensa e freqüente (FIGURA 7).

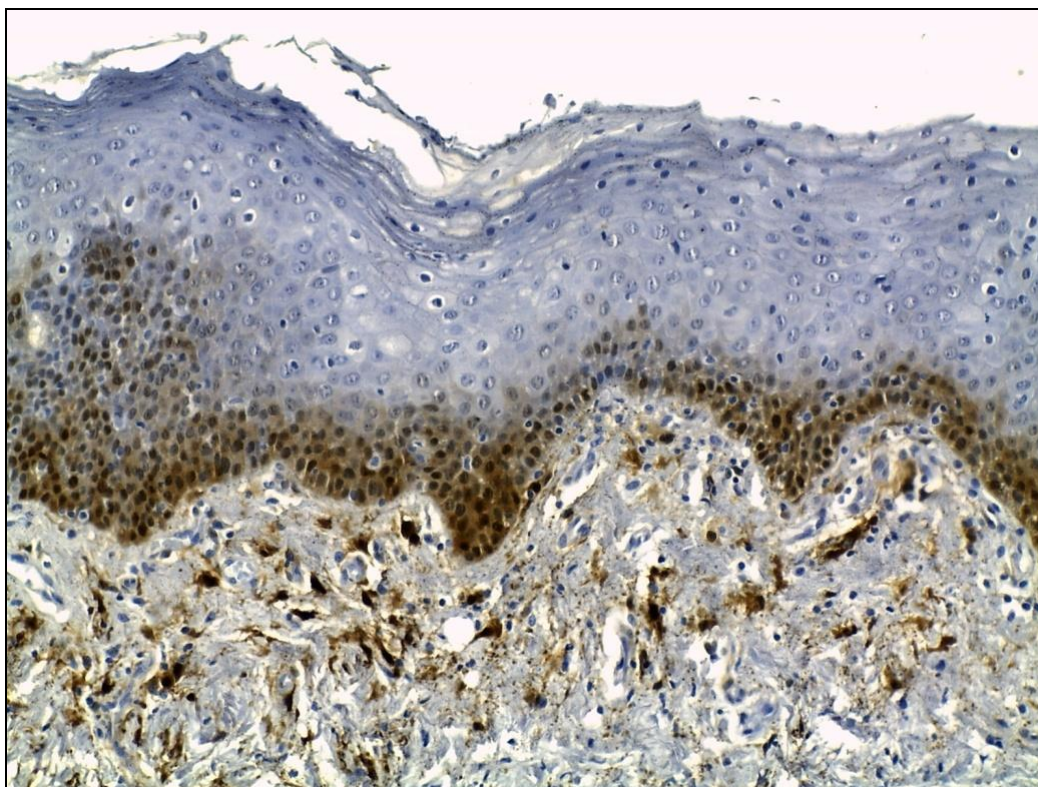


FIGURA 2 – Imunomarcção da metalotioneína em epitélio hiperplásico da mucosa oral (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 40×).

