



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

João Rafael Habib Souza Aquime

**EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E SUA INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO
BIOLÓGICO *IN VITRO* DO CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE**

Belém-Pa

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

João Rafael Habib Souza Aquime

**EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E SUA INFLUÊNCIA NO COMPORTAMENTO
BIOLÓGICO *IN VITRO* DO CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Pará como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

Belém-Pa
2017

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, **Michel e Regina Maura**, por serem minha fonte inesgotável de inspiração e incentivo. À minha irmã **Rafaele**, por ser minha companheira e o ombro amigo dos momentos bons e ruins. À minha Vó **Nazaré**, que permanecerá viva nas minhas lembranças e no meu coração para sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por guiar minha vida pelos melhores caminhos; por todo o aprendizado proporcionado nas horas difíceis e também por toda a alegria dos bons momentos, como o de conseguir defender minha dissertação de mestrado. Obrigado por sempre me fazer lembrar que sou mais forte do que imagino.

À minha santinha do coração, **Nossa Senhora de Nazaré**, por todas as graças alcançadas e pela proteção materna que exerce em minha vida.

Aos meus pais, **Michel Aquime e Regina Maura Aquime**, por serem meus espelhos de vida e sonharem junto comigo. Nunca poderei agradecer o suficiente por todo o apoio dado a mim em todas as etapas da minha vida. A vocês minha gratidão eterna não somente por terem me concedido a vida, mas por todos os ensinamentos repassados e também por sempre terem financiado meus estudos, os colocando em primeiro lugar. Saibam que minha felicidade é poder vê-los orgulhosos e satisfeitos com minhas conquistas. Obrigado pela paciência, força e principalmente pelo amor direcionado a mim.

À minha irmã **Rafaele Aquime**, pelo exemplo de força e determinação. Saiba que toda confiança depositada e cada palavra de incentivo serviram como um empurrão nessa batalha que agora chega ao fim. Obrigado por todo amor e parceria desde sempre e por exercer muito bem o papel de irmã mais velha, servindo de espelho para o caçula aqui. Agradeço ainda pela parceria de vida, comemorando minhas conquistas como se fossem suas, e por todo o incentivo nas horas difíceis.

Aos meus avós **Nazaré, Hélio, João, Sônia e Lourdes**, obrigado por todo o amor e por todas as lições de vida repassadas. À minha madrinha **Renata Souza**, por confiar no meu potencial e por sempre me incentivar a seguir em frente. À minha tia **Cristina Souza**, por me tratar como filho e me encorajar sempre a ter muita fé. À minha prima **Camila Souza**, por estar sempre presente nas minhas conquistas e por saber de toda sua torcida pelo meu sucesso. E também a todos meus familiares, pelo o amor e a compreensão nos momentos de ausência. Agradeço, ainda, por serem a base onde sei que posso me apoiar.

À **Universidade Federal do Pará**, por todas as oportunidades concedidas e por permitir que eu ingressasse no curso de Odontologia. Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em nome de seus funcionários e professores, por todos os serviços prestados e conhecimentos repassados. Ao **Laboratório de Cultivo Celular**, por todo o aprendizado desenvolvido, desde a graduação, em pesquisa na Odontologia.

Um agradecimento especial ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro**, que desde o início acreditou no meu potencial, até mesmo quando eu duvidava. Muito obrigado por toda paciência em ensinar até o que parecia ser mais irrelevante possível e pela inteira disponibilidade e dedicação em desenvolver este trabalho, sempre contribuindo

para que ele se tornasse melhor. Agradeço por toda compreensão e por ser minha fonte de inspiração profissional.

Agradeço de maneira especial à minha co-orientadora **Profa. Dr^a. Maria Sueli da Silva Kataoka**, pelo exemplo de professora e também pela confiança depositada. Obrigado também pela indispensável ajuda na confecção desse trabalho, corrigindo cada detalhe, e ainda, pela amizade e carinho desenvolvido nesses anos de convívio diário.

À amiga **Lara Pinto**, por ter ingressado junto comigo neste desafio que é trabalhar em cultivo de células. Erramos juntos, acertamos juntos, e o mais importante: aprendemos juntos. E também agora, ambos somos Mestres. Obrigado pela parceria desenvolvida e por todo o apoio nos momentos de dificuldade.

À **Aline Semblano**, por ter sido minha primeira fonte de conhecimentos práticos em cultivo celular. Obrigado por todos os ensinamentos transmitidos, os quais foram essenciais para o meu crescimento no laboratório. Ao restante da equipe do laboratório, representado por **Aline, Caio, Dimitra, Felipe, Geovanni, Giordanna, Hudson, Joyce, Malu, Raissa e Thaianna**, agradeço pelo trabalho coletivo desenvolvido, o qual foi indispensável para a realização desse trabalho. Além disso, obrigado também por todos os momentos diários de descontração, que contornaram todas as dificuldades.

Ao **Prof. Dr. Ruy Jaeger**, pela recepção em seu laboratório de biologia tumoral, possibilitando o aprendizado de novos experimentos. À **Adriane Siqueira**, por todo carinho e por se dispor a ensinar de maneira tão solícita sempre.

Aos irmãos que pude escolher ao longo da vida: meus amigos. Muito obrigado por toda a alegria compartilhada nos momentos juntos e pela torcida que sempre direcionaram para minha carreira.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

SUMÁRIO

1. Capítulo 1: Expressão de metalotioneína e sua influência no comportamento biológico <i>in vitro</i> do carcinoma mucoepidermoide	8
1.1. Resumo	10
1.2 Introdução	11
1.3 Material e Métodos.....	12
1.4 Resultados.....	17
1.5 Discussão.....	19
1.6 Conclusão	22
1.6 Referências	23
2. Capítulo 2: Metallothionein expression and its influence on the <i>in vitro</i> biological behavior of mucoepidermoid carcinoma	28
2.1 Abstract	30
2.2 Introduction	31
2.3 Results	32
2.4 Discussion	34
2.5 Materials and Methods	37
2.6 Abbreviations	41
2.7 Acknowledgements	42
2.8 Conflicts of interest and funding	42
2.9 References	42
2.10 Table	45
2.11 Legends	46
3. Figuras	47
4. Normas para revista Oncotarget	52
Anexo 1	57

Capítulo 1: Expressão de metalotioneína e sua influência no comportamento biológico *in vitro* do carcinoma mucoepidermoide

João Rafael Habib Souza Aquime

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará- UFPA, Belém-PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

Lara Carolina D'Araújo Pinto

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará- UFPA, Belém-PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

Maria Sueli da Silva Kataoka

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará- UFPA, Belém-PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade do Estado do Pará - UEPA, Belém-PA, Brasil. Travessa Perebebuí, 2623. Belém, PA, 66087-670, Brasil. Núcleo de Análise Genética por Imagem, Centro de Inovações Tecnológicas, Instituto Evandro Chagas – IEC, Ananindeua-PA, Brasil. Rodovia BR-316 km 7 s/n. Ananindeua, PA, 67030-000, Brasil.

Ruy Gastaldoni Jaeger

Departamento de Biologia Celular e de Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brasil.

João de Jesus Viana Pinheiro

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará- UFPA, Belém-PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil. Departamento de Biologia Celular e de Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brasil.

Autor Correspondente:

João de Jesus Viana Pinheiro

Endereço:

Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

Avenida Augusto Corrêa, 01. Belém PA, 66075-110, Brazil.

Phone number: 55-91-32017563

Fax number: 55-91-32017563

E-mail: radface@hotmail.com

RESUMO

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais prevalente, demonstrando índices relevantes de recorrência e metástases à distância, em virtude da elevada capacidade invasiva de suas células, provavelmente favorecida pela atuação da metalotioneína (MT), uma proteína armazenadora de zinco, responsável em fornecer esse elemento para a atuação de proteases e para a ocorrência da síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Dessa forma, objetivou-se caracterizar uma linhagem celular derivada dessa neoplasia, assim como correlacionar a expressão de MT com o Fator de Crescimento Transformador- α (TGF- α), com o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e com as Metaloproteinases da Matriz (MMPs). O ensaio de imunofluorescência indireta foi realizado para detectar a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais na linhagem. Adicionalmente, uma análise citogenética foi feita para verificar as alterações cromossômicas celulares. A diminuição na expressão do gene metalotioneína-2A foi alcançada por RNA de interferência, e posteriormente, realizou-se Western Blot para correlacionar o silenciamento da metalotioneína com a expressão dos fatores de crescimento e MMPs. A linhagem derivada de CME expressou as citoqueratinas 19 e AE1/AE3, fibronectina, vimentina e α -actina-músculo liso. Avaliação citogenética evidenciou diversas alterações estruturais e numéricas, dentre as quais a translocação t(11;19) (q21;p13), característica do CME. Após RNA de interferência, visualizou-se uma expressão diminuída de TGF- α e MMP-9, enquanto que o TNF- α tornou-se mais expresso e a MMP-2 manteve sua expressão inalterada. Com os resultados, sugerimos que a MT apresenta papel relevante na invasão tumoral do CME, visto que interfere na expressão de proteínas envolvidas nesse mecanismo.

Palavras-chave: carcinoma mucoepidermoide; metalotioneína; metaloproteinases da matriz; matriz extracelular.

INTRODUÇÃO

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais prevalente, representando cerca de 30% de todos os tumores malignos que acometem as glândulas salivares maiores [1]. Clinicamente, apresenta-se frequentemente como um aumento de volume assintomático ocorrendo frequentemente na glândula parótida e demonstra índices relevantes de recorrência local e metástase à distância, estando esse comportamento relacionado ao grau histológico do tumor, como confirmado em alguns estudos retrospectivos [2], à diferenciação celular, espaços císticos e atipia celular [3]. Histologicamente, o CME apresenta três populações celulares: mucosas, intermediárias e epidermoides, estando o subtipo celular predominante diretamente relacionado com a classificação do tumor em baixo, intermediário ou alto grau de malignidade, e assim, com o seu prognóstico [3].

Células tumorais com atividade invasiva conseguem alcançar tecidos subjacentes e assim, são mais difíceis de serem completamente removidas em tratamentos cirúrgicos, podendo interferir diretamente no desenvolvimento de recidivas e metástases à distância do tumor. A capacidade de invasão de tumores de glândulas salivares já foi demonstrada em alguns estudos e relacionada a eventos de proteólise localizada da matriz extracelular, migração e invasão celular [4]. A atividade proteolítica da matriz, que promove um espaço físico para que as células atinjam tecidos mais profundos, tem sido atribuída à uma família de enzimas zinco-dependentes denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs). O resultado dessa proteólise localizada possivelmente libera fatores de crescimento (FC) que, por sua vez, ativam vias de sinalização celular, resultando em maior atividade proliferativa da linhagem. Ademais, os FC são capazes ainda de promover a secreção de MMPs, formando assim um ciclo favorável ao mecanismo de invasão tumoral [5]. Tais eventos podem ocorrer com a contribuição de uma proteína intracelular de baixo peso molecular denominada metalotioneína (MT), por funcionar como armazenadora de zinco [6], um elemento necessário para a atuação de proteases e também para que ocorra a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, elevando a atividade metabólica e a proliferação celular [7], agravando assim, o prognóstico do tumor. Além disso, a superexpressão de metalotioneína tem sido incessantemente relacionada ao prognóstico desfavorável de tumores oriundos do pulmão, pâncreas, próstata, e também, da cavidade oral [8]. Pacientes com carcinoma de células escamosas que apresentavam expressão acentuada de metalotioneína possuíam sobrevida significativamente menor em relação àqueles com menor expressão dessa proteína [9].

A presença e a relação da MT com o prognóstico de carcinomas epidermoides já foi demonstrada anteriormente [9], mas pouco se sabe sobre a sua participação nos processos de invasividade no carcinoma mucoepidermoide, e haja vista a semelhança histopatológica entre esses dois tumores, levanta-se a possibilidade de a metalotioneína também estar presente e participar da tumorigênese do CME. Além disso, essa proteína tem sido associada à proteção

das células tumorais contra quimioterapia e radioterapia, desenvolvendo uma resistência neoplásica a esses tratamentos [10]. Pesquisas recentes demonstraram que a expressão de algumas isoformas dessa proteína, especialmente a metalotioneína-2A (MT-2A), tem correlação com a proliferação celular e clínico-patológica em algumas neoplasias [11, 12]. Adicionalmente, a MT-2A tem sido considerada um importante marcador prognóstico no câncer de mama, estando sua presença associada a um comportamento ainda mais agressivo e invasivo dos tumores [12].

A invasão tumoral no carcinoma mucoepidermoide possivelmente é um processo complexo mediado, dentre outros fatores, tanto pela proliferação celular quanto pela proteólise localizada da matriz extracelular. O estímulo para a proliferação ocorre através da ação de fatores de crescimento, como o TGF- α (Fator de Crescimento Transformador- α), pelo fato de ser biosintetizado em células de carcinomas de glândulas salivares, possivelmente atuando como um agente pró-mitótico para a proliferação celular [13]. No entanto, sabe-se que além de fatores estimulatórios, o crescimento tumoral envolve ainda fatores inibitórios [14], que visam conter o desenvolvimento neoplásico. Entre esses agentes, destaca-se o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), uma citocina multifuncional envolvida no evento de apoptose celular. Ainda que pesquisas já tenham demonstrado sua baixa expressão em fibroblastos e células tumorais em razão de atuar contrariamente à progressão do tumor [15], justifica-se o seu estudo no CME e a investigação de sua relação com a metalotioneína pelo fato de esta última, além de atuar como agente pró-mitótica, ter ainda ação anti-apoptótica em neoplasias [16].

