

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

# AVALIAÇÃO DA IMUNOLOCALIZAÇÃO DO RECEPTOR DO FOSFATIDIL INOSITOL-3 (IP3R) EM CARCINOMAS BASOCELULAR E DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PELE

Cristiane Regina Gruber, Thelma Larocca Skare, Allan Fernando Giovanini, Marcos Fabiano Sigwalt, Graziela J. Crescente Rastelli, Fernando Issamu Tabushi

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.7843>

Submetido em: 2024-01-05

Postado em: 2024-01-05 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

A moderação deste preprint recebeu o endosso de:

Oswaldo Malafaia (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>)

## **AVALIAÇÃO DA IMUNOLocalização DO RECEPTOR DO FOSFATIDIL INOSITOL-3 (IP3R) EM CARCINOMAS BASOCÉLULAR E DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PELE**

### *EVALUATION OF THE IMMUNOLocalIZATION OF THE PHOSPHATIDYL INOSITOL-3 RECEPTOR (IP3R) IN BASAL CELL AND SQUAMOUS CELL SKIN CARCINOMAS*

Cristiane Regina **GRUBER**<sup>1,2</sup>, Allan Fernando **GIOVANINI**<sup>1</sup>, Thelma Larocca **SKARE**<sup>1</sup>,  
Marcos Fabiano **SIGWALT**<sup>1</sup>, Graziela J. Crescente **RASTELLI**<sup>2</sup>,  
Fernando Issamu **TABUSHI**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil

#### **ORCID**

Cristiane Regina Gruber – <https://orcid.org/0000-0003-4149-2534>

Allan Fernando Giovanini - <https://orcid.org/0000-0002-1637-2955>

Thelma Larocca Skare - <https://orcid.org/0000-0002-7699-3542>

Marcos Fabiano Sigwalt - <https://orcid.org/0000-0002-9899-5493>

Graziela J. Crescente Rastelli - <https://orcid.org/0000-0002-4235-1410>

Fernando Issamu Tabushi - <https://orcid.org/0000-0002-6546-9841>

#### **Correspondência:**

Cristiane Regina Gruber

Email: [cristiane\\_gruber@hotmail.com](mailto:cristiane_gruber@hotmail.com)

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

#### **Mensagem Central**

As neoplasias de pele não melanoma (carcinoma basocelular e espinocelular) formam o grupo mais comum de todos os tipos de neoplasias. Embora ainda não estejam sendo pautados como canalopatias, tem sido sugerido que bombas e canais iônicos contribuem para a sua progressão por afetar a autofagia. Neste estudo, a expressão imuno histoquímica de IP3R (complexo glicoproteico de membrana que atua como canal intracelular de cálcio) apresentou-se de forma similar em todas as amostras analisadas. A imunolocalização de IP3R está associada à fisiopatologia do câncer de pele não melanoma, entretanto, a sua expressão não parece estar associada à agressividade tumoral.

#### **Perspectiva**

Para que se possa entender de forma abrangente o mecanismo celular e molecular de todos os componentes envolvidos no câncer de pele não melanoma, se faz necessário o entendimento do seu processo de oncogênese e a correlação entre as características tumorais, a expressão imuno histoquímica e interação do IP3R. Tais apontamentos deverão ser objeto de estudos futuros.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil – CAAE 68533423.1.0000.0103

### **Contribuição dos autores**

Conceituação: Cristiane Regina Gruber

Análise formal: Allan Giovanini, Thelma Larocca Skare

Investigação: Cristiane Regina Gruber, Graziela J. Crescente Rastelli

Metodologia: Allan Giovanini

Supervisão: Thelma Larocca Skare

Redação (esboço original): Marcos Sigwalt

Redação (revisão e edição): Fernando Tabushi

**RESUMO - Introdução:** As neoplasias de pele não melanoma (carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC) formam o grupo mais comum de todos os tipos de neoplasias. Embora o câncer ainda não esteja sendo pautado como canalopatia, tem sido sugerido que bombas e canais iônicos contribuem para a sua progressão por afetar a autofagia. Proteínas iônicas, em especial as de canais de cálcio, como o receptor da fosfatidil inositol 3 (IP3R) participam de maneira ativa na autofagia por estarem envolvidas na etapa inicial de formação do autofagossomo, podendo se tornar em alvo terapêutico importante neste contexto. **Objetivo:** Avaliar a expressão imuno histoquímica do IP3R em ambos os tumores de pele. **Método:** Foi realizada imuno histoquímica em 60 lâminas de câncer não melanoma utilizando anticorpos primários anti-IP3R verificando a sua expressão. **Resultados:** Pela primeira vez foi identificada a imunolocalização do IP3R em câncer de pele não melanoma, sendo evidente em mais de 90% das células neoplásicas em todas as lâminas estudadas, independentemente do padrão histológico, invasão e demais características tumorais. Diferentemente do visualizado no controle interno de pele normal, no qual houve imunolocalização de IP3R em células basais, nos tumores, a expressão imuno histoquímica ocorreu em todo o corpo da neoplasia. **Conclusão:** Houve imunolocalização de IP3R em células tumorais tanto em CBC quanto em CEC. Não foi possível estabelecer correlação entre as características tumorais e a expressão de IP3R, pois a imunomarcagem apresentou-se de forma similar em todas as amostras analisadas. Apesar disso, IP3R está associado à fisiopatologia do câncer de pele não melanoma, mas a sua expressão não parece estar associada à agressividade tumoral.

**PALAVRAS-CHAVE** - Carcinoma espinocelular. Carcinoma de células escamosas. Canalopatia. IP3R. Imunoistoquímica.

**ABSTRACT - Introduction:** Non-melanoma skin neoplasms (basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) form the most common group of all types of neoplasms. Although cancer is not yet being classified as a channelopathy, it has been suggested that pumps and ionic channels contribute to its progression by affecting autophagy, which could become an important therapeutic target in this context. **Objective:** To evaluate the immunohistochemical expression of IP3R in both skin tumors. **Method:** Immunohistochemistry was performed on 60 slides of non-melanoma cancer using primary anti-IP3R antibodies, verifying their presence and quantifying **Results:** For the first time, IP3R immunolocalization was identified in non-melanoma skin neoplasms, being evident above 90% of neoplastic cells was observed in all slides studied, regardless of the

histological pattern, invasion and other tumor characteristics. Unlike what was seen in the internal control of normal skin, in which there was immunolocalization of IP3R in basal cell, in tumors, immunohistochemical expression occurred throughout the entire body of the neoplasm. **Conclusion:** There was immunolocalization of IP3R in tumor cells in both BCC and SCC. It was not possible to establish a correlation between tumor characteristics and IP3R expression, as immunostaining was similar in all analyzed samples. Despite this, IP3R to be associated with the pathophysiology of non-melanoma skin cancer, but its expression does not seem to be associated with tumor aggressiveness.