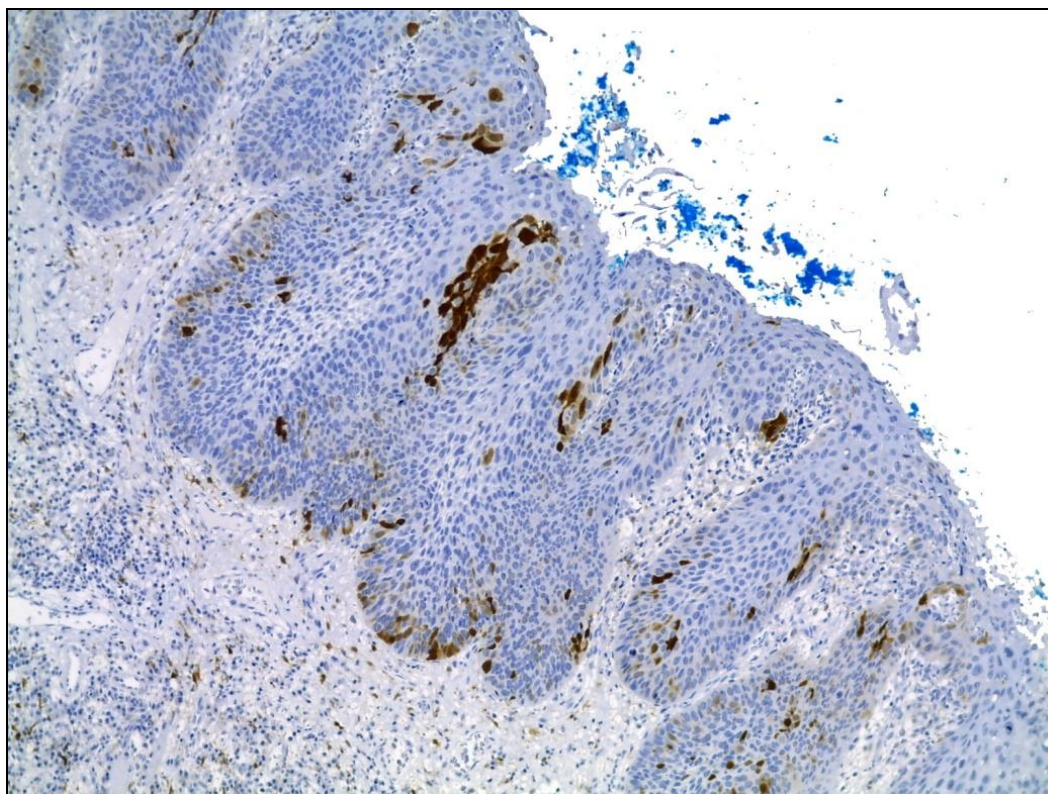


FIGURA 3 – Imunomarcção da metalotioneína em epitélio displásico da mucosa oral, evidenciando a perda da estratificação regular dessa molécula antes vista no epitélio normal ou hiperplásico (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 20×).

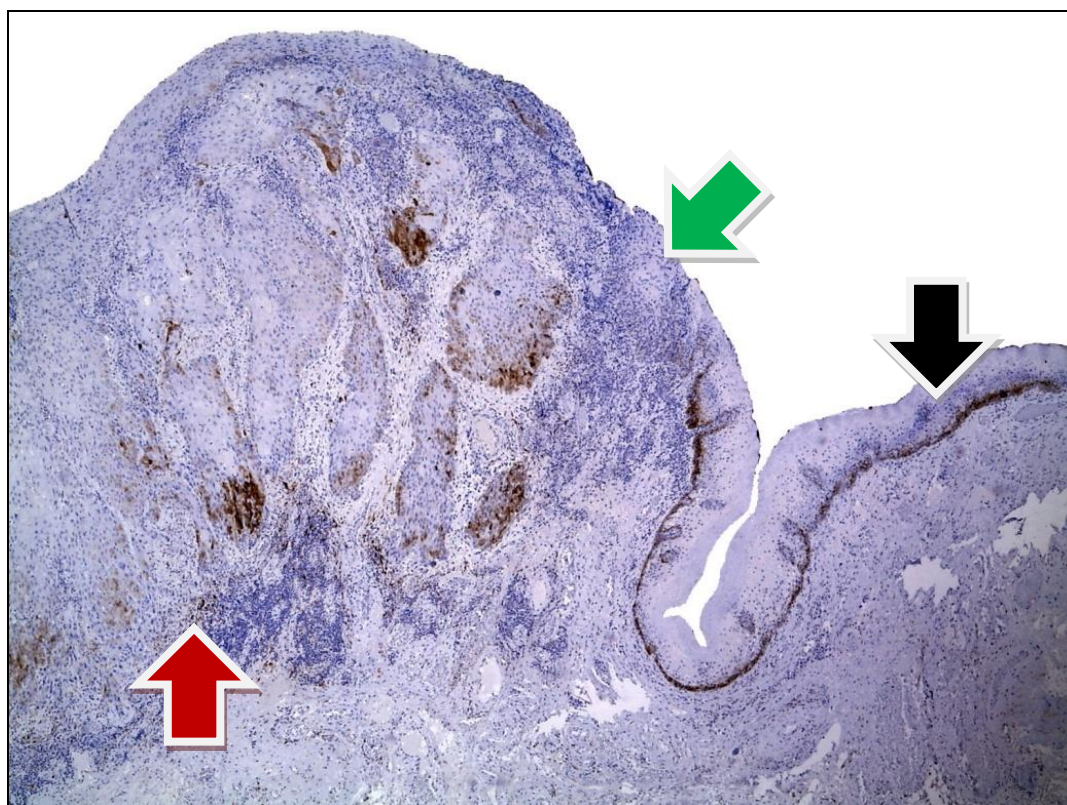


FIGURA 4 – Imunomarcção da metalotioneína em carcinoma da mucosa oral e epitélio adjacente: nesse último (seta preta), a marcação é similar a observada no epitélio normal / displásico, enquanto que no carcinoma se observa focos de marcação intensa nas regiões mais invasivas das ilhotas neoplásicas (seta vermelha); por outro lado, a área de transição entre essas duas condições epiteliais mostra-se completamente negativa (seta verde) para a expressão de metalotioneína (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 10×).