As MMPs, por sua vez, são endopeptidases responsáveis pela remodelação tecidual, especialmente pela degradação dos componentes da matriz extracelular, incluindo colágenos, elastina, gelatina e proteoglicanos [17], permitindo assim, o avanço das células tumorais até a corrente sanguínea. Por essa razão, são consideradas essenciais para a invasão e metástase em várias neoplasias. Dentre todas, destacam-se as gelatinases MMPs -2 e -9, por degradarem o colágeno tipo IV, um dos principais componentes da matriz extracelular [4]. Estudos comprovaram que a presença de MMP-2 e MMP-9 está relacionada ao comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares [18].

Sendo assim, este trabalho caracterizou uma linhagem celular derivada de carcinoma mucoepidermoide e correlacionou a expressão da metalotioneína com fatores de crescimento e com as metaloproteinases da matriz.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, sob o parecer de número 358.227.

Cultivo Celular

A linhagem celular derivada de CME humano foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco/ mistura nutriente F12 (DMEM-F12 - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, CA, USA) e 2mM de glutamina (Sigma®), 3mM de bicarbonato de sódio (Sigma®), 100UI/mL de penicilina (Gibco®), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 2,5µg/mL de anfotericina B (Gibco®). As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Imunofluorescência Indireta

Células de CME foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços fixadas em paraformaldeído a 2% e permeabilizadas com solução de Triton X-100 (Sigma®) a 0,05%. Posteriormente foram bloqueadas com 10% de soro de cabra e incubadas com anticorpos primários em PBS/BSA a 1% (*do inglês Phosphate Buffered Saline/ Bovine Serum Albumin*) e anticorpos secundários conjugados à AlexaFluor 488 ou 588 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Os anticorpos primários utilizados foram: Anti-vimentina, monoclonal feito em camundongo (1:100, Dako Corp., Glostrup, Denmark), Anti- α actina músculo liso (1:100, Dako®), Anti-fibronectina (1:100, Dako®), Anti-citoqueratina AE1/AE3 (1:50) e 19 (1:100), monoclonais feitos em camundongo (Dako®). Os núcleos foram marcados com Hoechst 33258 (Sigma®). As células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Scope.A1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), equipado com câmera fotográfica digital (Axiocam MRc, Zeiss®). Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário.

Análise Citogenética Convencional

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de células cultivadas em frascos com área de 25cm², onde se adicionou 0,1ml de colchicina a uma concentração de 0,0016% por uma hora. Após isso, o material foi transferido para tubo de centrifuga e submetido às etapas de hipotonização com solução de KCl (0,56%) e fixação com fixador de Carnoy (3 partes de metanol:1 parte de ácido acético glacial). Posteriormente, a suspensão celular foi gotejada em lâminas de vidro, deixando-as secar em temperatura ambiente. As lâminas com o material fixado foram então coradas com solução de Giemsa (Merck SA, RJ, Brasil) e submetidas à técnica de bandeamento G [19, 20], com solução de Wright (Sigma®), para a identificação das alterações cromossômicas numéricas e estruturais.

As lâminas processadas foram visualizadas em foto microscópio modelo Axiophot (Zeiss®) e capturadas usando-se uma câmera fotográfica digital modelo Axiocam (Zeiss®), acoplada ao microscópio, com objetiva de imersão (100x) e ocular de 10x. Para a análise das células utilizou-se o sistema de software Bandview (BandView associado ao Case Data

Manager (CDM) e ao software Karyotyping). Os cromossomos foram montados considerando-se a morfologia e a ordem decrescente de tamanho.

Análise Transcriptômica

A análise dos transcritos RNA mensageiros (RNAm) foi realizada nas seguintes etapas:

Extração e captura do RNAm – Foram utilizadas 5×10^4 células de cada linhagem, separadas em tubos diferentes. Cada tubo foi centrifugado a 16000 rpm/10 min e o meio de cultivo desprezado. Após lavagem com PBS 1X e nova centrifugação, as células foram expostas ao tampão de lise (Lyses/Binding Buffer, Life Technologies AS, Oslo) e ao sistema Beads (Dynabeads® Oligo (dT)₂₅, Life Technologies AS, Oslo) durante 5 min/25°C em agitação suave. Após a captura inicial, os tubos foram colocados em estante magnética para separação por 1 min; foram realizadas purificações com tampões de lavagem A e B (Washing Buffer A e Washing Buffer B, Life Technologies AS, Oslo), seguindo orientações do fabricante. As beads foram expostas ao tampão de aluição para separação destas dos filamentos de RNAm (Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit Life). As amostras foram quantificadas (Qubit® RNA HS Assay Kit e Qubit® 2.0 Fluorometer Kit, Life Technologies) e armazenadas a -80°C.

Amplificação PCR – Após a extração de RNAm foi realizada a amplificação das amostras através do método PCR. Para isso, os filamentos recém adquiridos precisaram ser fragmentados em outros menores que viabilizassem a análise transcriptômica (100 a 150 pares de base) em ciclos de alta temperatura e ação enzimática. Após isso, os fragmentos foram hibridizados e expostos à transcrição reversa para a formação de filamentos complementares de DNA (cDNA). As amostras foram purificadas a cada etapa, seguindo as normas do fabricante (Ion Total RNA-Seq Kit v2, Life Technologies Austin, USA). A cada filamento cDNA foi feita a ligação enzimática de adaptadores específicos, imersos em solução tampão. A partir disso, Primers de PCR foram utilizados para criar cópias dos filamentos em ciclos de 30 e 40 min sob altas temperaturas (B) Ion Total RNA-Seq Primer v2, Life Technologies Austin, USA). As bibliotecas transcriptômicas foram purificadas e quantificadas novamente (Qubit® RNA HS Assay Kit e Qubit® 2.0 Fluorometer Kit, Life Technologies). Para confirmar este processo, as amostras foram carregadas em gel de Acrilose 1% com brometo e submetidas a eletroforese 100V/10 min. Bandas confirmaram o tamanho dos filamentos após exposição a luz azul.

Genoma de Referência: neste trabalho foi utilizada a referência de *Homo sapiens*, GRCh38.p4, disponível no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O arquivo genbank de *Homo sapiens* foi acessado através do programa Artemis (Rutherford et al., 2000), para se gerar o arquivo fasta, contendo a sequência de nucleotídeos de todos os cromossomos, e o arquivo GFF com a anotação dos cromossomos. *Mapeamento das leituras:* o programa TMAP (<https://github.com/iontorrent/TS/tree/master/Analysis/TMAP>) foi utilizado para realizar o mapeamento das leituras contra a referência. Nesta etapa, os arquivos fasta de cada

cromossomo de *Homo sapiens* foram utilizados como referência e assim foi realizado um mapeamento das leituras de cada condição contra cada cromossomo, utilizando os parâmetros padrões do TMAP. Como resultado, para cada cromossomo e condição, foi gerado um arquivo de mapeamento no formato SAM. Os arquivos sam foram convertidos para o formato bam ordenado utilizando o programa samtools (<http://www.htslib.org/>).

Expressão diferencial de genes: A análise da expressão diferencial foi realizada pelo programa Cuffdiff (Trapnell et al., 2012) que utiliza como entrada uma referência fasta, uma anotação e o resultado dos alinhamentos, das leituras contra a referência, no formato BAM ordenado. Na identificação dos genes diferencialmente expressos foi realizada uma análise individual para cada um dos cromossomos nas condições analisadas. Como resultado do programa Cuffdiff, foi gerada uma lista com as informações dos genes caracterizados como diferencialmente expressos. Estes resultados foram unidos gerando uma lista com todos os genes diferencialmente expressos para todos os cromossomos das amostras.

Ensaio de migração

Para avaliar se a proteína metalotioneína (MT2A) tem influência na migração das células CME, empregou-se o sistema de câmaras bipartites de 10 poços (NeuroProbe, Inc, Gaithersburg, USA) utilizando membrana de policarbonato porosa. Poços da câmara inferior foram preenchidos com DMEM-F12 (Sigma®) e 10% de soro fetal bovino (Gibco®). Células com a expressão de metalotioneína reduzida por RNA de interferência (10×10^4 células/poço), e ressuspendidas em meio sem soro, foram colocadas na câmara superior sobre a membrana. As câmaras foram então incubadas por 24h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, removeu-se a membrana da câmara e sua porção superior, sobre a qual as células foram cultivadas, e delicadamente raspou-se para a remoção de células que não migraram, restando assim somente as células que migraram, localizadas na face inferior da membrana. Essas células foram fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em metanol a 20%. A aquisição de imagens utilizando máquina digital (AxioCam MRc, Zeiss) acoplada ao microscópio (aumento final de 500x) permitiu a contagem das células que migraram. Como controle foram utilizadas: 1) células transfectadas com RNAi controle com DMEM-F12 contendo 10% de SBF no poço inferior; 2) células não transfectadas com DMEM-F12 contendo 10% de SBF no poço inferior; 3) células não transfectadas com DMEM-F12 sem SFB no poço inferior.

Ensaio de invasão

Para avaliar se a proteína metalotioneína (MT2A) induz fenótipo invasivo nas células CME, empregou-se o sistema de câmaras bipartites de 10 poços (NeuroProbe®)

utilizando membrana de policarbonato porosa coberta por 5µL de matrigel (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) na concentração de 14µg/mL. Poços da câmara inferior foram preenchidos com DMEM-F12 (Sigma®) e 10% de soro fetal bovino (Gibco®). Neste experimento, células com a expressão de metalotioneína reduzida por RNA de interferência (15×10^4 células/poço), foram ressuspensas em meio sem soro, e colocadas na câmara superior sobre a membrana coberta por matrigel. Incubou-se então a câmara por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, para que pudesse ocorrer a digestão do matrigel e invasão das células da câmara superior para a inferior. Após esse período, a membrana foi removida e sua porção superior delicadamente raspada para a remoção de células que não invadiram e dos restos de matrigel. As células localizadas na porção inferior foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de violeta cristal a 0,2% em metanol a 20%. A aquisição de imagens utilizando máquina digital (AxiocamMRc, Zeiss) acoplada ao microscópio (aumento final de 500x) permitiu a contagem das células que invadiram. Como controle foram utilizadas: 1) células transfectadas com RNAi controle com DMEM-F12 contendo 10% de SFB no poço inferior; 2) células não transfectadas com DMEM-F12 contendo 10% de SFB no poço inferior; 3) células não transfectadas com DMEM-F12 sem SFB no poço inferior.

RNA de Interferência (siRNA)

As células derivadas de CME (2×10^5) foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 60-80% de confluência em meio DMEM-F12 com 10% de SFB sem antibiótico e antimicótico. A seguir, meio de transfecção (Optimen, Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen®) e RNAi para MT-2A (Life Technologies, New York, USA), na concentração de 40 nM (nanomolar), foram misturados e incubados de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, outro grupo de células foi transfectado com 40 nM de siRNA de seqüência “scrambled” (composição de propriedade da Santa Cruz), que não induz degradação de qualquer mensagem celular. A confirmação da transfecção foi demonstrada por western blot.

Western Blot

Células de CME transfectadas com siRNA para MT-2A e controle foram lisadas em tampão RIPA (150 mM de NaCl, NP-40 a 1%, deoxicolato a 0,5%, SDS a 0,1% e 50 mM de Tris pH 8,0) contendo inibidores de protease. As amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida a 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham®), bloqueadas com 5% de leite desnatado em 0,05% de Tween-20 em TBS (do inglês “*Tris-buffered saline*”) e incubadas com os anticorpos primários MT 1,2 (Abcam®), TGF-α (Santa Cruz®), TNF-α (Sigma®), MMPs -2 (Millipore®) e -9 (DBS®) e β-actina (Sigma®). Posteriormente, empregou-se um anticorpo secundário conjugado com peroxidase

(Amersham®) e um protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham®) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos. Para possibilitar a análise com diferentes anticorpos, as membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Thermo®) e submetidas à novas marcações.

RESULTADOS

Linhagem celular derivada de CME expressa marcadores epiteliais e mesenquimais

No ensaio de imunofluorescência indireta as células expressaram as citoqueratinas AE1/AE3 e 19, ambas com característica puntiforme na região citoplasmática das células (Fig. 1A-B). Observou-se ainda que a linhagem apresentou marcação filamentosa para fibronectina, vimentina e α -actina músculo liso (Fig. 1C-E).

Análise citogenética convencional revela alterações numéricas e estruturais

Avaliou-se um total de 38 metáfases, onde diversas alterações numéricas e estruturais foram visualizadas nas células derivadas de CME. Dentre as numéricas, verificou-se a presença de nulissomia no cromossomo 15, monossomia nos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 22 e X, além de trissomia nos cromossomos 11, 12, 20 e 21, e ainda, de tetrassomia nos cromossomos 11, 12, 18 e 20, algumas dessas descritas na figura 2A. Alterações cromossômicas estruturais como deleção de parte do braço longo de um dos cromossomos do par 4 e a fissão cêntrica de um dos cromossomos do par 1 também foram visualizadas. A translocação $t(11;19)(q21;p13)$, característica do CME, também estava presente (Figura 2B).