**KEYWORDS** - Squamous cell carcinoma. Squamous cell carcinoma. Channelopathy. IP3R. Immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

O câncer constitui grande grupo de doenças caracterizadas pela rápida proliferação de células anormais com crescimento além de seus limites usuais e que podem progredir e invadir tecidos adjacentes ou à distância do organismo humano. As células cancerosas exibem propriedades fisiopatológicas comuns, incluindo insensibilidade a supressores de crescimento, resistência à apoptose, imortalidade replicativa, angiogênese sustentada, capacidade de invasão tecidual e metástase<sup>1</sup>.

Cada neoplasia possui gênese e quadro de desenvolvimento biológico distintos, com proteínas aberrantes e mutações moleculares diferentes<sup>2,3</sup>. A heterogeneidade genética proporciona padrões de expressão de proteínas distintos, que se traduz em comportamento biológico diferente<sup>4,5</sup>.

Nessa perspectiva, os cânceres de pele não melanoma (CPNM) constituem um grupo heterogêneo de tumores malignos primários derivados de células da epiteliais<sup>6</sup>, cujo comportamento biológico é explicado por várias interações e suas características histológicas de maior prevalência permitem a classificação em carcinoma de células basais (CBC) e de células escamosas (CEC).

O CBC é o mais comum<sup>7</sup>, se desenvolve principalmente na região da cabeça/pescoço, raramente metastatiza, mas apresenta invasão local e destruição tecidual<sup>8</sup>. Entre os seus padrões histomorfológicos destacam-se o nodular, o infiltrativo e o basoescamoso.

O CEC é o segundo câncer de pele mais comum, acomete principalmente indivíduos caucasianos expostos a fatores ambientais, radiação ultravioleta, tabagismo, infecções crônicas e imunossupressores, ou com antecedentes genéticos peculiares<sup>9</sup>.

A tese de que a supressão de canais iônicos funcionais pode contribuir para que o tumor perca sua capacidade de nutrição (por autofagia) sustenta e motiva a hipótese de que a via de supressão de canais iônicos pode vir a ser o cerne da alternativa plausível para a citorredução neoplásica<sup>10</sup>. O papel das proteínas de canais iônicos que são expressas e que se associam ao comportamento tumoral, ainda permanece obscuro. Essa perspectiva de interação entre neoplasia, comportamento biológico tumoral e participação de canais iônicos (canalopatias) motiva a procura de expressão de proteínas de canais iônicos que estejam associadas à agressividade tumoral<sup>11</sup>.

Dependendo do número total de canais iônicos por célula e da densidade de sua distribuição na membrana da superfície celular, os fluxos iônicos associados à sua ativação podem produzir mudanças globais ou locais<sup>12</sup>, determinando a progressão dos processos associados a proliferação, diferenciação, apoptose e motilidade. Qualquer perturbação nessas mudanças, resultante da disfunção dos canais iônicos, prejudicaria seriamente tais

funções<sup>13</sup>.

Vale ressaltar que o acúmulo de cálcio citosólico, o qual adentra no citosol através do canal IP3R, atua como segundo mensageiro para ativação de proteínas, como as proteínas da autofagia, como beclina 1<sup>14,15,16</sup>, criando condições importantes para o desenvolvimento do câncer<sup>17</sup>. Sugere-se que a co-participação e co-expressão de outras proteínas ao IP3R impulse o fluxo autofágico<sup>14,18,19</sup>.

Conhecer os principais marcadores moleculares do câncer não melanoma pode ser de fundamental importância para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos a estes tumores, para a detecção precoce da doença e para entender possível associação entre a expressão das proteínas de canais iônicos e a agressividade e a invasividade dos tumores de pele não melanoma, para o estudo dos mecanismos patogênicos do câncer de pele não melanoma, bem como para fornecer subsídios para novas terapias.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar, por meio de imunoistoquímica, a expressão imuno-histológica do IP3R em CBC e CEC comparando a imunolocalização com o grau de agressividade das neoplasias, representadas por tamanho macroscópico e microscópico do tumor, presença de infiltração perineural, invasão angiolinfática e espessura de infiltração tumoral.

## MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada no Programa de Pós-graduação em Princípios de Cirurgia da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (FEMPAR) e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da FEMPAR. Seguiu os preceitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, e as resoluções 196/96, 251, 466 do Conselho Nacional de Saúde.

Trata-se de estudo transversal retrospectivo e descritivo. Foram utilizadas amostras dos arquivos do Laboratório Diagnóstico, Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia de Curitiba, Brasil. Os espécimes foram amostras processadas em lâminas histológicas selecionadas aleatoriamente por meio de rastreio dos laudos previamente diagnosticados como CBC e CEC no período de janeiro de 2021 a fevereiro de 2023. Os blocos de parafina selecionados apresentavam amostra tumoral mínima para corte sem que houvesse a necessidade de utilização completa do material, viáveis à imunoistoquímica, com material embocado representativo de CPNM. Foram excluídos blocos que não apresentassem tais características.

Foram separados 60 laudos (31 de CBC e 29 de CEC), previamente diagnosticados por meio de análise anatomopatológica de exérese de tumor, e suas respectivas amostras em blocos parafinados (em mesmo número). Os blocos de parafina, contendo fragmentos de tumor e pele íntegra (margem definida na operação), foram analisados a fim de se verificar se possuíam amostra tumoral mínima que permitisse cortes adicionais sem que fossem utilizados por completo. Cada bloco histológico foi então submetido a microtomia para obtenção de novos cortes com espessura de 3 µm. Foram produzidos 31 cortes dos espécimes de CBC e 29 de CEC, os quais foram alocados em 20 lâminas silanizadas.