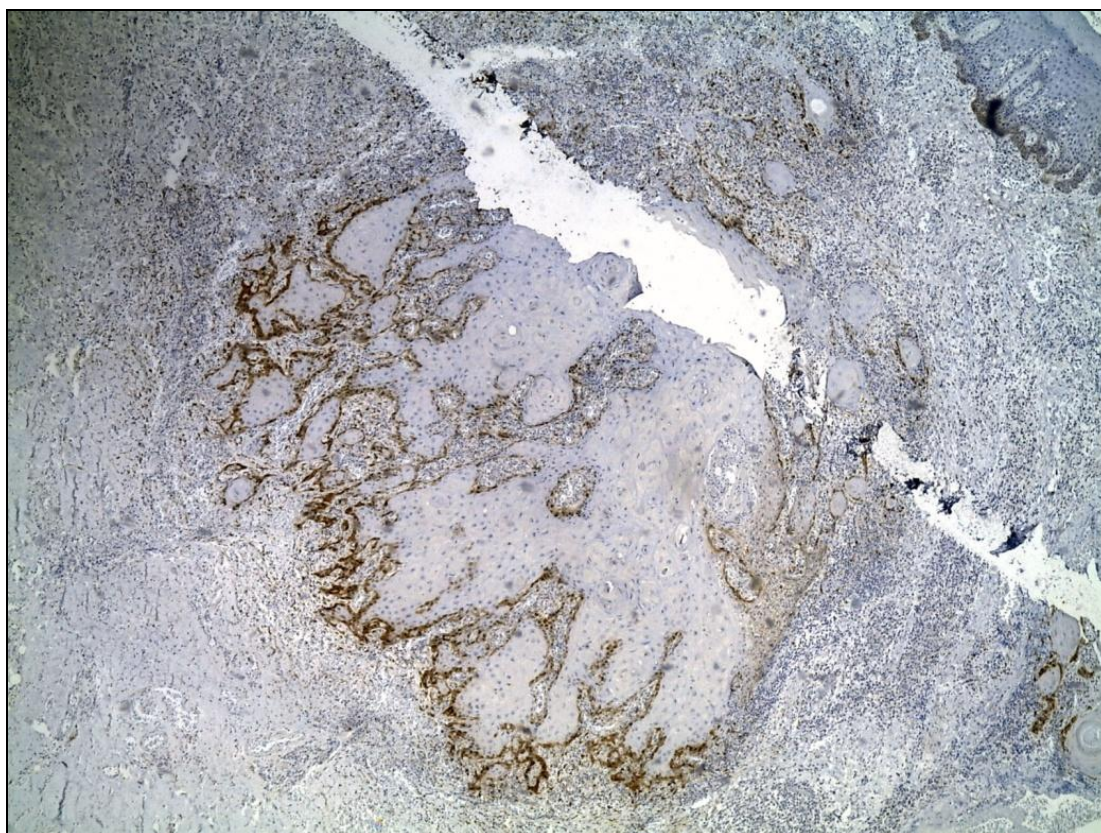


FIGURA 5 – Imunomarcção da metalotioneína em carcinoma da mucosa oral, evidenciando marcação mais intensa na periferia das formações tumorais, especialmente na região mais invasiva (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 10×).