Silenciamento do gene MT2A diminui a expressão de TGF- α e MMP-9 e aumenta a expressão de TNF- α

O ensaio de western blot permitiu constatar a expressão das proteínas de interesse, assim como verificar a eficácia da técnica que objetivava diminuir a expressão da proteína metalotioneína, sendo possível observar uma redução na expressão desta proteína quando comparada ao grupo controle na concentração de 40nM, por meio do seu peso molecular de 6kDa (Fig. 3A e 4A).

Com o silenciamento do gene para MT-2A, observou-se que o TGF- α teve sua expressão reduzida (Fig.3B), enquanto que o TNF- α tornou-se mais expresso (Fig. 3C). O controle interno de carregamento das amostras foi realizado utilizando β -actina (Fig. 3D e 4D).

Em relação às proteases estudadas, verificou-se que a MMP-2 manteve sua expressão inalterada (Fig. 4B), enquanto que a MMP-9, seguindo o silenciamento da MT, teve sua expressão diminuída (Fig. 4C).

Expressão reduzida de MT-2A diminuiu atividade migratória da linhagem derivada de CME

No experimento avaliou-se a atividade migratória das células silenciadas para o gene MT-2A e das células transfectadas com a sequência “scrambled”, que não induz qualquer tipo de alteração nas mensagens celulares (Figuras 5A e 5B, respectivamente). Como controles do ensaio de migração utilizaram-se células não submetidas ao RNAi em poços distintos contendo DMEM + 10%SFB (Controle positivo) e apenas DMEM (Controle negativo), conforme demonstrado nas figuras 5C e 5D, respectivamente.

A análise estatística demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre o número de células migradas no grupo RNAi comparado ao grupo controle do RNAi (CRNAi), assim como entre o grupo RNAi e o controle positivo do experimento (Figura 6), sugerindo que o silenciamento do gene MT-2A nas células derivadas de CME reduziu, *in vitro*, a atividade de migração da linhagem.

Expressão reduzida de MT-2A diminuiu atividade invasiva da linhagem derivada de CME

Neste experimento avaliou-se a atividade invasiva das células silenciadas para o gene MT-2A e das células transfectadas com a sequência “scrambled” (Figuras 7A e 7B, respectivamente). O ensaio de invasão diferencia-se do ensaio de migração pela adição de matrigel, uma substância que mimetiza a membrana basal, a primeira barreira que deve ser degradada pelas células que apresentam fenótipo invasivo, para que possam alcançar tecidos mais profundos *in vivo*. Como controles, utilizaram-se células não submetidas ao RNAi em poços distintos contendo DMEM + 10%SFB (Controle positivo) e somente DMEM (Controle negativo), conforme demonstrado nas figuras 7C e 7D, respectivamente.

Assim como no ensaio de migração, a análise estatística demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo RNAi comparado ao grupo controle do RNAi (CRNAi), assim como entre o grupo RNAi e o controle positivo do experimento (Figura 8), sugerindo que o silenciamento do gene MT-2A nas células

derivadas de CME teve influência negativa para a ocorrência da atividade de invasão da linhagem in vitro.

Genes MT-2A e MMP2 são superexpressos na linhagem CME

A análise transcriptômica revelou que o gene MT-2A apresentou o número de *reads* mapeadas significativamente superior na linhagem CME (3789) em relação à linhagem HSG (315). Esses dados reforçam a expressão acentuada de MT-2A em células tumorais e ainda, funcionando como importante marcador prognóstico. O gene MMP2 apresentou, também, uma quantidade de *reads* mapeadas estatisticamente maior no CME (63867) comparado ao HSG (294), denotando uma atuação maior da proteína MMP-2 na linhagem tumoral (Tabela 1).

Genes TNFa e MMP9 são pouco expressos no CME

O gene TNFa não apresentou *reads* mapeadas no CME. Já o MMP9 apresentou apenas 2 *reads* mapeadas nas células derivadas de CME, sugerindo uma discreta participação das proteínas homônimas codificadas nesses genes (Tabela 1).

DISCUSSÃO

O carcinoma mucoepidermoide é uma neoplasia de grande relevância, principalmente pela sua notável prevalência dentre os tumores de glândulas salivares e ainda pelo seu potencial de desenvolvimento agressivo, apresentando índices significativos de recorrência e metástase [1, 2]. Uma maneira amplamente utilizada de tentar compreender o comportamento biológico das neoplasias in vitro tem sido por meio do desenvolvimento de linhagens tumorais. Em nosso trabalho, utilizamos uma linhagem derivada de carcinoma mucoepidermoide humano, caracterizada pela análise da expressão de proteínas celulares, marcadores epiteliais e mesenquimais em ensaios de imunofluorescência indireta, além de estudo citogenético. As citoqueratinas caracterizam células de origem epitelial e sua expressão varia de acordo com o tipo celular, com o seu grau de diferenciação e o nível de desenvolvimento do tecido. Mesmo após a transformação de células normais em células neoplásicas, os padrões de citoqueratinas são mantidos, e por isso, elas são utilizadas como importantes marcadores tumorais [23]. A pancitoqueratina AE1/AE3 identifica as citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16 e 19, muitas já demonstradas em vários tipos de carcinomas [24, 25]. Segundo Azevedo et al.

[26], no CME, as citoqueratinas 7, 8, 14 e 19 são expressas pelas células escamosas, enquanto as populações celulares intermediárias e mucosas expressam principalmente a citoqueratina 7. E, de acordo com os achados da análise transcriptômica, a citoqueratina 7 foi a que mais apresentou *reads* mapeadas na linhagem derivada de CME, sugerindo uma neoplasia com prevalência de células intermediárias e mucosas e, portanto, possivelmente classificada como de grau baixo ao intermediário [3]. Estudos imunohistoquímicos recentes verificaram a marcação de CK-19 em células de origem glandular [27], justificando a expressão dessa citoqueratina na linhagem estudada, derivada de carcinoma mucoepidermoide.

Adicionalmente, a presença de várias moléculas constituintes da matriz extracelular caracteriza sua participação não apenas como componente estrutural dos tecidos, mas também como mediadora na sinalização celular e reguladora nos processos de adesão e migração celular [14]. Neste estudo, verificou-se tanto a imunoexpressão quanto o mapeamento de *reads* para α -actina músculo liso, vimentina e fibronectina na linhagem, indicando a presença de células mesenquimais e mioepiteliais. Estudos já identificaram a presença de células mioepiteliais no CME anteriormente [28, 29]. A presença dessas células na linhagem é reforçada ainda com expressão positiva de α -actina músculo liso, considerada uma excelente ferramenta para a detecção desse tipo celular em tumores de glândulas salivares [30]. Já a vimentina é um filamento intermediário que desempenha importante papel na regulação do citoesqueleto, considerada como marcadora útil de células mesenquimais [31]. Adicionalmente, a vimentina tem sido considerada reguladora da interação entre proteínas do citoesqueleto e moléculas de adesão celular, tendo participação nos processos de adesão, migração, invasão e transdução de sinal em células tumorais [32]. A fibronectina, também expressa na linhagem, é considerada a maior glicoproteína adesiva mesenquimal da MEC e responsável pela adesão célula-célula e célula-matriz. E por essa razão, tem importante influência ainda na migração celular e diferenciação precoce [33], podendo ter essa atuação também no CME.

O processo de invasão tumoral presente no CME, no que diz respeito à atividade proliferativa das células neoplásicas, provavelmente recebe a contribuição de fatores de crescimento presentes na linhagem. Nos resultados alcançados, observou-se a uma baixa quantidade de *reads* mapeados do gene codificador do TGF- α , ratificado pela sua fraca expressão no western blot. A atuação desse fator de crescimento no carcinoma mucoepidermoide tem sido pouco estudada, mesmo já tendo sido demonstrada sua relevância em neoplasias de cabeça e pescoço, inclusive seu papel no desenvolvimento e na progressão do CME [34]. A presença de TGF- α verificada neste trabalho ratifica o resultado encontrado por Gibbons et al. (2001), que demonstraram uma expressão deste fator de crescimento no CME, de maneira mais acentuada do que em outro tumor de glândulas salivares altamente prevalente, o carcinoma adenoide cístico (CAC).

No processo de desenvolvimento tumoral existem ainda proteínas com ações contrárias ao tumor, atuando de forma a tentar conter o avanço da doença, podendo estar

diminuídas ou ausentes na progressão neoplásica. Dentre as quais, verificamos na linhagem derivada de CME a expressão discreta por western blot e nenhum *read* mapeado na análise transcriptômica do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), uma citocina com função de promover a apoptose celular, sendo coerente sua pouca expressão em neoplasias já instaladas [35].

A ocorrência de recidivas e até metástases à distância no CME está relacionada à capacidade de invasão de suas células tumorais até alcançarem tecidos mais profundos, favorecido tanto pela atuação de proteínas que degradam os componentes da matriz extracelular, como as MMPS, quanto por fatores de crescimento que aumentam a proliferação celular. Assim, dificulta-se a total eliminação do tumor e aumenta-se o risco da permanência de células que possam desenvolver a recorrência da doença [4]. Ademais, tem sido investigada a participação de mais uma proteína nesse processo, a metalotioneína, a qual está relacionada ao fornecimento de íons zinco tanto para a ativação de certos fatores de transcrição, favorecendo o aumento de seu potencial proliferativo, quanto para a atuação de proteases participantes da degradação de matriz extracelular [7, 10]. Dessa forma, a expressão da metalotioneína sugere sua provável atuação no mecanismo de invasão tumoral dessa linhagem *in vitro*. Uma isoforma específica desta proteína, a Metalotioneína-2A, tem sido citada em algumas pesquisas recentes como fator prognóstico negativo em algumas neoplasias, estando sua presença associada a um comportamento ainda mais agressivo do tumor [12]. A expressão de MT-2A observada na linhagem, tanto por western blot quanto por análise transcriptômica, pode significar sua participação no comportamento biológico do CME *in vitro*.

Corroborando com nossos resultados, a presença das MMPs -2 e-9 em neoplasias de glândulas salivares e no CME já foi demonstrada anteriormente e associada à maiores taxas de metástase e recidiva da doença, já que a função dessas proteases é promover a degradação de vários constituintes da matriz extracelular [4, 36, 37], aumentando assim, a capacidade infiltrativa das células tumorais.

A identificação de alterações cromossômicas específicas em neoplasias é considerada outro indicador de importância clínica, já que o número elevado dessas alterações está relacionado a um grau mais avançado do tumor. Determinadas translocações cromossômicas podem ser consideradas características para algum tipo de câncer se forem detectadas frequentemente, e no caso do CME, a translocação t(11;19)(q21;p13) tem sido demonstrada como a mais frequente alteração visualizada, chegando a ser encontrada em cerca de 60% dos casos dessa neoplasia [38, 39]. Nos resultados obtidos é possível especular se alguns genes localizados nesses cromossomos têm sua expressão alterada e podem ser responsáveis por alterações na função normal dessas células. Constatou-se que a expressão de TNF- α é codificada pelo gene homônimo localizado no cromossomo 6, na região 6p21.33 [39], e em nossos resultados, observou-se que este cromossomo apresentou alterações numéricas de monossomia, indicando a falta de uma cópia desse gene, e sugerindo assim, uma participação menos ativa do TNF- α na tumorigênese do CME. Tal achado corrobora com a função atribuída a essa proteína, de promover a morte celular programada, sendo coerente sua expressão

menos acentuada em um carcinoma estabelecido, já que uma subatuação dessa citocina facilitaria a evolução do tumor.

Ademais, com objetivo de verificar uma possível correlação entre a MT-2A com os FC e MMPs estudados, realizou-se a técnica de siRNA. Observou-se que com o silenciamento da MT-2A, houve também uma redução na expressão do TGF- α , demonstrando uma possível relação entre essas proteínas, podendo a MT estar envolvida de alguma forma no mecanismo de ativação deste fator de crescimento no CME. O TGF- α , quando ativado, é capaz de promover diferenciação celular, além de ser considerado um agente pró-mitótico em carcinomas de glândulas salivares [13]. Um efeito inverso foi observado quanto ao TNF- α , cuja expressão aumentou após o silenciamento da metalotioneína. Hipoteticamente, a ação do TNF- α pode estar localizada em uma etapa da via de sinalização celular anterior à atuação da MT, e a alteração causada pelo siRNA pode ter de alguma forma estimulado a sua expressão para compensar a inibição da MT. Além disso, pensa-se ainda que pelo fato de a metalotioneína ter sido silenciada e apresentar atuação diminuída na linhagem tumoral, o TNF- α , que possui função contrária a MT, tornou-se mais expresso, e assim, provavelmente sua ação pró-apoptótica prevaleceria nas células neoplásicas.

Os resultados demonstraram ainda que a redução na expressão da MT-2A não alterou a expressão de MMP-2, entretanto acarretou a diminuição na expressão da MMP-9, indicando uma possível correlação entre a expressão de MT e essa última protease no CME. O western blot revelou uma expressão de MMP-9 inferior a de MMP-2 no grupo controle do siRNA, indicando que esta última possa ter maior relevância neste câncer, embora aparentemente não esteja diretamente relacionada à MT-2A. Adicionalmente, observou-se nas células não expostas ao siRNA uma expressão discreta de TNF- α , ratificando o achado da análise citogenética, na qual inferiu-se uma menor participação dessa proteína pro-apoptótica uma vez já instalada a neoplasia. Ademais, a MT atua como reservatório de íons zinco e as MMPs são endopeptidases que dependem destes íons para exercer sua função enzimática, portanto a redução na expressão de MMP-9 pode ser justificada pela diminuição da expressão de MT-2A. Os achados desse estudo ratificam outros resultados que observaram uma correlação positiva entre a MT-2A e a MMP-9 [12], indicando uma possível participação conjunta dessas proteínas na invasão tumoral.