Os laudos anatomopatológicos dos padrões histológicos dominantes de CBC ou CEC forneciam também informações gerais do tumor como: subtipos histológicos, grau de diferenciação, presença ou não de ulceração, invasão, presença de elastose, invasão perineural e angiolinfática, infiltração linfoplasmocitária e presença de processo inflamatório, localização do tumor, volume tumoral e a presença ou não de margens

comprometidas. Tais características foram tabuladas a fim de possibilitar análise estatística e identificação do padrão das amostras analisadas.

Para a realização da imunistoquímica, exemplares dos tumores foram alocados em recipiente específico para então serem desparafinados em xilol 1 e 2 em estufa a 56° C. Em seguida, foram hidratados em etanol graduado. Para recuperação do antígeno foi utilizada pepsina (pH 1,8 a 2,0). As seções foram imersas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% e em metanol para inibição da atividade da peroxidase endógena e, a seguir, bloqueadas com albumina sérica bovina a 1% (Sigma) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a fim de remover pigmentos formólicos e a peroxidase endógena, os quais poderiam proporcionar falsas áreas de imunomarcção. Buffer (PBS *substrate*) foi utilizado para cobrir o corte histológico. Na sequência, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-IP3R (200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-427119), com fator de diluição de 1:100). As seções foram incubadas com polímero marcado com enzima peroxidase de rábano livre de biotina do Sistema de Detecção Streptoavidina-biotina peroxidase (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Diaminobenzidina (Sigma) foi usada como cromógeno. Os cortes foram lavados em água destilada e então contracorados com hematoxilina de Mayer (Sigma). Por fim, foi realizada a desidratação em álcool graduado, diafanização em xilol e montagem com resina histológica. Controle positivo foi obtido utilizando-se amostra de cólon, mama e tonsila, sendo que nas 3 houve imunolocalização pelo anti-IP3R.

Para análise da expressão imunistoquímica foi utilizada microscopia de luz com aumento final de 400x em áreas distintas consideradas *hotspots*. A expressão das proteínas foi pontuada de acordo com o número de células imunopositivas, sem considerar diferenças de intensidade de imunorreatividade, conforme escore<sup>20</sup> apresentado no Tabela 1. O índice de marcação foi determinado pela observação de 1000 células/campo, medindo células positivas e negativas. Para a análise estatística, dados nominais foram expressos em porcentagens e numéricos em média e desvio-padrão ou mediana e intervalos interquartis de acordo com a distribuição da amostra. A identificação do escore de maior frequência foi expresso em moda.

**TABELA 1 - Escore de expressão imunistoquímica**

Escore	% de células tumorais imunopositivas
0	Negativo (sem marcação)
1	Marcação em menos de 25% das células tumorais
2	Marcação entre 25 e 50% das células tumorais
3	Marcação entre 50 a 75% das células tumorais
4	Marcação em mais de 75% das células tumorais

## RESULTADOS

Foram estudadas 60 lâminas, sendo 31 (51,7%) de CBC e 29 (48,3%) de CEC.

Os laudos de amostras de CBC eram oriundos 22/29 (75,8%) mulheres e 7/29 (24,1%) homens com idade entre 40 e 84 anos (média de 66,8±11,0 anos). Estas informações estavam disponíveis em 29 laudos anatomopatológicos.

A localização do tumor, CBC, estava disponível em 29 laudos sendo 18 (62,0%) em face e 11 (37,9%) no corpo. O tamanho variou de 6-169 mm<sup>2</sup> com mediana de 49 (30-76,5) mm<sup>2</sup>. As demais características dos CBC são apresentadas na Tabela 2.

Os laudos das amostras de CEC eram oriundos 19/28 (67,8%) de mulheres e 9/28 (32,1%) de homens com idade entre 53,0 e 90 anos (média 76,6±8,9 anos).

A localização do tumor, CEC, mostrava que 27 (93,1%) estava em face e 2 (6,8%) em

tronco. O tamanho do tumor variou de 16-238 mm<sup>2</sup> (média 93,1±65,1 mm<sup>2</sup>). Quanto ao grau de diferenciação do CEC, 4(13,8%) eram *in situ*, 5 (17,8%) moderadamente diferenciado e 20 (69%), bem diferenciado

A tabela 3 apresenta as características tumorais do CEC.

Em pele, controle interno de pele normal, o IP3R foi expresso em citoplasma e em núcleo de células basais do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, bem como nas que delineavam externamente o folículo piloso e as glândulas sebáceas (Figura 1). Células esparsas do estrato espinhoso foram marcadas apenas em núcleo celular, enquanto as da camada granulosa, lúcida e córnea eram negativas para IP3R (Figura 2).