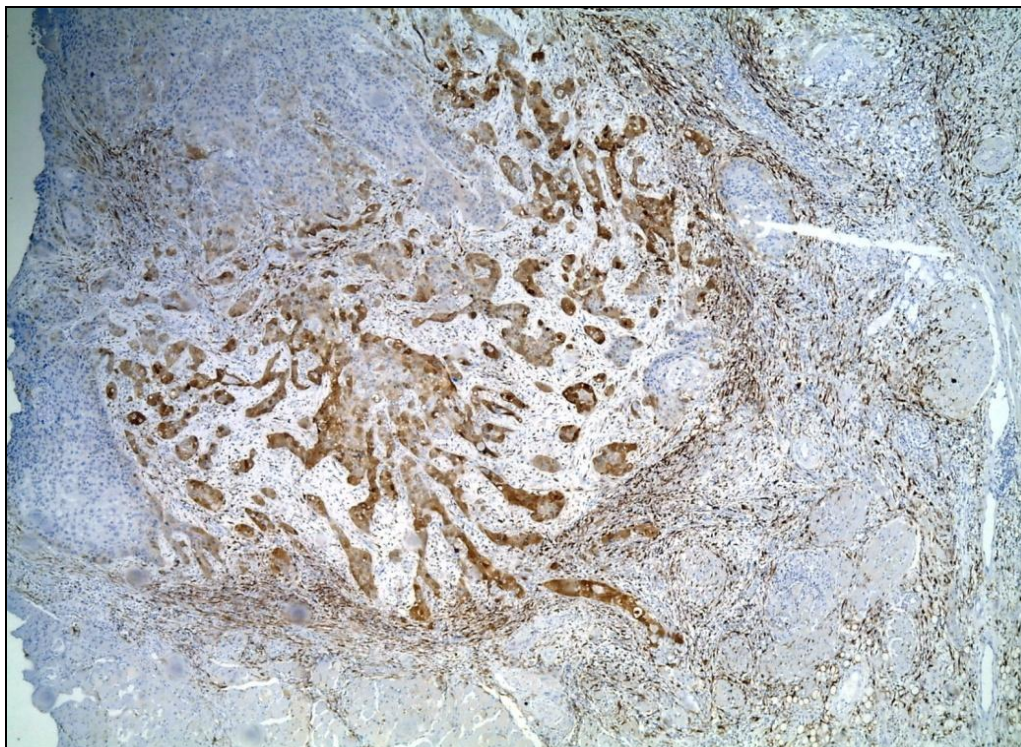


FIGURA 6 – Imunomarcção da metalotioneína em carcinoma da mucosa oral, demonstrando marcação mais intensa e frequente em ilhotas com menor número de células, denotando padrão de invasão mais agressivo (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 10×).