CONCLUSÃO

Sugerimos, com base nos resultados obtidos, que a MT apresenta papel importante no mecanismo de invasão tumoral das células oriundas de carcinoma mucoepidermoide, provavelmente influenciando a expressão de proteínas envolvidas diretamente nesse processo.

REFERÊNCIAS

1. McHugh CH, Roberts DB, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS, Kupferman ME. Prognostic Factors in Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Glands. *Cancer*. 2012;118(16):3928-36.
2. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A. et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(7):835-45.
3. Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol*. 2006; (6):293-307.
4. Zhang X, Wang Y, Yamamoto G, Tachikawa T. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology*. 2009;55(3):250-60.
5. Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behavior. *Histopathology*. 2010;57(1):128-37.
6. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH, Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003; 533(1-2):201-9.
7. Sunardhi-Widyaputra S, van den Oord JJ, Van Houdt K, De Ley M, Van Damme B. Identification of Metallothionein-and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-positive cells in salivary gland tumours. *Pathol Res Pract*. 1995;191(11):1092-8.
8. Pedersen M, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *ProgHistochemCytochem* 2009; 44(1):29-64.
9. Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MC. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2001; 441(2):174-8.
10. Alves SM, Cardoso SV, de Fátima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Ferreira Aguiar MC et al. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol*. 2007;43(3):252-6.
11. Thirumoorthy N, Sunder A, Kumar KT, Kumar M, Ganesh GNK, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* 2011; (20): 9-54.
12. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH, et al. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2011; 585(2):421-8.
13. Chiang CP, Chen CH, Liu BY, Sun A, Leu JS, Wang JT. Expression of transforming growth factor-alpha in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *J Formos Med Assoc*. 2001;100(7):471-7.
14. Banerjee AG, Bhattacharyya I, Lydiatt WM, Vishwanatha JK. Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(22):7769-76.

15. Van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 2006;11(4):397-408.
16. Ribeiro AL, Nobre RM, Rocha GC, de Souza Lobato IH, de Melo Alves Junior S, Jaeger RG, et al. Expression of metallothionein in ameloblastoma. A regulatory molecule? *J Oral Pathol Med*. 2011;40(6):516-9.
17. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(6):2223-68.
18. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 2004, 44, 222–231.
19. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res*. 1972;75(1):304-6.
20. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971;2(7731):971-2.
21. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 2000.
22. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rin JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol*, 2012.
23. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*. 2004;37(7):529-40.
24. Nikitakis NG, Tosios KI, Papanikolaou VS, Rivera H, Papanicolaou SI, Ioffe OB. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol*. 2004;17(4):407-15.
25. Moll R, Divo M, and Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(6): 705-733.
26. Azevedo RS, de Almeida OP, Kowalski LP, Pires FR. Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2008; (4):257-64.
27. Katori Y, Hayashi S, Takanashi Y, Kim JH, Abe S, Murakami G et al. Heterogeneity of glandular cells in the human salivary glands: an immunohistochemical study using elderly adult and fetal specimens. *Anat Cell Biol*. 2013;46(2):101-12.
28. Yook JI, Lee SA, Chun YC, Huh J, Cha IH, Kim J. The myoepithelial cell differentiation of mucoepidermoid carcinoma in a collagen gel-based coculture model. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(4):237-42.
29. Kahn HJ, Baumal R, Marks A, Dardick I, van Nostrand AW. Myoepithelial cells in salivary gland tumors. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med*. 1985;109(2):190-5.
30. Ogawa Y. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Prog Histochem Cytochem*. 2003;38(4):343-426.

31. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):191-203.
32. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/ β -catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010;23(2):213-24.
33. Aziz R.S., Casey, C.A. Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(20): 2482–2499.
34. Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope*. 2001;111(8):1373-8.
35. Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P et al. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. 2012;33(12):2568-77. doi: 10.1093/carcin/bgs287.
36. Hu JA, Xu JY, Li YN, Li SY, Ying H. Expression of MMP-2 and E-CD in salivary mucoepidermoid carcinoma and its correlation with infiltration, metastasis and prognosis. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2005;34(5):421-6.
37. Fan J, Wu FY, Wang L, Jiang GN, Gao W. Comparative expression of matrix metalloproteinases in low grade mucoepidermoid carcinoma and typical lungcancer. *Oncol Lett*. 2011;2(6):1269-1273.
38. Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn*. 2004;6(3):205-10.
39. Röser K, Jäkel KT, Bullerdiek J, Löning T. [Significance of molecular-cytogenetic findings in mucoepidermoid carcinoma as an example of salivary glandtumors]. *Pathologe*. 2005;26(5):359-66.
40. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology, 2012. <http://atlasgeneticsoncology.org/> Accessed in 15 May 2014.

LEGENDAS

Figura 1. Imunofluorescência indireta na linhagem celular derivada de CME. CK AE1/AE3 **(A)** e CK 19 **(B)** foram visualizadas de maneira puntiforme pelo citoplasma. A expressão de Fibronectina **(C)** foi encontrada como filamentos difusos e dispostos em feixes longos. A presença de Vimentina **(D)** foi encontrada por meio de filamentos organizados com feixes delgados ao longo de todo o citoplasma, entendendo-se do núcleo até a membrana celular. A expressão de α -Actina músculo liso **(E)** foi observada como filamentos delgados e espessos pelo citoplasma celular. Os núcleos celulares foram corados com Hoescht 33258. Escala: 20 μ m.

Figura 2. Metáfases da linhagem derivada de CME. Cariótipos G-bandeados evidenciando várias alterações numéricas de monossomia e tetrassomia **(A)** e a translocação característica do CME, a t(11;19)(q21;p13), indicada pelas setas **(B)**.

Figura 3. Western Blot. O ensaio de siRNA promoveu uma diminuição na expressão da proteína MT quando comparada ao controle **(A)**. Observou-se uma redução do TGF- α **(B)** em comparação ao seu controle. Um aumento na expressão de TNF- α **(C)** foi observado após o silenciamento do gene MT2A. O controle interno com β -actina **(D)** apresentou bandas de proporções semelhantes, demonstrando o adequado carregamento das amostras. CT: Controle; MW: Molecular Weight (Peso Molecular).

Figura 4. Western Blot. Verificou-se uma redução significativa na expressão de MT **(A)** em comparação ao controle. Não houve alteração na expressão de MMP-2 **(B)** quando comparado ao seu controle. Observou-se que as bandas correspondentes à MMP-9 **(C)** inativa e ativa, com pesos moleculares correspondentes a 92 e 86 kDa respectivamente, apresentaram expressão reduzida em relação aos controles. O tamanho semelhante das bandas de β -actina **(D)** garante o correto carregamento interno de proteínas. CT: Controle; MW: Molecular Weight (Peso Molecular).

Figura 5. Ensaio de migração celular. Avaliou-se a atividade migratória do grupo silenciado para MT2A por meio de RNAi **(A)** e do grupo transfetado com a sequência “scrambled” **(B)**. Como controles positivo **(C)** e negativo **(D)** utilizaram-se células não submetidas à técnica de RNAi. Aumento 100X.

Figura 6. Ensaio de migração celular. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos RNAi e o grupo CRNAi, assim como entre o grupo RNAi e o controle positivo ($p < 0,05$). Teste Estatístico: Mann-Whitney.

Figura 7. Ensaio de invasão celular. Avaliou-se a atividade invasiva do grupo silenciado para MT2A por meio de RNAi **(A)** e do grupo transfetado com a sequência “scrambled” **(B)**. Como controles positivo **(C)** e negativo **(D)** utilizaram-se células não submetidas à técnica de RNAi. Aumento 100X.

Figura 8. Ensaio de invasão celular. Estatisticamente, observou-se diferença significativa entre os grupos RNAi e o grupo CRNAi, assim como entre o grupo RNAi e o controle positivo ($p < 0,05$). Teste Estatístico: Mann-Whitney.

TABELA

Tabela 1. Quantificação de *reads* mapeadas dos genes de interesse nas linhagens HSG e CME.

Gene	Proteína	HSG	CME
MT2A	MT-2A	315	3789
MMP2	MMP-2	294	63687
TNF	TNF- α	1	0
MMP9	MMP-9	16	2
KRT7	CK-7	59177	569
KRT8	CK-8	15902	9
KRT14	CK-14	24	3
KRT19	CK-19	24699	4
TGF α	TGF- α	882	89
VIM	VIMENTINA	1	93082
FN1	FIBRONECTINA	934	563116
ACTA2	α -ACTINA MÚSCULO LISO	4526	316029

Capítulo 2: Metallothionein expression and its influence on the *in vitro* biological behavior of mucoepidermoid carcinoma

João Rafael Habib Souza Aquime

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

Lara Carolina D'Araújo Pinto

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

Maria Sueli da Silva Kataoka

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

Laboratory of Genetics and Molecular Biology, State University of Pará, Belém, PA, Brazil. Travessa Perebebuí, 2623. Belém, PA, 66087-670, Brazil. Nucleus of Genetic Analysis for Imaging, Innovations Technologic Center, Institute Evandro Chagas. Ananindeua-PA, Brazil. Rodovia BR-316 km 7 s/n. Ananindeua, PA, 67030-000, Brazil.

Ruy Gastaldoni Jaeger

Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.

João de Jesus Viana Pinheiro

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.

Correspondence Author:

João de Jesus Viana Pinheiro

Address:

Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

Avenida Augusto Corrêa, 01. Belém PA, 66075-110, Brazil.

Phone number: 55-91-32017563

Fax number: 55-91-32017563

E-mail: radface@hotmail.com

Keywords: mucoepidermoid carcinoma; metallothionein; matrix metalloproteinases; extracellular matrix; salivary glands

Notes

Figures: 8

Tables: 1

ABSTRACT

The Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) is the most common tumor of salivary glands, presenting considerable rates of recurrence and distant metastasis due to high invasive capacity of tumor cells, probably favored by metallothionein (MT) actuation, an zinc storage protein that supply this element to protease activity and synthesis of proteins and nucleic acids. So, the aim of this paper was to characterize a cell line from MEC and to correlate expression of MT with the Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Matrix Metalloproteinases (MMPs). Indirect Immunofluorescence assay was realized to detect expression to epithelial and mesenchymal markers. Besides, it was realized cytogenetic analysis to verify cellular chromosomal alterations. The metallothionein2A (MT2A) gene silencing was obtained by small-interference RNA (siRNA) assay, and then, western blot technique was performed to correlate the expression of growth factors and MMPs studied with MT-2A silencing. Indirect immunofluorescence revealed expression to cytokeratines 19 and AE1/AE3, fibronectin, vimentin and α -smooth muscle actin. Cytogenetic evaluation demonstrated several structural and numerical alterations, among which the translocation t(11;19) (q21;p13), characteristic of MEC. After siRNA assay, a decreased expression of TGF- α and MMP-9 was visualized, while TNF- α became more expressed and MMP-2 kept its expression unaltered. Our findings suggest that MT presents important role in tumor invasion mechanism in MEC, because it interferes with expression of proteins directly involved in this process.

INTRODUCTION

The Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) is the most common tumor of salivary glands, representing about 30% of all salivary gland malignancies [1]. Its clinical presentation is frequently seemed as slow growth tumor without pain associated and placed mainly on parotid gland. MEC presents relevant levels of recurrence and metastasis, being its behavior related to histological grade of tumor, which have been confirmed in retrospective searches [2] and to cellular differentiation, cystic spaces and cytologic atypia [3]. Histologically, MEC is composed of three cell populations: mucous, intermediates and epidermoid. The predominant cellular subtype is directly linked with gradation of tumor in low, intermediate or high grade of malignancy [3].

Tumor cells with invasive activity can achieve underlying tissues, and thus, are more difficult to be completely removed in surgical treatments and may be responsible for the development of recurrence and metastasis in MEC. The invasiveness mechanism in salivary gland tumors has already been demonstrated in some studies and related to proteolysis of extracellular matrix (ECM), migration and cell invasion [4]. The proteolysis activity of matrix, which promotes physical space for the cells to reach deeper tissues, has been attributed to a family of zinc-dependent enzymes secreted by some cells and called matrix metalloproteinases (MMPs). Possibly, the ECM degradation releases growth factors (GF) that activate cell signaling pathways, resulting in proliferative activity increased of cell line. The GF are also able to promote the secretion of MMPs and, for this, they close a favorable cycle to tumor invasion mechanism [5]. These events may happen with contribution of a molecular low-weight and intracellular protein denominated metallothionein (MT) by its function as zinc store [6], an element necessary to proteases actuation and to synthesis of protein and nucleic acids, elevating metabolic activity and cell proliferation [7], getting worse the patients prognosis. Besides, super expression of MT has been incessantly related to a poor prognosis in tumors of lung, pancreas, prostate and oral cavity, too [8]. Patients with squamous cell carcinoma with high expression of metallothionein had significantly shorter survival rates compared to those with lower expression of this protein [9].