**TABELA 2 - Carcinoma basocelular: características do tumor**

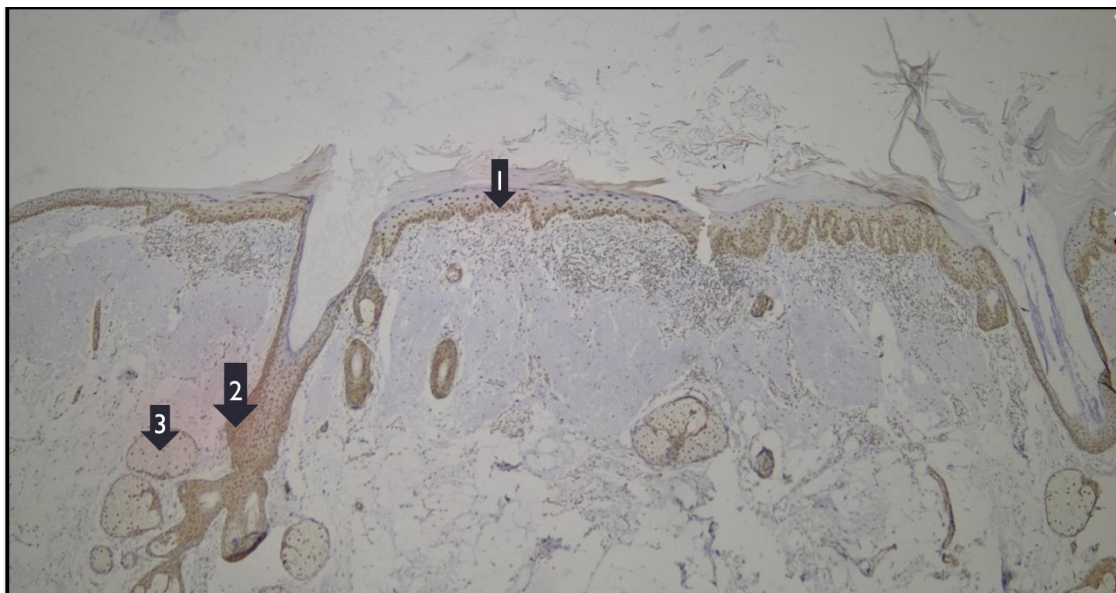
Características	Resultado (%)
Tipo histológico (*) (n=31)	Sólido - 9 - 29% Sólido cordonal- 20 - 64,5% Sólido cístico-5 - 16,1% Adenoide-1 - 3,2% Pigmentado -1 - 3,2% Superficial- 3- 9,3% Esclerodermiforme- 0 Cordonal- 4 -12,9% Difuso escamoso -2 - 6,5% Sólido/cístico/cordonal-1 - 3,2%
Ulceração (n=31)	Presente - 7 - 22,6%
Crescimento (n=31)	Bloco sólido - 3 - 9,7% Expansivo - 19 - 61,3% Infiltrativo -9 - 29%
Invasão (n=30)	Epiderme - 1 - 3,3% Derme superficial- 4- 13,3% Derme média- 11 - 36,6% Derme profunda- 11- 36,6% Hipoderme- 3,3%
Elastose (n=26)	Discreta -4 Moderada - 13 Acentuada -9
Fibrose (n=31)	6- 19,4%
Invasão perineural (n=31)	1 - 3,2%
Margem lateral (n=31)	Livre - 26 - 83,8% Comprometida - 5 - 16,1%
Margem profunda (n=31)	Livre -31 -100% Comprometida-0
(*) mais de uma característica presente num único tumor	

**TABELA 3 - Carcinoma espinocelular: características do tumor**

Característica	Resultado (%)
Ulceração (n=29)	Presente - 5 (17,2%)
Invasão (n=29)	In situ - 4 - 13,7% Derme superficial -8 - 27,5% Derme média -8 - 27,5% Derme profunda-9 - 31,0%
Elastose (n=29)	Ausente - 1 - 3,4% Discreta - 1 - 3,4% Moderada - 6 - 20,6% Acentuada - 19 - 65,5%
Fibrose (n=29)	Ausente- 25 - 86,2% Presente -4 - 13,7%
Infiltrado (n=29)	Ausente - 26- 89,6%

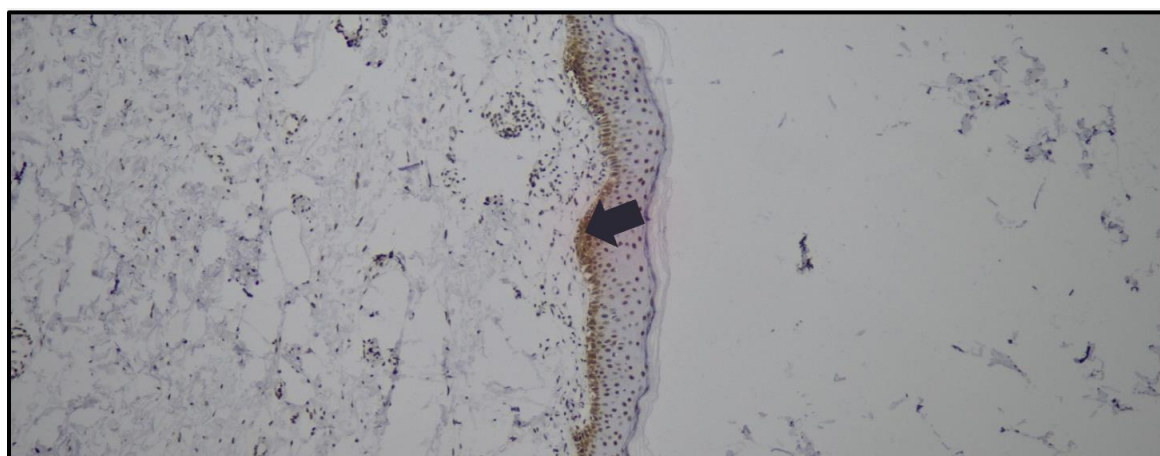


	Linfo-plasmocitário – 1 -3,4%
	Processo inflamatório – 2 – 6,8%
Invasão perineural/angio (n=29)	Ausente – 29 (100%)
	Lateral livre – 27 (100%)
	Lateral comprometida -0
	Profunda livre 27 (100%)
Margem (n=27)	Profunda comprometida – 0



**FIGURA 1 - Células basais, folículo piloso e glândulas sebáceas marcadas por IP3R**

Legenda: Técnica imunoistoquímica para IP3R com aumento de 40X. Demonstra cortes histológico de pele revelando imunomarcção do IP3R em células basal do epitélio escamoso (1), em células que delineavam o folículo piloso (2) e nas glândulas sebáceas (3) em íntimo contato com tecido conjuntivo adjacente.



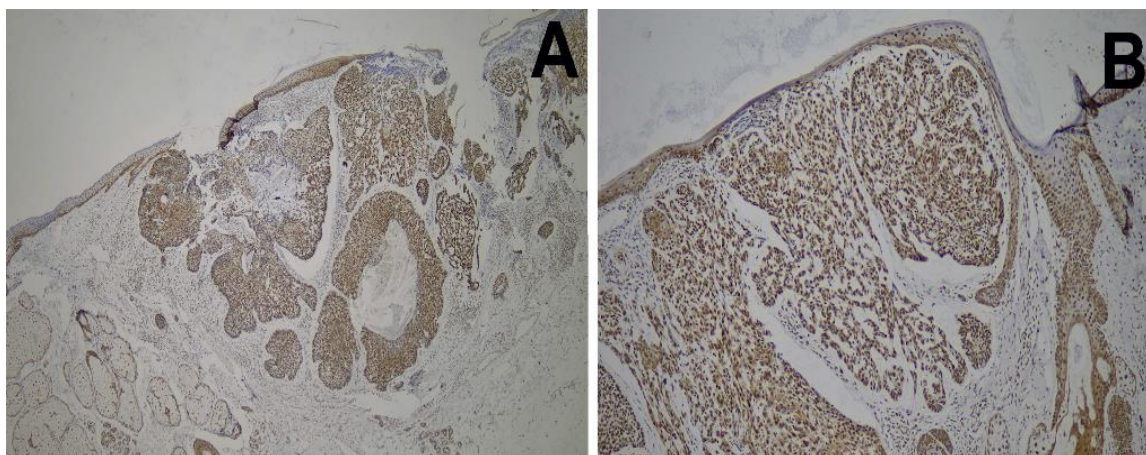
**FIGURA 2 - Células basais marcadas por IP3R**