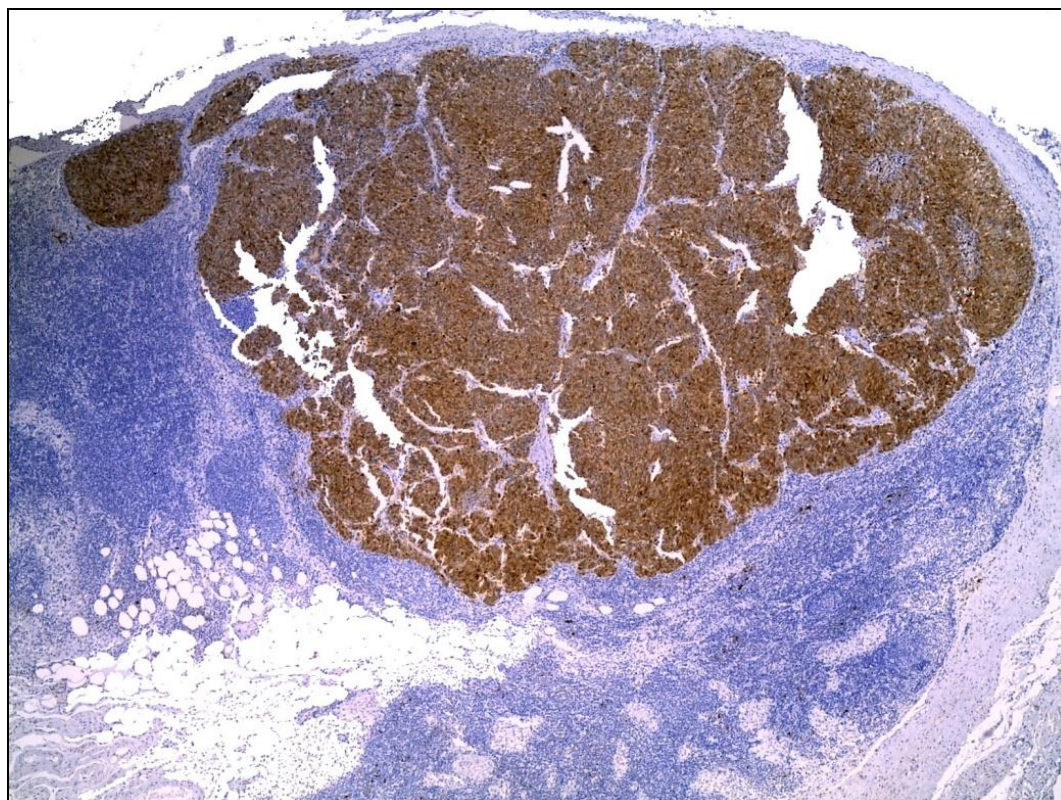


FIGURA 7 – Imunomarcção da metalotioneína em metástase de carcinoma da mucosa oral (estreptavidina-biotina-peroxidase, magnificação original de 20×).

Em análise semi-quantitativa (FIGURA 8), observou-se uma discreta diminuição da intensidade de marcação do epitélio normal para o hiperplásico, retornando ao nível inicial no epitélio displásico, daí aumentando no epitélio adjacente aos carcinomas, novamente caindo, de forma abrupta, na área de transição entre o epitélio invasivo e o não invasivo, retomando altos índices na porção central dos carcinomas, mantendo-se na fronteira de invasão, alcançando o máximo nos implantes metastáticos. Todavia, a diferença entre os diferentes níveis de marcação apenas se aproximou de significância estatística ($p = 0,06$, teste de Kruskal-Wallis). Da mesma forma, casos com marcação ausente foram encontrados apenas em amostras de epitélio normal ou hiperplásico, enquanto que casos com marcação intensa foram amplamente predominantes nas amostras de neoplasias primárias e metástases, mas não nas demais.

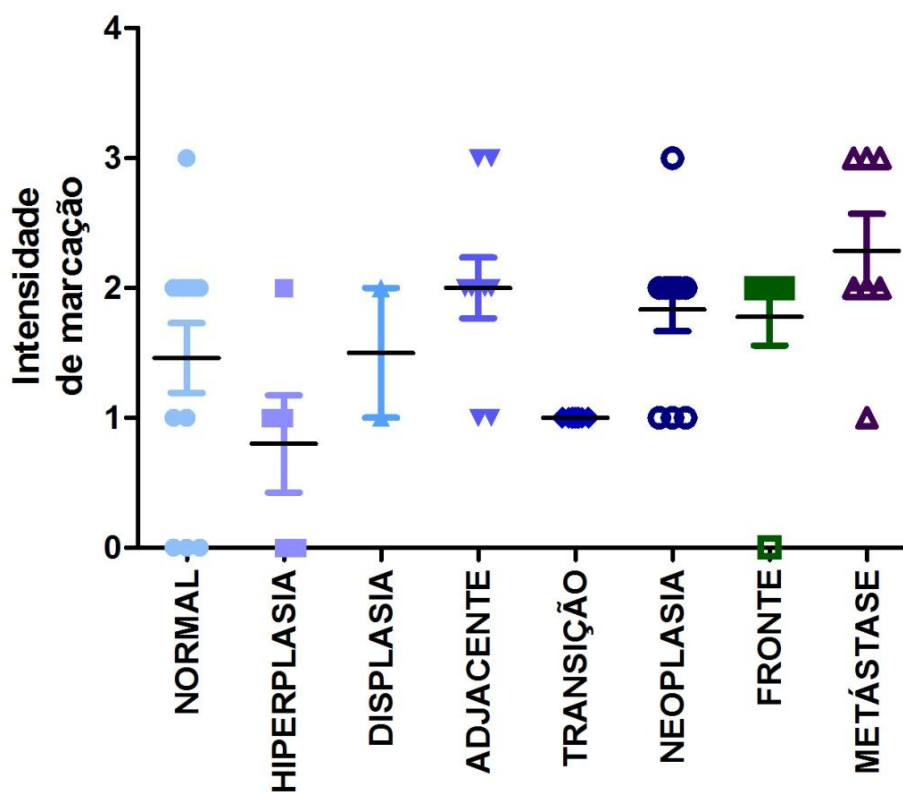


FIGURA 8 – Distribuição dos casos avaliados, segundo análise semi-quantitativa da intensidade de marcação da metalotioneína.