Researches already demonstrated the presence and relationship of MT with prognosis of epidermoid carcinomas [9], but little is known about its role in invasiveness of MEC. Considering the histopathological similarities between both tumors, raise the possibility of MT also be present and participate of tumorigenesis of MEC. Moreover, this protein has been linked with a protection of tumor cells against chemotherapy and radiation, developing a neoplastic resistance to these treatments [10]. Recent studies confirmed that the presence of many isoforms of MT, especially the metallothionein-2A (MT-2A), is correlated to cell proliferation and clinicopathological behavior in some cancers [11, 12]. Furthermore, MT-2A has been

considered as relevant prognostic marker in salivary gland tumors, associated to higher invasive activity of the neoplasms [12].

The invasiveness of MEC probably is a complex process mediated, among other factors, by both cell proliferation and proteolysis of extracellular matrix. The impulse to proliferation occurs through the action of GF, as TGF- α (Transforming Growth Factor- α) for it be biosynthesized in tumor cells of carcinomas of salivary glands, possibly acting as a pro-mitotic agent for cell proliferation [13]. However, it is known that tumor development involves not only stimulatory factors, but also inhibitory [14], which aim to contain the neoplastic growth. Among them, there is the protein TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), a cytokine present in regulation of cell apoptosis event. Although researches has already demonstrated its low expression in fibroblast and tumor cells due to act contrary to tumor progression [15], it is important to study this protein in MEC and its link with MT, since papers have suggested a pro-mitotic and anti-apoptotic role of MT [16].

The matrix metalloproteinases are proteases responsible for the tissue remodeling, especially for the degradation of ECM components, including collagens, elastins, gelatin and proteoglycan [17], thus allowing the advancement of tumor cells into the bloodstream. For this reason, they are considered essentials to tumor invasion and metastasis in various neoplasms. Among all, there are the gelatinases MMPs -2 and -9, which have important role for degrade the type IV collagen, which is one of the principal components of ECM [4]. Studies showed that the expression of MMPs -2 and -9 are linked with the biological behavior of salivary glands tumors [18].

In this paper, we characterized a cell line from MEC and correlated the expression of metallothionein with growth factors and matrix metalloproteinases.

RESULTS

MEC cells express epithelial and mesenchymal markers

Immunofluorescence assays showed that cells expressed cytokeratines AE1/AE3 and 19 (Fig. 1A-B) as a punctuate staining next to nucleus area. A positive staining to α -smooth muscle actin, vimentin and fibronectin was observed as punctuate form, too (Fig. 1C-E).

Conventional cytogenetic analysis show numerical and structural abnormalities

Total of 38 metaphases were analyzed and various alterations were observed. Among numerical changes, it was verified nulismy in chromosome 15, monosomy in chromosomes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17, 19, 21, 22 and X, trisomy in chromosomes 11, 12, 20 and 21 and tetrasomy in chromosomes 11, 12, 18 and 20, some of them described in figure 2A. Besides,

structural alterations as deletion of the long arm of one chromosome of pair 4 and centric fission of a chromosome of pair 1 were detected. The translocation t(11;19) (q21;p13), characteristic of MEC, was also present (Fig. 2B).

MT-2A silencing decrease expression of TGF- α and MMP-9 and increase TNF- α expression in MEC cells

Western blot assay demonstrated expression of the proteins of interest, as well to verify the efficacy of MT-2A silencing, which demonstrated that MEC cells treated with 40nM of siRNA to MT-2A gene decreased expression of this protein in comparison to scrambled group (Fig. 3A and 4A). Silencing of MT-2A gene promoted a reduction in TGF- α expression (Fig. 3B), while TNF- α became more expressed (Fig. 3C). And in relation to MMPs, it was found that MMP-2 kept its expression unaltered (Fig. 4B), however MMP-9, similar to MT, presented expression reduced (Fig. 4C). β -actin internal control was utilized to verify the proportional levels of proteins loaded between the 40nM of siRNA and scrambled control samples (Fig. 3D and 4D).

MT-2A silencing decrease migratory activity of MEC cells

Migration activity of the silenced cells to the MT2A gene and the cells transfected with the scrambled sequence, which did not induce any alteration in the cellular messages, were evaluated (Figures 5A and 5B, respectively). Cells not submitted to siRNA were used in wells containing DMEM + 10% fetal bovine serum (Control positive) and others containing only DMEM (Control negative), as shown in Figures 5C and 5D, respectively.

Statistical analysis showed a significant difference in the quantification of migrated cells between siRNA group and siRNA control group, as well as between siRNA group and positive control group (Figure 6).

MT-2A silencing decrease invasive activity of MEC cells

We evaluated the invasive activity of silenced cells to the MT2A gene and the cells transfected with the scrambled sequence (Figures 7A and 7B, respectively). As controls, cells not submitted to siRNA were used in wells containing DMEM + 10% FBS (positive control) and others containing only DMEM (negative control), as shown in Figures 7C and 7D, respectively.

Similar to migration assay, statistical analysis demonstrated significant differences between siRNA group compared to siRNA control and positive control groups (Figure 8).

Genes *MT2A* and *MMP2* are overexpressed in the CME cell line

Transcriptomic analysis revealed that the *MT2A* gene showed the number of *reads* mapped significantly higher in the CME cell line (3789) than the HSG line (315). These results reinforce the pronounced expression of *MT2A* in tumor cells as a relevant prognostic marker. The *MMP2* gene also showed a statistically larger number of *reads* mapped in CME (63687) compared to HSG (294), (Table 1).

Genes *TNFA* and *MMP9* are poorly expressed in CME

The *TNFA* gene did not present *reads* mapped on CME cell line. *MMP9* presented only 2 *reads* mapped on CME, suggesting a discreet participation of the homonymous proteins encoded by these genes (Table 1).

DISCUSSION

Mucoepidermoid Carcinoma is a relevant disease, mainly because of its notable prevalence between salivary gland tumors and for its potential of aggressive behavior, with high rates of recurrence and metastasis [1,2]. The development of tumor cell lines has been accepted as a way to understand about the biological behavior of many neoplasms in vitro. In our paper, we used a cell line from a human MEC, characterized by expression of cellular proteins, epithelial and mesenchymal markers in immunofluorescence assay and by cytogenetic analysis, too. Cytokeratines (CK) characterize cells of epithelial origin, and its expression varies with the cell type, differentiation degree and the level of tissue development. Even after the transformation of normal cells in cancer cells, patterns of cytokeratines are maintained, and therefore, they are utilized as important tumor markers [23]. The CK-AE1/AE3 identifies cytokeratins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16 and 19, some of them already demonstrated in different types of carcinomas [24, 25]. According to Azevedo et al. [26], in MEC, cytokeratins 7, 8, 14 and 19 are expressed by squamous cells, whereas the intermediate and mucosal cell populations mainly express cytokeratin 7. Our transcriptomic results showed that CK-7 presented more *reads* mapped in the MEC cell line, suggesting a neoplasia with prevalence of intermediate and mucous cells, and thus, possibly classified as low to intermediate grade [3]. Recent immunohistochemical studies have found the CK-19 in cells of glandular origin [27], justifying the expression of this protein in this cell line studied, derived from MEC.

Moreover, the presence of various constitutive molecules of ECM characterizes its participation not only as a structural component of tissues, but also as a mediator in cell signaling and regulator in process of cell adhesion and migration [14]. In MEC cell line we

visualized both immunoexpression and *reads* mapped to α -smooth muscle actin, vimentin and fibronectin, indicating the presence of mesenchymal and myoepithelial cells. Previous studies had already identified myoepithelial cells in MEC [28, 29]. The presence of these cells is still enhanced by the expression of α -smooth muscle actin, considered an excellent tool to detect these cells in salivary gland tumors [30]. Another marker expressed, vimentin, is an intermediate filament protein that plays an important role in cytoskeleton's regulation, considered as a useful marker of mesenchymal cells [31]. Besides, vimentin has been proposed as a regulator agent of interaction between proteins of cytoskeleton and cell adhesion molecules, participating in the processes of adhesion, migration, invasion and signal transduction in tumor cells [32]. The fibronectin, also expressed in cell line, is considered the biggest mesenchymal adhesive glycoprotein of ECM and responsible for adhesion cell-cell and cell-matrix. And for this reason, has important influence on cell migration and early differentiation [33].

The proliferative activity of MEC cells probably receives the contribution of the growth factors presents in the line. In results obtained, we detected a low amount of mapped *reads* of the gene coding for TGF- α , confirmed by its weak expression in western blot. Performance of this growth factor in MEC has been rarely studied, despite its relevance has already been demonstrated in head and neck cancers, including its role in the development and progression of MEC [34]. Moreover, presence of TGF- α confirms the results found by Gibbons et al. (2001), which demonstrated an expression of this growth factor in MEC, more intense than in other highly prevalent tumor of the salivary glands, the adenoid cystic carcinoma (ACC).

In tumorigenesis mechanism, there are proteins with opposing actions to the tumor, trying to contain the spread of the disease, being able to be decreased or absent in the neoplastic progression. Among them, we observed the discreet expression by western blot and no mapped *reads* of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), a coherent result since it is a cytokine with function of promoting apoptosis in tumors [35].

The recurrence and distant metastasis in MEC is related to the invasive capacity of tumor cells to achieve underlying tissues, becoming more difficult their total elimination and increasing the risk of persistence of cells that can develop disease return. It is well elucidated in literature about the importance of MMPs and GF to make possible mechanism of tumor invasion. Besides, it has been investigated the participation of metallothionein, which is correlated to the supply of zinc for activation of certain transcription factors, enabling an increase in their proliferative potential, and for the action of zinc-dependent proteases responsible for the ECM degradation [7, 10]. A specific isoform of this protein, metallothionein-2A, has been widely studied as a poor prognostic factor in salivary gland neoplasms, with its presence associated with a more aggressive behavior of the tumor [12]. Thus, expression of MT in MEC cells, viewed by transcriptomic analysis and western blot, suggests the probable action of this protein in tumor invasiveness of MEC *in vitro*.

Corroborating with our findings, presence of MMPs -2 and -9 in salivary gland tumors and in MEC has been demonstrated previously and correlated with higher rates of metastasis and disease recurrence, since the function of these proteases is to promote the degradation of various ECM components [4, 36, 37], thereby increasing the infiltrative capacity of tumor cells.

The identification of specific chromosomal changes in neoplasms is considered another indicator of clinical importance, since the high number of these alterations is correlated to a more advanced tumor grade. Certain chromosomal translocations are characteristics for some type of cancer, and to MEC, the translocation t(11;19)(q21;p13) has been proposed as the most frequent alteration viewed, found in approximately 60% of cases [38, 39]. In our results, we speculated that some genes placed at these chromosomes have their expression altered and may cause changes in normal function of cells. The expression of TNF- α is encoded by the homonymous gene located on chromosome 6, in region 6p21.33 [40] and it was observed that this chromosome showed numerical abnormalities of monosomy, indicating a gene copy lost, and thereby, suggesting a less active participation of TNF- α in tumorigenesis of MEC. These findings corroborate to the function assigned to this cytokine to promote programmed cell death, beyond of be consistent with its down expression in a carcinoma established, since it would facilitate the tumor development.

In order to verify a probable correlation between MT-2A, GF and MMPs studied, a siRNA assay was performed. We observed that after silencing of MT-2A, a reduction in the expression of TGF- α occurred, indicating a link between these proteins, possibly because the MT is involved in the activation process of this GF in MEC. The TGF- α , when activated, can promote differentiation and cell growth in head and neck cancers, and thus, is considered a pro-mitotic agent in salivary gland neoplasms [13]. An inverse effect was visualized for TNF- α , whose expression increased after MT-2A silencing. Hypothetically, the action of TNF- α may be located, in the cell signaling pathway, on a stage prior to the performance of MT, and the alteration caused by siRNA may have somehow stimulated its expression to compensate the inhibition of MT. Moreover, we think that since MT was silenced in cell line, the TNF- α , which has the opposite function, became more expressed, and so probably its pro-apoptotic action would prevail in the MEC cells.

The siRNA results still showed that *MT2A* silencing not altered MMP-2 expression, however, decreased expression of MMP-9, indicating a possible correlation between MT and this latter MMP. Western blot revealed a lower MMP-9 expression than MMP-2 in the siRNA control group, indicating that this latter may be more relevant in MEC, although apparently not directly related to MT-2A. Additionally, a discreet expression to TNF- α was observed in cell group not exposed to siRNA, confirming cytogenetic findings, which described a weak participation of this pro-apoptotic protein once the cancer was already established. MT acts as a zinc storage protein and MMP-s are zinc-dependent proteases to play their functions, so the reduction of MMP-9 expression may be explained by *MT2A* silencing. Our findings also confirm

another results which observed a positive correlation between MT-2A and MMP-9 [12], suggesting an associated participation of these proteins in tumor invasion.

So, our results suggest MT presents an important role in invasiveness of cells from mucoepidermoid carcinoma, probably by influencing the expression of proteins directly involved in this process.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Health Sciences, Federal University of Pará (nº 358.227).