Legenda: Técnica imunoistoquímica para IP3R com aumento de 40X. Detalhe de corte histológico de pele mostrando células basais positivas (seta) tanto em citoplasma quanto em núcleo e discretos núcleos do estrato espinhoso positivo ao IP3R

No CBC, as célula neoplásicas exibiram positividade ao IP3R. A imunolocalização ocorreu essencialmente em núcleos do corpo da neoplasia, embora positiva em mais de 90% das células tumorais (Figura 3).

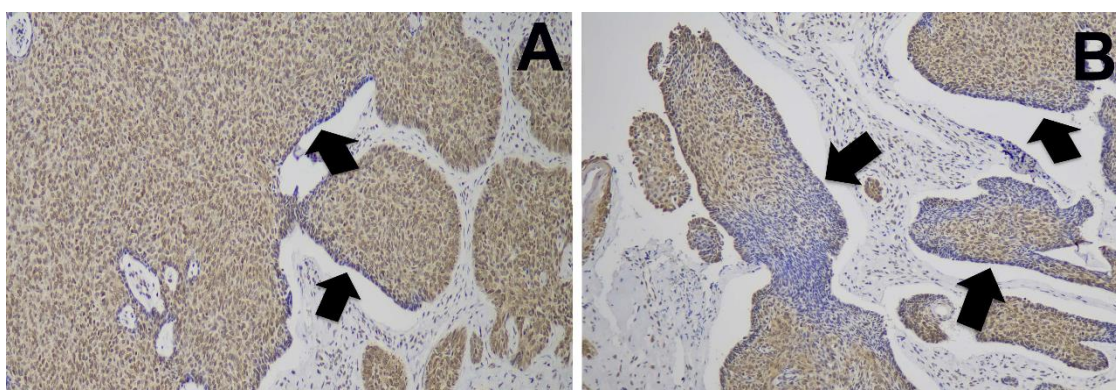


As áreas da frente de invasão do CBC exibiram morfologia em paliçada, nessas células periféricas da neoplasia, que mantinham contato íntimo com o tecido conjuntivo, e expressão para o IP3R negativa (Figura 4).



**FIGURA 3 – IP3R em CBC**

Legenda: Técnica imunoistoquímica para IP3R com aumento de 40X. Demonstra o padrão de imunopositividade do IP3R em CBC: A) neoplasia sólida cística superficial; B) CBC nodular

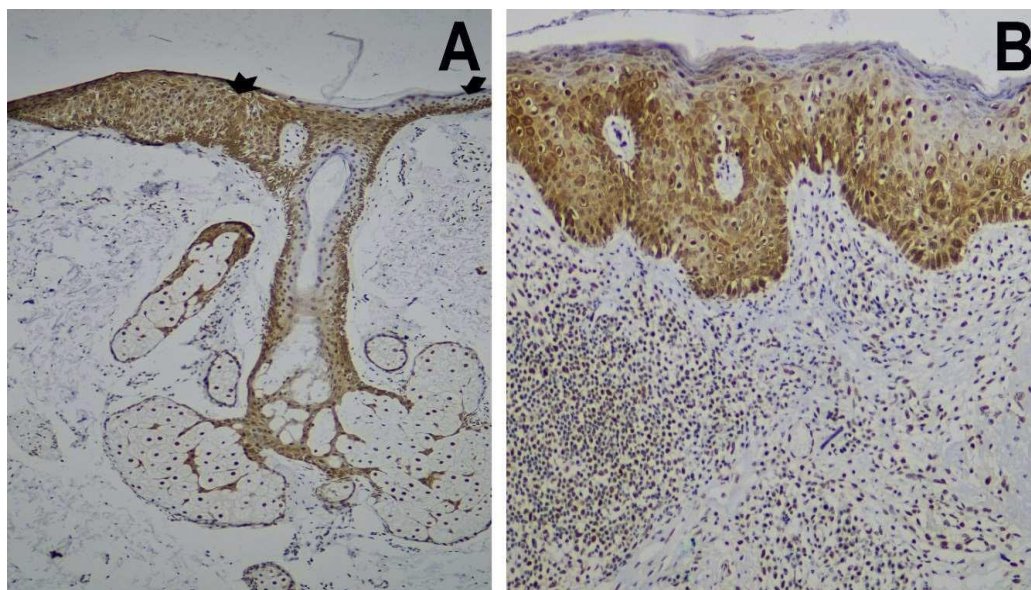


**FIGURA 4 – IP3R em CBC, área de frente de invasão**

Legenda: Técnica imunoistoquímica para IP3R com aumento de 400x: A e B) demonstram acentuada marcação ao IP3R nas células neoplásicas. Verificar negatividade de IP3R em áreas paliçadas da neoplasia (setas) confrontando com ninhos de invasão que são IP3R positivos.

No CEC, todos os espécimes de carcinoma (100%), tanto *in situ* quanto invasor, bem ou moderadamente diferenciado, exibiram acentuada positividade ao IP3R, com escore 4. A imunolocalização, considerada em citoplasma e núcleo, foi homogênea e específica em mais de 95% das células displásicas/neoplásicas.

Todos os casos de CEC avaliados exibiram positividade ao anti-IP3R. Ainda, a expressão imuno histoquímica do IP3R exibiu o mesmo padrão de imunolocalização, ocorrendo tanto em citoplasma quanto em núcleo das células neoplásicas ou atípicas. No carcinoma *in situ*, o IP3R foi expresso em todo epitélio displásico que ocupava toda célula displásica em epiderme (Figura 5).