DISCUSSÃO

Estudos sobre doenças neoplásicas são essenciais para que se possa melhor compreendê-las, diagnosticá-las, tratá-las e preveni-las, com especial menção para os variados tipos de câncer. O presente estudo teve como objetivo agregar novos conhecimentos sobre a patogênese da evolução do tecido epitelial normal até as formas mais agressivas do carcinoma epidermóide da mucosa oral. Nesse intento, foi delineado um modelo de estudo que compreendeu amostras de epitélio normal, hiperplásico, displásico (leucoplasias e epitélio adjacente a carcinomas), neoplásico (distinguindo-se as áreas mais invasivas) e metastático. Além disso, foi avaliada uma molécula específica, a metalotioneína, sobre a qual já existem evidências de sua importância no surgimento e aquisição de características mais agressiva para a doença de interesse (Cardoso et al., 2002; Katsuragi et al., 1997; Johann et al., 2008; Pontes et al., 2009; Sudelin et al., 1997). Assim, procurando ampliar o conhecimento existente sobre o assunto, o atual estudo difere dos anteriores por tentar ser mais abrangente, investigando possíveis variações da expressão de MT entre diferentes alterações proliferativas epiteliais, incluindo as variadas etapas associadas tanto a carcinogênese quanto a progressão do carcinoma epidermóide oral.

Inicialmente, é possível afirmar que a presença de MT é uma característica geralmente constante no epitélio da mucosa oral, independentemente de sua atividade proliferativa, confirmando achados de estudos anteriores (Johann et al., 2008; Katsuragi et al., 1997; Muramatsu et al., 2000; Pontes et al., 2009; Sudelin et al., 1997). Todavia, existem diferenças qualitativas e quantitativas evidentes e provavelmente importantes segundo a condição epitelial, as quais merecem ser destacadas e discutidas a luz das prováveis funções dessa molécula.

A MT se caracteriza por apresentar baixo peso molecular e acentuada presença do aminoácido cisteína em sua composição. Esse aminoácido, por apresentar numerosos radicais tiol (SH), é geralmente responsável por ligações dissulfeto que são importantes para o dobramento das proteínas e para a ligação das mesmas a outras moléculas polares. De forma específica para a MT, a constituição e a conformação desses resíduos nessa molécula fazem com que os mesmos efetuem ligações coordenadas com até doze átomos metálicos ou outros compostos eletricamente carregados (Cherian et al., 2003; Vasák, 2005). Essa especificidade é singular no organismo, e levou ao desenvolvimento de hipóteses relacionadas a sua função na célula, quais sejam a neutralização de metais pesados e radicais danosos, a inibição da apoptose e a

regulação da disponibilidade de metais essenciais (Bell & Vallee, 2009; Chiaverini & De Lay, 2010; Dutsch-Wicherek et al., 2008; Formigari et al., 2007; Jacob et al., 1999; Laukens et al., 2009; Maret, 2007). Visto que essas funções estão associadas a proteção celular, a superexpressão de metalotioneína tem sido associada tanto a defesa de células normais contra genotoxicidade quanto a piora no prognóstico de diversas neoplasias malignas humanas, ao promover a defesa de células neoplásicas contra agentes terapêuticos (Jasani e Schmid, 1997; McGee et al., 2010; Pedersen et al., 2009; Theocharis et al., 2004).

Assim, no epitélio normal do revestimento da mucosa oral, a expressão de MT nas camadas basal e parabasal sugere que a mesma seja essencial para o metabolismo deste tecido. Considerando que tais amostras provavelmente não tenham sido submetidas a intenso estresse genotóxico, mas que por outro lado trata-se de tecido lábil, com intensa atividade proliferativa, pode-se supor que a MT esteja atuando na manutenção da viabilidade celular por inibir a apoptose e, de forma mais importante, no fornecimento de co-fatores metálicos a enzimas dos queratinócitos, em especial fatores de transcrição que se ligam ao DNA por motivos *zinc-finger* (Bell & Vallee, 2009; Maret, 2007; Formigari et al., 2007). Por outro lado, células em intensa atividade proliferativa mostram acentuada translocação da MT do citoplasma para o núcleo, em especial na transição das fases G₀/G₁ e G₂/M do ciclo celular (Cherian & Apostolova, 2000; Woo et al., 1996). Tal fenômeno parece se refletir na observação do presente estudo de marcação nuclear mais freqüente nas amostras de epitélio hiperplásico, enquanto a diminuição relativa da intensidade geral de marcação provavelmente seja devida a menor presença da molécula no citoplasma.