Cell Culture

Cell line derived from mucoepidermoid carcinoma were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented by 10% fetal bovine serum (Gibco, CA, USA), 2 mM of glutamine (Sigma®), 3 mM of sodium bicarbonate (Sigma®), glucose (33 mM, Merck AS, RJ, Brasil) and 100 UI/mL penicillin (Gibco), 100 µg/mL streptomycin (Gibco®), 2,5 µg/mL fungizon (Gibco®) solution. Cells were kept in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37° C.

Indirect Immunofluorescence

MEC cells were cultured on glass coverslips in 24-well plates. Fixation was done with 2% paraformaldehyde and permeabilization with 0.05% Triton X-100 (Sigma®). Thus, cells were blocked with 10% goat serum and incubated with primary antibody in 1% PBS/BSA (Phosphate Buffered Saline/ Bovine Serum Albumin). Primaries antibodies used were: Anti-Vimentin (1:100, Dako Corp., Glostrup, Denmark), Anti-α smooth muscle actin (1:100, Dako®), Anti-fibronectin (1:100, Dako®), Anti-Cytokeratines AE1/AE3 (1:50, Dako®) and 19 (1:100, Dako®), AlexaFluor 488 or 588 secondary antibody (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) revealed primary antibody. Hoechst 33258 (Sigma®) marked nucleus. Cells were analyzed in fluorescence microscope (Scope.A1, Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with digital photographic camera (Axiocam MRc, Zeiss®). Replacement of primary antibody by non-immune serum served as negative control.

Conventional Cytogenetic Analysis

Chromosomes metaphases were obtained from a cell culture of flasks with 25cm² of area, where added 0,1ml of colchicine at a concentration of 0,0016% during one hour. Thereafter, the material was transferred to a centrifuge tube and subjected to a hypotonic process with KCl solution (0,56%) and then, fixed with Carnoy's fixer (3 parts of methanol : 1 part of glacial acetic acid). Subsequently, cell suspension was dropped onto glass slides carefully and kept to dry at room temperature. After, slides were stained with Giemsa solution (Merck SA, RJ, Brazil) and submitted to the G-banding technique [19, 20] with Wright solution (Sigma®). Finally, processed slides were viewed in photo model Axiophot microscope (Zeiss®) and images were captured using a digital camera model Axiocam (Zeiss®) coupled to the microscope with immersion objective of 100x and a 10x eyepiece. For the cell analysis was utilized the BandView software system (BandView associated to with the Case Data Manager (CDM) and Karyotyping software). Chromosomes, then, were disposed considering the morphology and order of decreasing size.

Transcriptomics Analysis

Analysis of the transcribed RNA messenger (mRNA) of two cell line (Human Salivary Gland – HSG and Mucoepidermoid Carcinoma – CME) was performed in three basic stages:

1. Extraction and mRNA capture: We used 5×10^4 cells of each line, separated into different pipes. Each tube was centrifuged at 16.000 rpm / 10 min and the culture medium discarded. After washing with PBS 1X and further centrifugation, the cells were exposed to lysis buffer (lyses / Binding Buffer, Life Technologies AS, Oslo) and the system Beads (Dynabeads® Oligo (dT) 25, Life Technologies AS, Oslo) for 5 min / 25 ° C in gentle agitation. After the initial capture, the tubes were placed in the magnetic separation rack for 1 min; purifications were performed with wash buffers A and B (Washing Buffer A and Buffer B, Life Technologies AS, Oslo) following manufacturer's instructions. The beads were exposed to another buffer for separation of these strands of mRNA (Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit Life). The samples were quantified (Qubit® HS Assay Kit and RNA Qubit® 2.0 Fluorometer Kit, Life Technologies) and stored at -80°C.

2. PCR Amplification: after mRNA extraction was performed amplification of the samples by PCR method. For this, the fragments newly acquired need to be fragmented into smaller ones that enable the transcriptomic analysis (100-150 base pairs) in high-temperature cycles and enzymatic action. Thereafter, the fragments were annealed and exposed to reverse transcription to form complementary strands of DNA (cDNA). The samples were purified at each stage, following the manufacturer's directions (Ion Total RNA Seq v2 Kit, Life Technologies Austin, USA). Each cDNA strand was taken enzymatic ligation of specific adapters, immersed in

the buffer solution. From this, PCR primers were used to create copies of the filaments 30 and 40 min cycles at high temperatures (Ion Total RNA-Seq Primer v2, Life Technologies Austin, USA). The transcriptomic libraries were purified and quantified again (Qubit® HS Assay Kit and RNA Qubit® 2.0 Fluorometer Kit, Life Technologies). To confirm this process, the samples were loaded on gel Acrilose 1% bromide and subjected to electrophoresis 100V / 10 min. Bands confirmed the size of the filaments after exposure to blue light.

3. Reference Genome: we used the reference Homo sapiens, assembly GRCh38.p4, available at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The GenBank file was accessed through Homo sapiens Artemis program (Rutherford et al., 2000) to generate the fasta file containing the nucleoids sequence of all chromosomes, and GFF annotation file with the chromosomes. Mapping of readings: The TMAP program (<https://github.com/iontorrent/TS/tree/master/Analysis/TMAP>) was used to perform the mapping of readings against the reference. At this stage the files fasta of each chromosome of Homo sapiens were used as reference and so we carried out a mapping of the readings of each condition against each chromosome using the TMAP default parameters. As a result, for each chromosome and condition, it has generated a mapping file in SAM format. The sam files were converted to the format bam ordered using the samtools program (<http://www.htslib.org/>). Differential expression of genes: analysis of differential expression was performed by Cuffdiff program (Trapnell et al, 2012.) That uses as input a fasta reference, a note and the result of the alignments, the readings from the reference in orderly BAM format. The identification of differentially expressed genes an individual analysis was performed for each of the conditions chromosomes analyzed. As a result of Cuffdiff program, a list with the information of genes characterized as differentially expressed it was generated. These results were united generating a list of all genes differentially expressed for all chromosomes in samples studied.

Migration Assay

To investigate if metallothionein protein (MT-2A) has influence on the migration of CME cells, a 10-well bipartite chamber system (NeuroProbe, Inc, Gaithersburg, USA) was used associated with porous polycarbonate membrane. Lower chamber wells were filled with DMEM-F12 (Sigma®) and 10% fetal bovine serum (Gibco®). Cells with the expression of metallothionein reduced by siRNA (10^5 cells / well) and resuspended in serum-free medium, were placed in the upper chamber on the membrane. Then, the chambers were incubated for 24h at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. After this period, the upper portion of membrane was removed and carefully scraped for the removal of non-migrated cells, leaving only the cells that migrated, located on the underside of the membrane. These cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with 0.2% crystal violet solution in 20% methanol. The acquisition of images using a digital machine (Axiocam MRc, Zeiss) coupled to the microscope (zoom 500x) allowed the counting of the migrated cell. As control were used: 1) cells of

scrambled sequence group associated to DMEM-F12 containing 10% FBS in the lower well; 2) cells not transfected associated to DMEM-F12 containing 10% FBS in the lower well; 3) cells not transfected with FBS-free in DMEM-F12 on the lower well.

Invasion Assay

To evaluate if metallothionein protein (MT2A) induces invasive phenotype in CME cells, the same 10-well bipartite chamber system (NeuroProbe®) was used associated with porous polycarbonate membrane covered by 5µL matrigel (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) at a concentration of 14 µg / mL, a substance which corresponds to basement membrane in vitro. Lower chamber wells were filled with DMEM-F12 (Sigma®) and 10% fetal bovine serum (Gibco®). In this experiment, cells with metallothionein expression reduced by siRNA (15x10⁴ cells / well) were resuspended in serum-free medium and placed in the upper chamber on the matrigel-covered membrane. The chamber was incubated for 48h at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂, making possible matrigel digestion and invasion of cells from upper to lower chamber could occur. After this period, the upper portion of membrane was removed and its delicately scraped for the removal of non-invaded cells and the matrigel remains. Cells located in the lower portion were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and stained with 0.2% crystal violet solution in 20% methanol. The acquisition of images using a digital machine (AxiocamMRc, Zeiss) coupled to the microscope (zoom 500x) allowed the counting of the invasive cells. As control were used: 1) cells of scrambled sequence group associated to DMEM-F12 containing 10% FBS in the lower well; 2) cells not transfected associated to DMEM-F12 containing 10% FBS in the lower well; 3) cells not transfected with FBS-free in DMEM-F12 on the lower well.

Small Interfering RNA

MEC cells (2x10⁵) were cultured in six-well plates in DMEM-F12 with 10% FBS and without antibiotic–antimycotic solution to 60-80% confluence. Cells were incubated with a complex formed by transfection medium (Optimen, Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen®) and 40 nM siRNA targeting to MT-2A (Life Technologies, New York, USA) following manufacturer's instructions. A 40 nM siRNA scrambled sequence (Santa Cruz proprietary target sequence) was used as control. Transfection confirmation was demonstrated by western blot.

Western Blot

Cells transfected with siRNA targeting to MT-2A and control were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0) with protease inhibitor cocktail (Sigma®). Samples were electrophoresed in 10% polyacrylamide gradient gels. Proteins were transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Amersham®) and blocked in TBS with 0.05% Tween 20 (TBST) with 2.5% non-fat milk. The membrane was probed with antibodies against MT 1,2 (Abcam®), TGF- α (Santa Cruz®), TNF- α (Sigma®), MMPs -2 (Millipore®) and -9 (DBS®) and β -actina (Sigma®). Primary antibodies were detected by HRP conjugated secondary antibodies (1:10.000), and developed using an ECL chemiluminescent substrate (Amersham®) to reveal the reaction in radiographic films. To probe different antibodies, membranes were stripped with Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo®).

ABBREVIATIONS

MEC: Mucoepidermoid Carcinoma

MT: Metallothionein

TGF- α : Transforming Growth Factor- α

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

MMP: Matrix Metalloproteinases

MT2A: Metallothionein 2A

siRNA: small-interference RNA

ECM: Extracellular Matrix

GF: Growth Factors

nM: NanoMolar

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

PBS: Phosphate Buffered Saline

BSA: Bovine Serum Albumin

TBS: Tris-Buffered Saline

TBST: Tris-Buffered Saline Tween

ECL: Enhanced chemiluminescence

mRNA: Messenger RNA

PCR: Polymerase Chain Reaction

cDNA: complementary strands of DNA

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors truly thank the Cell Culture Laboratory, Dentistry Post Graduation Program, Federal University of Pará for the analysis and processing of histological diagnosis data reported in this article.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

FUNDING

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

1. McHugh CH, Roberts DB, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS, Kupferman ME. Prognostic Factors in Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Glands. *Cancer*. 2012;118(16):3928-36.
2. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, Urken ML, Gnepp DR, Huvos A, Lumerman H, Mills SE. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25(7):835-45.
3. Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol*. 2006; (6):293-307.
4. Zhang X, Wang Y, Yamamoto G, Tachikawa T. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology*. 2009;55(3):250-60.
5. Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology*. 2010;57(1):128-37.
6. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003; 533(1–2):201–9.
7. Sunardhi-Widyaputra S, van den Oord JJ, Van Houdt K, De Ley M, Van Damme B. Identification of Metallothionein-and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-positive cells in salivary gland tumours. *Pathol Res Pract*. 1995;191(11):1092-8.

8. Pedersen M, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *ProgHistochemCytochem* 2009; 44(1):29-64.
9. Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MC. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2001; 441(2):174–8.
10. Alves SM, Cardoso SV, de Fátima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Vieira do Carmo MA, Ferreira Aguiar MC. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol.* 2007;43(3):252-6.
11. Thirumoorthy N, Sunder A, Kumar KT, Kumar M, Ganesh GNK, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* 2011; (20): 9-54.
12. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH, Jeong HG. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2011; 585(2):421-8.
13. Chiang CP, Chen CH, Liu BY, Sun A, Leu JS, Wang JT. Expression of transforming growth factor- α in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *J Formos Med Assoc.* 2001;100(7):471-7.
14. Banerjee AG, Bhattacharyya I, Lydiatt WM, Vishwanatha JK. Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(22):7769-76.
15. Van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.* 2006;11(4):397-408.
16. Ribeiro AL, Nobre RM, Rocha GC, de Souza Lobato IH, de Melo Alves Junior S, Jaeger RG, de Jesus Viana Pinheiro J. Expression of metallothionein in ameloblastoma. A regulatory molecule? *J Oral Pathol Med.* 2011;40(6):516-9.
17. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(6):2223-68.
18. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 2004, 44, 222–231.
19. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972;75(1):304-6.
20. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971;2(7731):971-2.
21. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 2000.
22. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rin JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol*, 2012.
23. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37(7):529-40.