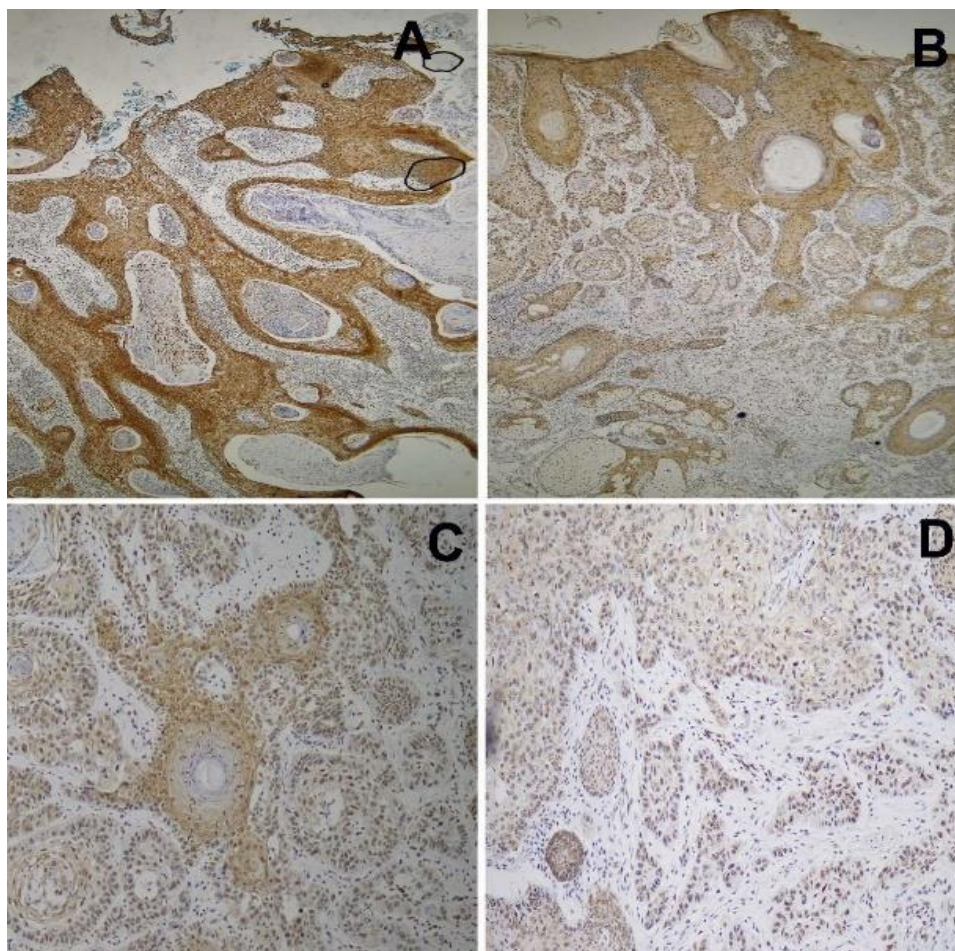


**FIGURA 5 - IP3R em camadas suprabasais no CEC *in situ***

Legenda: Técnica imunoistoquímica para IP3R com aumento de 40X: A) demonstra positividade acentuada ao IP3R em camadas suprabasais em epitélio atípico em quadro de carcinoma *in situ* (seta chanfrada), diferindo do padrão basal *in situ* (seta); B) detalhes da acentuada imunoexpressão do IP3R em epitélio displásico (carcinoma *in situ*).

No CEC invasor todas as células neoplásicas exibiram positividade ao anti-IP3R. A expressão imunoistoquímica ocorreu essencialmente em núcleos e citoplasma da neoplasia. Na profundidade e na frente de invasão, as células exibiam intensa positividade nuclear, e discreta diminuição da matiz acastanhada em citoplasma, embora a área tenha sido considerada positiva. Os padrões de imunomarcção não exibiram diferenças entre CEC considerados bem e moderadamente diferenciados (Figura 6).





**FIGURA 6** – Imunomarcacão de IP3R em CEC bem e moderadamente diferenciado

Legenda: Técnica imunistoquímica para IP3R com aumento de 100X: A) revela padrão de imunomarcacão em CEC bem diferenciado; B) em moderadamente diferenciado verificar padrão similar e acentuada expressão de IP3R para os tumores; C e D) acentuada positividade em CEC bem e moderadamente diferenciado, respectivamente, com acentuada expressão nuclear e positividade discreta em citoplasma.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo estabeleceram, pela primeira vez, uma ligacão entre o nível de expressão do IP3R e o cncer de pele não melanoma (CBC e CEC). Este estudo o primeiro a estabelecer essa correlacão, a qual já é conhecida para outros cnceres, como o glioblastoma, o cncer gastro e o cncer de próstata.

Estudar a expressão tecidual dos 3 subtipos de IP3R é essencial para entender o seu mecanismo de ao. IP3R não é propriedade de uma única organela, sendo distribuído em regiões especializadas de várias membranas intracelulares e no envelope nuclear. A sua presença foi documentada, por exemplo, em núcleo de tecido hepático e em células excitáveis<sup>21</sup>. IP3R é fator chave em muitos mecanismos de oncogenese<sup>22</sup>. O nível de expressão de IP3R3 influencia a capacidade de migracão das células em neoplasias, alterando a assinatura de cálcio. Proto-oncogenes e supressores tumorais controlam inúmeras funoes celulares, como sobrevivência, adaptação e morte celular e tais processos são regulados por  $Ca^{2+}$  do RE, cuja liberação é controlada por IP3R<sup>23</sup>.

É consenso prévio que o IP3R é expresso em várias linhagens celulares e altos níveis de expressão já foram reconhecidos em células proliferativas<sup>24</sup>. Até o momento, papel

preciso para o IP3R3 foi identificado em vários tipos de cânceres epiteliais (carcinoma), incluindo mama<sup>22</sup>, pulmão<sup>25</sup>, fígado<sup>26</sup>, câncer colorretal<sup>27</sup>, bem como glioblastoma<sup>6,11</sup>. Além disso, este canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  foi destacado em estudos genéticos transcriptômicos ou preditivos para tipos de câncer suplementares. Receptores IP3 tipo 3 tem papel no câncer cervical<sup>28</sup>, de cabeça e pescoço<sup>29</sup>, carcinoma de tireoide<sup>30</sup>, bem como em câncer gástrico<sup>31</sup> e em neuroblastoma<sup>32</sup>. Vale salientar que os níveis de expressão de proteínas podem variar fortemente entre linhagens celulares e células primárias.