Nas amostras de displasia, as quais se considera já apresentar alterações genéticas associadas a maior propensão de evolução maligna (Warnakulasuryia et al., 2007; Yang et al., 2010), foi observada uma alteração importante na distribuição das células positivas para MT, fato interpretado, hipoteticamente, como uma possível falha nos mecanismos de defesa celular, dessa forma favorecendo a aquisição do fenótipo maligno. De forma interessante, a intensidade geral da marcação era maior no epitélio adjacente aos tumores, indicando que tais amostras sofriam intenso estresse genotóxico mas, por outro lado, mantinham preservados determinados mecanismos protetores associados a MT. Mais importante, houve uma redução abrupta da positividade justamente na área de transição do epitélio não invasivo para as áreas de carcinoma franco, corroborando a possibilidade de alguma disfunção desses mecanismos para favorecer a malignização (Jasani & Schmid, 1997; McGee et al., 2010).

Já nos carcinomas, muito embora a larga maioria das células se mostrarem negativas para a MT, a presença intensa e freqüente dessa molécula nas áreas mais invasivas ou com padrão de invasão aparentemente mais agressivo evidencia que a mesma volta a ser importante para as próprias células tumorais, favorecendo seu crescimento (atividade proliferativa), protegendo contra agentes terapêuticos, ou mesmo de alguma forma interferindo com outras moléculas responsáveis pelo fenótipo infiltrativo, como tem sido sugerido em outros estudos (Cherian & Apostolova, 2000; Dutsch-Wicherek, 2010; Haga et al., 1996; McGee et al., 2010; Pedersen et al., 2009; Wu et al., 2008). Finalmente, o aumento significativo da intensidade de marcação nas amostras de metástases sugere que a MT volte a ser importante durante a progressão tumoral, favorecendo a aquisição de fenótipo mais agressivo, de forma associada ou não a sua possível participação no processo de invasão tumoral, de forma similar ao observado em estudos anteriores (Lee et al., 2008; Szelachowska et al., 2008). Além disso, essa observação também reflete outros estudos prévios que têm demonstrado a associação entre superexpressão de MT e pior prognóstico para portadores de certas formas de câncer, inclusive o carcinoma epidermóide de mucosa oral (Cardoso et al., 2002; Muramatsu et al., 2000; Pedersen et al., 2009).

Finalmente, a presente investigação expôs observações que sustentam a importância da MT tanto nas etapas associadas a carcinogênese quanto a progressão tumoral em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. Não obstante, análises adicionais devem ser executadas com a finalidade de se obter um panorama ainda mais completo sobre o tema, principalmente com o emprego de técnicas quantitativas de análise, de avaliações comparativas segundo o grau de displasia das lesões cancerizáveis e do grau de diferenciação em carcinomas; nesses últimos, seria ainda de grande interesse o aprofundamento do estudo comparativo com outras moléculas relevantes para o câncer de boca, avaliações entre grupos bem definidos de lesões metastatizantes e não metastatizantes, bem como distintas quanto ao estadio clínico e à resposta a terapias específicas e, finalmente, sobrevida dos pacientes. Tendo em vista que o estudo aqui apresentado faz parte de uma linha de pesquisa, espera-se que tais análises sejam executadas em futuro próximo, dando continuidade ao presente trabalho de iniciação científica.

AGRADECIMENTO

Este trabalho recebeu apoio financeiro (bolsa) do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal de Uberlândia / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC UFU / CNPq; processo D-043/2009). Contou ainda com apoio financeiro (financiamento parcial) da FAPEMIG (processo 0333/2008) e do PROAP/CAPES/UFU.

REFERÊNCIAS

1. Bell SG, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBiochem*, v.10(1), p.55-62, 2009.
2. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncology*, v.38(6), p.610-7, 2002.
3. Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MC. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archive*, v.441(2), p.174-8, 2002.
4. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, v.46(2), p.347-56, 2000.
5. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research*, v.10, p.201-209, 2003.
6. Chiaverini N, De Ley M. Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radical Research*, v.44(6), p.605-13, 2010.

7. Dutsch-Wicherek M, Sikora J, Tomaszewska R. The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Frontiers in Bioscience*, v.13, p.4029-38, 2008.
8. Dutsch-Wicherek M. RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63(3), p.181-8, 2010.
9. Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology*, v.146(4), p.443-59, 2007.
10. Haga A, Nagase H, Kito H, Sato T. Enhanced invasiveness of tumour cells after host exposure to heavy metals. *European Journal of Cancer*, v.32A(13), p.2342-7, 1996.
11. Instituto Nacional de Câncer – Ministério da Saúde (2009). Estimativa 2010, incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. p.98.
12. Jacob ST, Ghoshal K, Sheridan JF. Induction of metallothionein by stress and its molecular mechanisms. *Gene Expression*, v.7(4-6), p.301-10, 1999.
13. Jasani B, Schmid KW. Significance of metallothionein overexpression in human tumours. *Histopathology*, v.31(3), p.211-4, 1997.
14. Johann ACBR, Silveira-Júnior JB, Souto GR, Horta MCR, Aguiar MCF e Mesquita RA. Metallothionein immunoexpression in oral leukoplakia. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, v.13(3), p.E156-60, 2008.
15. Katsuragi H, Hasegawa A, Saito K. Distribution of metallothionein in cigarette smokers and non-smokers in advanced periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, v.68(10), p. 1005-9, 1997.

16. Laukens D, Waeytens A, De Bleser P, Cuvelier C, De Vos M. Human metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v.19(4), p.301-17, 2009.
17. Lee SS, Yang SF, Ho YC, Tsai CH, Chang YC. The upregulation of metallothionein-1 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, v.44(2), p.180-6, 2008.
18. Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Experimental Gerontology*, v.43(5), p.363-9, 2007.
19. McGee HM, Woods GM, Bennett B, Chung RS. The two faces of metallothionein in carcinogenesis: photoprotection against UVR-induced cancer and promotion of tumour survival. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v.9(4), p.586-96, 2010.
20. Muramatsu Y, Hasegawa Y, Fukano H, Ogawa T, Namuba M, Mouri K, Fujimoto Y, Matsuura H, Takai Y, Mori M. Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses. *Anticancer Research*, v.20(1A), p.257-64, 2000.
21. Nagai MA. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.117, p. 113-120, 1999.
22. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.37, p.1-10, 2008.
23. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer Journal for Clinicians*, v. 52(4), p. 195-215, 2002.

24. Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, v.44(1), p.29-64, 2009.
25. Pontes HAR, Aquino Xavier FC, Silva TSP, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FSC, Santos Pinto Jr D. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.38, p.644-650, 2009.
26. Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L, Davidsson A, Hellquist HB. Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *European Journal of Cancer*, v.33(11), p.1860-4, 1997.
27. Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Tarkowski R, Spytowska B, Matkowski R, Kornafel J. Correlation of metallothionein expression with clinical progression of cancer in the oral cavity. *Anticancer Research*, v.29(2), p.589-95, 2009.
28. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, v.45(2), p.103-18, 2004.
29. Vasák M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.19(1), p.13-7, 2005.
30. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *Journal of Pathology*, v.190, p.407-409, 2000.
31. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Wall I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.36, p.575-580, 2007.

32. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, v.45, p.309-316, 2008.
33. Woo ES, Kondo Y, Watkins SC, Hoyt DG, Lazo JS. Nucleophilic distribution of metallothionein in human tumor cells. *Experimental Cell Research*, v.224(2), p.365-71, 1996.
34. Wusch-Filho V, Moncau JE. Cancer mortality in Brazil 1980-1995: regional patterns and time trends. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.48(3), p.250-7, 2002.
35. Wu Y, Siadaty MS, Berens ME, Hampton GM, Theodorescu D. Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration. *Oncogene*, v.27(52), p.6679-89, 2008.
36. Yang SW, Wu CJ, Lee YS, Chen TA, Tsai CN. Postoperative Recurrence as an Associated Factor of Malignant Transformation of Oral Dysplastic Leukoplakia. *ORL Journal for Otorhinolaryngology and it's Related Specialties*, v.72(5), p.280-290, 2010.
37. Zbinden S, Wang J, Adenika R, Schmidt M, Tilan JU, Najafi AH, Peng X, Lassance-Soares RM, Iantorno M, Morsli H, Gercenshtein L, Jang GJ, Epstein SE, Burnett MS. Metallothionein enhances angiogenesis and arteriogenesis by modulating smooth muscle cell and macrophage function. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v.30(3), p.477-82, 2010.