Uma série de canais iônicos são implicados nos comportamentos migratórios de vários tipos de células cancerosas. A ativação desses canais é frequentemente secundária às mudanças na concentração iônica que geram sinal intracelular promovendo em atividade de canal<sup>33</sup>. Embora o câncer ainda não esteja sendo pautado como canalopatia, está sendo cada vez mais sugerido que os canais iônicos contribuem sua progressão, especialmente por meio de autofagia. Essa perspectiva de interação entre neoplasia, comportamento biológico tumoral e participação de canais iônicos (canalopatias) motiva a procura de expressão de proteínas de canais iônicos que estão associadas à agressividade tumoral, como por exemplo IP3R<sup>11,13</sup>.

No presente estudo foi evidenciado homogêneo padrão de expressão do IP3R em CEC e CBC, os quais também demonstraram perfil de acentuada expressão do IP3R. Pelo fato desses cânceres de pele exibirem padrão totalmente diferente do quadro de expressão basal é imprescindível supor que o IP3R possa ter papel importante na fisiopatologia e na progressão dos cânceres de pele não melanoma.

Embora o número de amostras elegíveis para o presente estudo tenha sido limitado (29 de CEC e 31 de CBC) e o objetivo de associar a imunomarcagem de IP3R às características tumorais deles não ter sido atendido - já que todas as amostras estudadas (100%) apresentaram forte imunomarcagem (marcação em mais de 90% das células tumorais) -, é possível inferir que IP3R tem papel na fisiopatologia do CPNM.

Apesar da correlação entre o IP3R, a liberação de cálcio citosólico e os mecanismos de oncogênese no câncer de pele não melanoma não ter sido identificada neste estudo, a sua expressão, bem como as características da marcação observadas nas células tumorais, tanto em carcinoma basocelular quanto em CEC, apontam para possibilidade da existência de associação também entre a invasividade, grau de diferenciação e agressividade do CPNM. Foi observada perda de expressão na frente de invasão do CBC (em área com células em paliçada) e isso pode sugerir, além de menor chance de invasão, menor risco de metástase, a qual é característica própria do carcinoma basocelular<sup>34</sup>. Vale salientar que tal característica, disposição das células em paliçada, é frequentemente encontrada no CBC nodular<sup>35</sup>. Em contrapartida, áreas de franca invasão mantiveram a expressão do IP3R, marcando atividade/invasão tumoral local. Na presença de células cancerígenas a expressão de IP3R, que promove sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , leva a fenótipo agressivo com o intuito de favorecer a sobrevivência tumoral e permitir a sua expansão<sup>23</sup>. A geração de estruturas migratórias, com características invasivas, depende da regulação de filamentos de actina, condição influenciada por mudanças no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Assim, a ação dos filamentos de actina do citoesqueleto podem ser um dos mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear influencia na motilidade celular<sup>36</sup>. Um papel prognóstico para IP3R3 ou mesmo correlação com a agressividade tumoral especificamente no CPNM, como já observado para glioblastoma<sup>14</sup> ou câncer colorretal<sup>27</sup>, ainda não foi demonstrado. Porém, é razoável especular que o cálcio intracelular e sua regulação pelo IP3R possam desempenhar papel crítico no desenvolvimento de CPNM, da mesma forma que já se faz entendido nas neoplasias citadas anteriormente.

Uma das principais áreas que podem ser direcionadas para o potencial tratamento do câncer é a regulação do metabolismo por meio de IP3R<sup>27</sup>, por estabelecer relação com proteínas relacionadas a vias apoptóticas e antiapoptóticas<sup>23</sup>. O IP3, quando ligado ao receptor, promove a liberação de cálcio do retículo endoplasmático tanto em algumas células do sistema imunológico quanto na membrana plasmática e é por isso que pode haver proliferação, diferenciação e morte celular. Dessa forma, tanto a proteína quanto o receptor podem ser alvos terapêuticos modulando a resposta imune no câncer em que há expressão de IP3R<sup>37</sup>. O metabolismo celular surge como um bom alvo para combater diversos tipos de câncer e sua regulação pelo Ca<sup>2+</sup> parece ser boa opção para desenvolver novos fármacos. O acoplamento de Ca<sup>2+</sup> entre RE e mitocôndrias é fundamental para entender melhor o papel dessa via em fenômenos como como angiogênese, metástase, quimiorresistência e recidiva do câncer<sup>38,39</sup>. E, quando se refere ao CBC e CEC, a chance de recorrência é alta, principalmente em áreas de alto risco, como a face, ou quando tratados de maneira inadequada<sup>40</sup>.

Mais estudos se fazem necessários sobre este assunto no CPNM, porém a forte expressão de IP3R identificada nestas neoplasias, neste estudo, apontam para a possibilidade de associação. O fato de que as células cancerígenas se tornam dependentes do cálcio mediado por IP3R, sendo a desregulação dos sinais de Ca<sup>2+</sup> intracelulares essencial para a sobrevivência e para o desenvolvimento do tumor<sup>41</sup>, também justificam essa observação. Esses fatores culminam em resistência à apoptose e expressão gênica alterada favorecendo a proliferação, e é por isso que vários medicamentos, cujo mecanismo de ação é impedir o influxo de cálcio nas células, já são usados. Eles têm o intuito de bloquear ou retardar o crescimento tumoral, por exemplo, em carcinoma pulmonar, melanoma, câncer de cólon e próstata.

Sendo assim, futuramente, a expressão de IP3R em câncer de pele não melanoma pode se relacionar a uma nova ferramenta de abordagem terapêutica conservadora. Para tal, se faz necessário o entendimento do real papel dos efeitos da ligação de proteínas a receptores específicos, dentre eles o IP3R, e o consequente fluxo iônico transmembrana, os quais culminam em uma série de funções celulares fisiológicas e em células cancerígenas levando a crise metabólica e bioenergética que termina com a morte celular<sup>42,43</sup>.

Apesar da indicação para o tratamento de CPNM em áreas de alto risco ser, até o momento, principalmente a cirurgia, acredita-se que, futuramente, assim como já acontece para outras neoplasias e também com câncer de pele no âmbito de desenvolvimento de imunoterapia, seja possível a utilização de abordagens mais conservadoras, cujo principal benefício será evitar mutilação/desconfiguração e/ou perda de funcionalidade principalmente em áreas nobres, como, por exemplo, na face. Além disso, tal compreensão pode se estender para a abordagem de lesões pré-cancerosas, como as queratoses actínicas, com o intuito de prevenir a evolução para o CPNM.

## CONCLUSÃO

Houve imunolocalização de IP3R em células tumorais tanto em CBC quanto em CEC de pele, e a mesma ocorreu em todo o corpo da neoplasia, diferentemente do observado no controle interno da pele normal, onde a imunolocalização ocorreu em células basais, em folículos pilosos e em glândulas sebáceas.

## REFERÊNCIAS

1. Peters JM, Gonzalez FJ. The evolution of carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2018;165(2):272-6.
2. Gatenby RA, et al. Integrating genetic and nongenetic drivers of somatic evolution during carcinogenesis: The biplane model. *Evol Appl.* 2020;13(7):1651-9.
3. Sinjab A, et al. Field carcinogenesis in cancer evolution: What the cell is going on? *Cancer Res.* 2020;80(22):4888-91.
4. Amaro A, Chiara S, Pfeffer U. Molecular evolution of colorectal cancer: from multistep carcinogenesis to the big bang. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(1):63-74.
5. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(7):511-8.
6. Brennan CW, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013;155(2):462-77.
7. Naik PP, Desai MB. Basal cell carcinoma: A narrative review on contemporary diagnosis and management. *Oncol Ther.* 2022;10:317-35.
8. Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(4):395-401.
9. Weber MB, et al. Carcinoma espinocelular avançado e imunoterápicos: novas perspectivas terapêuticas. *Surg Cosmet Dermatol.* 2021;13:e20210023.
10. Miyauchi JT, Tsirka SE. Advances in immunotherapeutic research for glioma therapy. *J Neurol.* 2018;265(4):741-56.
11. Prevarskaya N, et al. Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev.* 2018;98(2):559-621.
12. Moreau M, Leclerc C. Ionic messengers in development and cancer. *Int J Dev Biol.* 2015;59(7-9):257-60.
13. Makena MR, Rao R. Subtype specific targeting of calcium signaling in breast cancer. *Cell Calcium.* 2020;85:102-9.
14. Kang R, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18:571-80.
15. Rosa N, et al. Type 3 IP3 receptors: The chameleon in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020;351:101-48.
16. Sneyers F, et al. Type 3 IP3 receptors driving oncogenesis. *Cell Calcium.* 2020;86:102141.
17. McKnight NC, Zhenyu Y. Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(4):231-8.
18. Li P, et al. Beclin 1/Bcl-2 complex-dependent autophagy activity modulates renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury and mediates renoprotection by Klotho. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;318(3):F772-F792.
19. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:109-26.
20. Kurtkaia-Yapicier Ö. P53 in nonneoplastic central nervous system lesions: an immunohistochemical and genetic sequencing study. *Neurosurgery.* 2002;51:1246-55.
21. Nicotera P, et al. An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(17):6858-62.
22. Akl H, Bultynck G. Altered Ca(2+) signaling in cancer cells: proto-oncogenes and tumor suppressors targeting IP3 receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(2):180-93.
23. Ivanova H, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death



- and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(10):2164-83.
24. Szatkowski C, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> signalling is involved in estradiol-induced breast cancer epithelial cell growth. *Mol. Cancer*. 2010;9:156.
  25. Iommelle F, et al. Inositol Trisphosphate Receptor Type 3-mediated Enhancement of EGFR and MET Cotargeting Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer Detected by 18F-fluorothymidine. *Clin Cancer Res*. 2018;24(13):3126–36.
  26. Guerra MT, et al. Expression of the type 3 InsP3 receptor is a final common event in the development of hepatocellular carcinoma, *Gut*. 2019;68:1676-87.
  27. Shibao K, et al. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium*. 2010;48:315–23.
  28. Yang Y-G, et al. ITPR3 gene haplotype is associated with cervical squamous cell carcinoma risk in Taiwanese women. *Oncotarget*. 2017;8(6):10085–90.
  29. Lui VWY, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013;3(7):761-9.
  30. Singh SS, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2018;37(9):1142-58.
  31. Sakakura C, et al. Possible involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers. *Anticancer Res*. 2003;23:3691-7.
  32. Florea AM, et al. Calcium-regulatory proteins as modulators of chemotherapy in human neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(14):22876-93.
  33. Carbone E, Mori Y. Ion channelopathies to bridge molecular lesions, channel function, and clinical therapies. *Pflugers Arch*. 2020;472(7):733-8.
  34. Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):292-305.
  35. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology*. 2006;19(Suppl 2):127-47.
  36. Furukawa R, et al. Calcium regulation of actin crosslinking is important for function of the actin cytoskeleton in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 1):187-96.
  37. Akimzhanov AM, Boehning D. IP3R function in cells of the immune system. *Wiley Online Library*. 2012;1(3):329-39.
  38. Bustos G, et al. Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Calcium Communication and the Regulation of Mitochondrial Metabolism in Cancer: A Novel Potential Target. *Front Oncol*. 2017;7:.
  39. Giovanini AF, et al. Immunolocalization of IP3R and V-ATPase in Ameloblastomas. *Head Neck Pathol*. 2020;14(2):392-8.
  40. Cerci FB, Kubo EM, Werner B. Comparação entre os subtipos de carcinomas basocelulares observados na biópsia pré-operatória e na cirurgia micrográfica de Mohs. *An Bras Dermatol*. 2020;95(5):594-601.
  41. Ahumada-Castro U, et al. In the right place at the right time: Regulation of cell metabolism by IP3R-mediated inter-organelle Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:629522.
  42. Silva-Pavez E, et al. Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria: a spark of life in unexpected conditions. *Mol. Cell. Oncol*. 2020;8(1):1839341.
  43. Gruber CR, Giovanini AF, Skare T, Rastelli GJC, Kubrusly LF, Sigwalt MF, et al. NON-MELANOMA SKIN CANCER: AN INTEGRATIVE REVIEW. *SciELO Preprints*. 2024. DOI: 10.1590/SciELOPreprints.7766

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.