24. Nikitakis NG, Tosios KI, Papanikolaou VS, Rivera H, Papanicolaou SI, Ioffe OB. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol.* 2004;17(4):407-15.
25. Moll R, Divo M, and Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(6): 705-733.
26. Azevedo RS, de Almeida OP, Kowalski LP, Pires FR. Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2008; (4):257-64.
27. Katori Y, Hayashi S, Takanashi Y, Kim JH, Abe S, Murakami G, Kawase T. Heterogeneity of glandular cells in the human salivary glands: an immunohistochemical study using elderly adult and fetal specimens. *Anat Cell Biol.* 2013;46(2):101-12.
28. Yook JI, Lee SA, Chun YC, Huh J, Cha IH, Kim J. The myoepithelial cell differentiation of mucoepidermoid carcinoma in a collagen gel-based coculture model. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(4):237-42.
29. Kahn HJ, Baumal R, Marks A, Dardick I, van Nostrand AW. Myoepithelial cells in salivary gland tumors. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med.* 1985;109(2):190-5.
30. Ogawa Y. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Prog Histochem Cytochem.* 2003;38(4):343-426.
31. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):191-203.
32. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/ β -catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol.* 2010;23(2):213-24.
33. Aziz R.S., Casey, C.A. Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(20): 2482–2499.
34. Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 2001;111(8):1373-8.
35. Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P, Xiao Q, Han D, Saiyin H, Zhu J, Chen T, Roberts LR, Huang H et al. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis.* 2012;33(12):2568-77. doi: 10.1093/carcin/bgs287.
36. Hu JA, Xu JY, Li YN, Li SY, Ying H. Expression of MMP-2 and E-CD in salivary mucoepidermoid carcinoma and its correlation with infiltration, metastasis and prognosis. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005;34(5):421-6.
37. Fan J, Wu FY, Wang L, Jiang GN, Gao W. Comparative expression of matrix metalloproteinases in low grade mucoepidermoid carcinoma and typical lungcancer. *Oncol Lett.* 2011;2(6):1269-1273.

38. Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn.* 2004;6(3):205-10.
39. Röser K, Jäkel KT, Bullerdiek J, Löning T. [Significance of molecular-cytogenetic findings in mucoepidermoid carcinoma as an example of salivary glandtumors]. *Pathologe.* 2005;26(5):359-66.
40. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology, 2012. <http://atlasgeneticsoncology.org/> Accessed in 15 May 2014.

TABLE

Table 2. Reads mapped of HSG and CME cell lines.

Gene	Proteína	HSG	CME
<i>MT2A</i>	MT-2A	315	3789
<i>MMP2</i>	MMP-2	294	63687
<i>TNFA</i>	TNF- α	1	0
<i>MMP9</i>	MMP-9	16	2
<i>KRT7</i>	CK-7	59177	569
<i>KRT8</i>	CK-8	15902	9
<i>KRT14</i>	CK-14	24	3
<i>KRT19</i>	CK-19	24699	4
<i>TGFa</i>	TGF- α	882	89
<i>VIM</i>	VIMENTIN	1	93082
<i>FN1</i>	FIBRONECTIN	934	563116
<i>ACTA2</i>	α -SMOOTH MUSCLE ACTIN	4526	316029

LEGENDS

Figure 1: Indirect Immunofluorescence in cell line from MEC. Cytokeratine AE1/AE3 **(A)** was visualized in form of dots placed in cell cytoplasm and cytokeratine 19 **(B)** was found as punctuate intracellular staining in MEC cells. Fibronectin **(C)** immunoexpression was found as long filaments arranged in bundles. Vimentin **(D)** and α -Smooth Muscle Actin **(E)** were observed as thin and thick filaments throughout the cytoplasm. Hoechst 33258 marked nucleus. Scale bars: 20 μ m.

Figure 2: Metaphases from MEC cell line. G-Banded karyotypes revealing various numerical abnormalities of monosomy and tetrasomy **(A)** and the specific translocation of MEC, the t(11;19)(q21;p13), indicated by arrows **(B)**.

Figure 3: siRNA assay. Experiment promoted decrease in MT expression, when compared to scramble control **(A)**. Similar to MT, the expression of TGF- α reduced in comparison with control **(B)**. Increase in TNF- α expression was visualized after MT-2A gen silencing **(C)**. β -actina internal control presented bands with similar sizes, indicating correct loading of samples **(D)**.

Figure 4: siRNA assay. Experiment promoted decrease in MT expression, when compared to scramble control **(A)**. Any alteration in MMP-2 expression was found **(B)**. Bands of inactive and active MMP-9, with molecular weight about 92 and 86 kDa respectively, demonstrated expression reduced after siRNA **(C)**. β -actina internal control presented bands with similar sizes, indicating correct loading of samples **(D)**.

Figure 5. Cell migration assay. Migratory activity of siRNA group **(A)** and scrambled group **(B)** was evaluated. Positive **(C)** and negative **(D)** controls were used cells not submitted to the siRNA technique. Zoom 100X.

Figure 6. Cell migration assay. Statistically significant difference was observed between the siRNA and the siRNA controlgroup, as well as between the siRNA group and the positive control ($p < 0.05$). Statistical Testing: Mann-Whitney.

Figure 7. Cell invasion assay. Invasive activity of the silencing cells for MT2A **(A)** and the group transfected with the scrambled sequence **(B)**. Positive **(C)** and negative **(D)** controls were performed with not submitted to the siRNA technique. Zoom 100X.

Figure 8. Cell invasion assay. Statistically, a significant difference was observed between the siRNA groups and the siRNA control group, as well as between the siRNA group and the positive control ($p < 0.05$). Statistical Testing: Mann-Whitney.

FIGURAS

Figura 1:

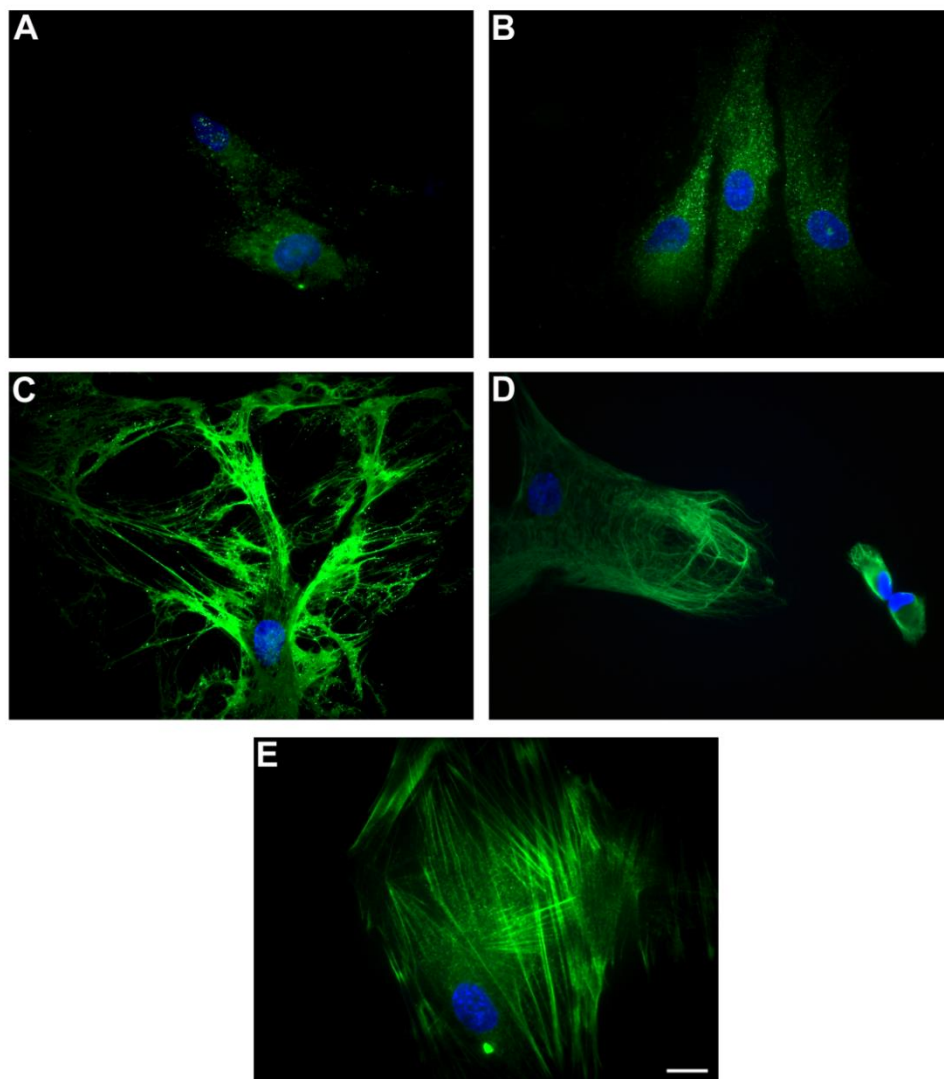
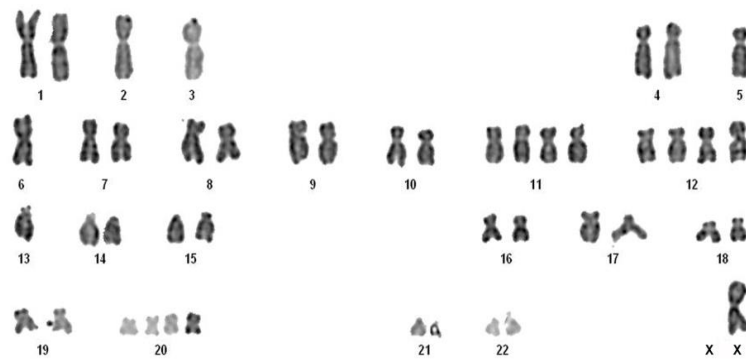


Figura 2:

A



B

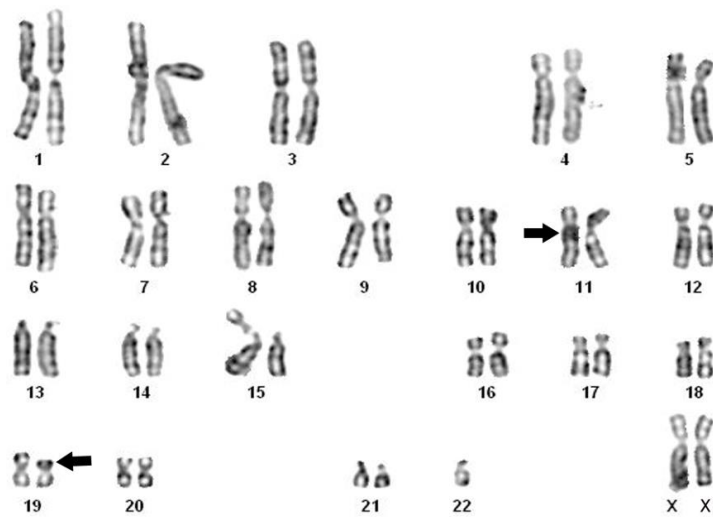


Figura 3:

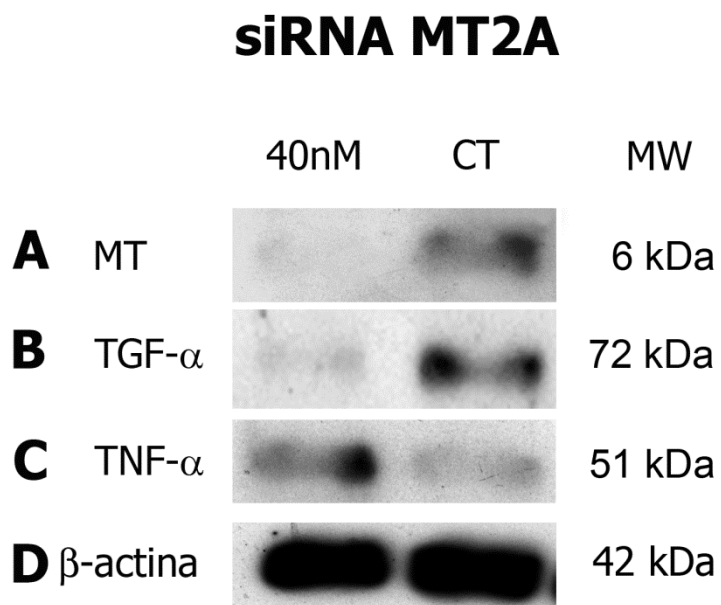


Figura 4:

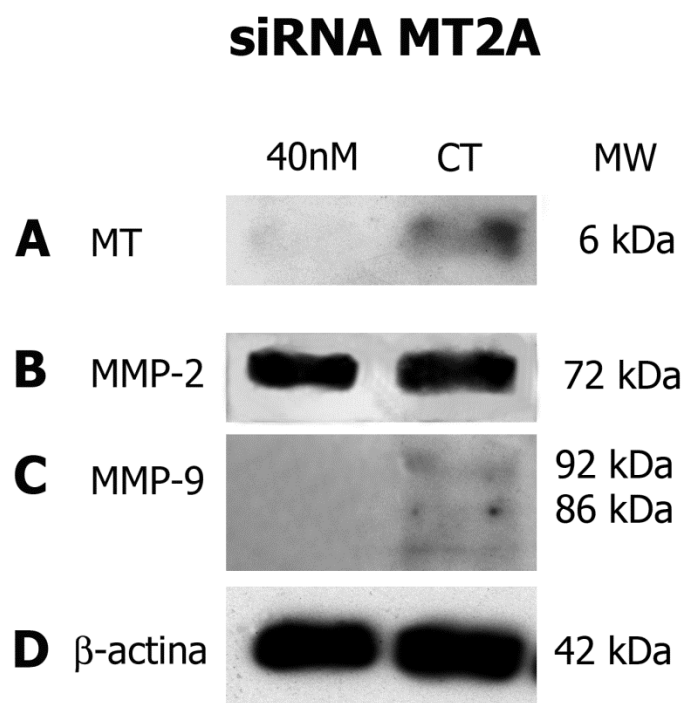


Figura 5:

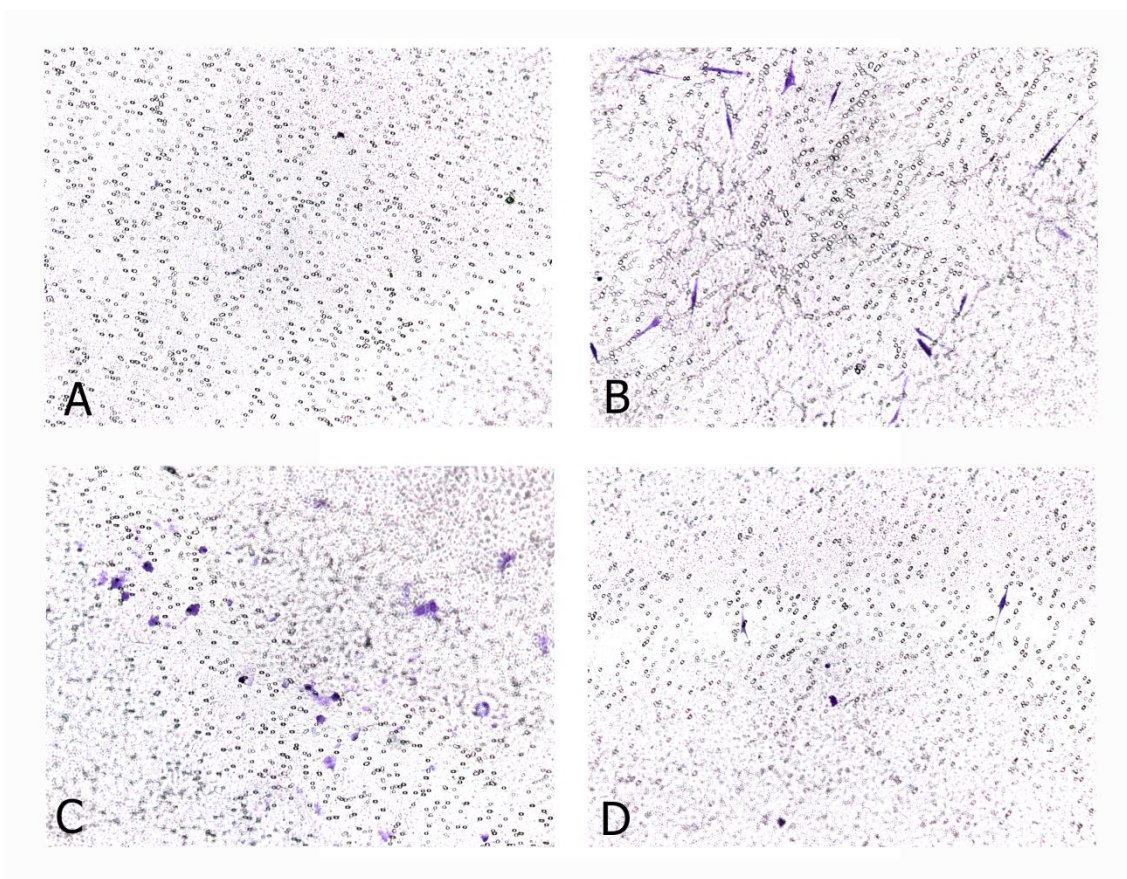


Figura 6:

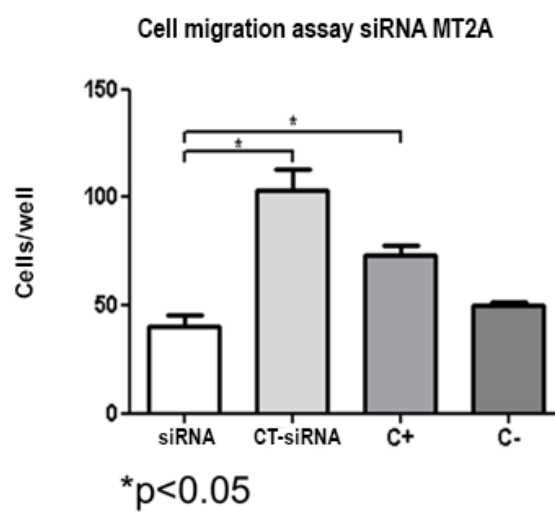


Figura 7:

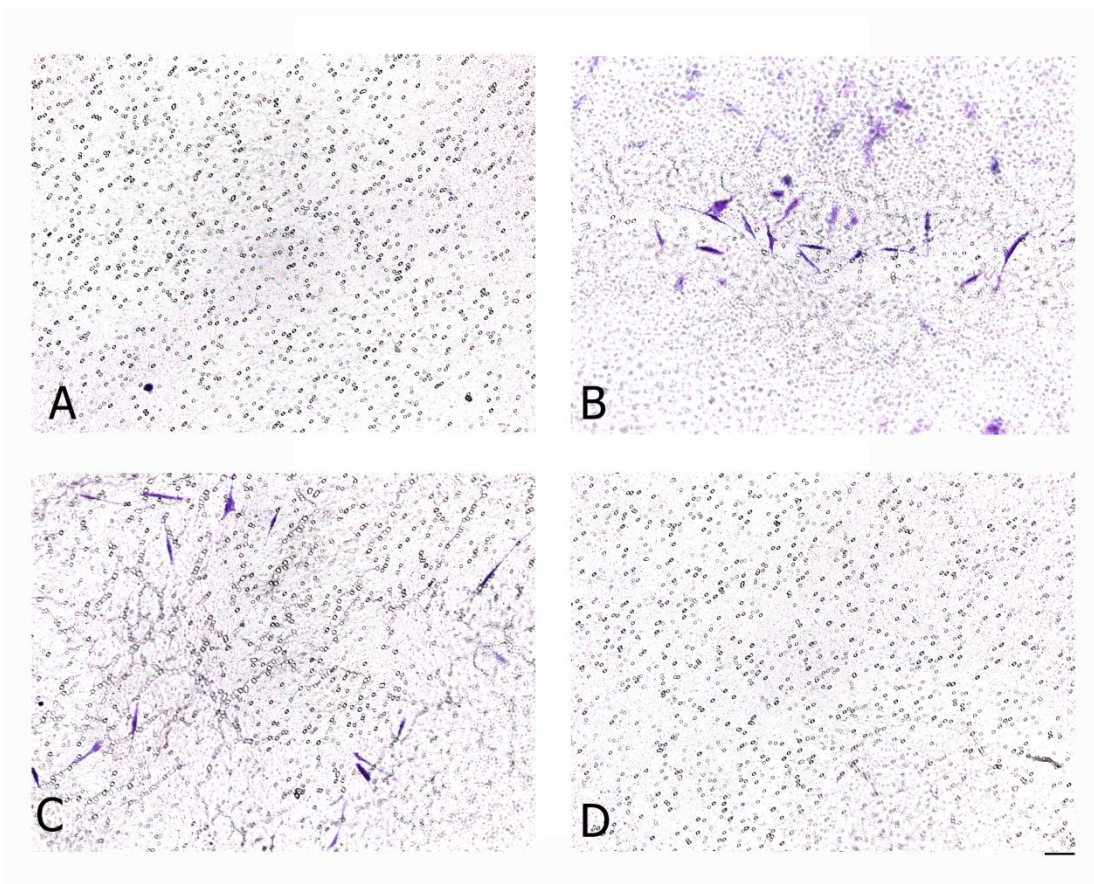
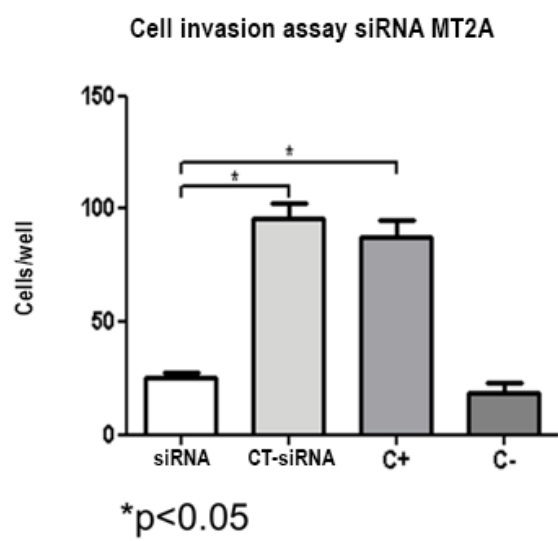


Figura 8:



Normas da Revista ONCOTARGET

For Authors

FORMAT AND STYLE

Oncotarget journal follows the International Committee of Medical Journal Editors' uniform requirements for manuscripts. Please click here for the full text <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>

Manuscripts should be written in clear, grammatical English, typed double-spaced, and all pages must be numbered. Manuscripts that are not in *Oncotarget* style or that are not in good idiomatic English may be returned to the author without review. Laboratory jargon as well as terminology and abbreviations not consistent with internationally accepted guidelines should be avoided.

Manuscripts should be arranged in the following order: title page, text and references, tables, legends for all tables and figures, figures. See below for full explanation of what is to be included in these sections. When submitting manuscripts that include Supplementary Data, please be sure to upload supplemental files separately, in the appropriate area of the submission form. Please do not append supplemental files to the main manuscript file. Numbered and lettered sections in the text should be avoided. Each table and illustration must be cited in order in the text. Simple chemical formulas or mathematical equations should be presented in a form that allows their reproduction in single horizontal lines of type; more complicated mathematical formulas or chemical structures difficult to set in type should be provided for reproduction in the form of line drawings, glossy photographs, or digital files.

Title page

Title. Write a brief, informative title. Abbreviations should not be used in titles. It is important for literature retrieval to include in the title the key words that identify the nature of the subject matter, including, if applicable, the species on which the work is done.

Authors and affiliations. Authors are urged to include their full names, complete with first and middle names or initials. Academic degrees should not be included. Always include mailing address, phone and fax number, and email address of the corresponding author. The names and locations of institutions and the laboratories or names and locations of companies should be given for all authors. If several institutions are listed on a manuscript, it should be clearly indicated with which department and institution each author is affiliated by using superscript numbers that correspond to each author's affiliation.

Running title. Not necessary.

Keywords. Provide 5 keywords identifying the subject of your article.

Other notes about the manuscript as a whole, including the **total number of figures and tables.**

Abstract

The abstract should be concise, yet outline the content of the manuscript (see the specifications for each type of article for abstract length). Because these abstracts are used by secondary services (e.g., Medline, Chemical Abstracts, Web of Science, Scopus), they should recapitulate in abbreviated form the purpose of the study and the experimental technique, results, and data interpretations. Data such as the number of test subjects and controls, strains of animals or viruses, drug dosages and routes of administration, tumor yields and latent periods, length of observation period, and magnitude of activity should be included. Vague, general statements

such as "The significance of the results is discussed," or "Some physical properties were studied," should be avoided. All important terms relevant to the content of the manuscript should be incorporated into the abstract to assist indexers and searchers. Abbreviations should be kept to an absolute minimum; however, if they are needed, they must be explained at first mention within the abstract so the abstract can be understood as an independent unit from the text. Do not cite references in the abstract.

Introduction

It is not necessary to cite all of the background literature in the Introduction. Brief reference to the most pertinent articles generally suffices to acquaint the reader with the findings of others in the field and with the problem or question that the investigation addresses.

Results

Include a concise summary of the data presented in tables and illustrations. Excessive elaboration of data already given in tables and illustrations should be avoided. With the exception of *Cancer Discovery*, the Results and Discussion sections should be combined if, by so doing, space is saved or the logical sequence of the material is improved.

Discussion

The data should be interpreted concisely without repeating material already presented in the Results section. Speculation is permissible, but it must be well founded, and discussion of the wider implications of the findings is encouraged.

Materials and Methods

Explanation of the experimental methods should be brief but adequate for repetition by qualified investigators. Procedures that have been described in previous publications should not be described in detail but merely cited with appropriate references. Only new and significant modifications of previously published procedures need complete exposition. The sources of special chemicals or preparations used should be provided. Any commercial products that are mentioned should include the name of the manufacturer, and ideally, catalog numbers.

Oncotarget endorses the principles embodied in the Declaration of Helsinki and expect that all investigations involving humans will have been performed in accordance with these principles. In particular, manuscripts reporting human experimentation must include a statement that the human investigations were performed after approval by an institutional review board and in accordance with an assurance filed with and approved by the U.S. Department of Health and Human Services, where appropriate. Also, manuscripts reporting biomedical research involving human subjects must include a statement that informed consent was obtained from each subject or subject's guardian.

Oncotarget supports of the most humane treatment of animals in the conduct of scientific studies, and it is expected that investigators will adhere to widely accepted national standards such as the following:

1. The U.S. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, available from the Office of Laboratory Animal Welfare, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, RKLI, Suite 360, MSC 7982, 6705 Rockledge Drive, Bethesda, MD 20892–7982.
2. The United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Prevention Research's Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (published online 25 May 2010).

Only the results (particularly the photographic presentation of experimental data) in which proper attention has been given to ethical considerations toward animals will be published, and *Oncotarget* reserves the right to reject manuscripts that do not follow accepted standards.

Abbreviations

Provide definitions for any abbreviated terms in the text.

Acknowledgments

Include in this section the names of others contributing to the work who are not identified as authors. The Corresponding Author should obtain written permission to refer to those mentioned in the Acknowledgments section.

Conflicts of Interest

Disclose any potential conflicts of interest.

Funding

Provide information about financial support, including the source and number of grants, for each author.

References

The list of references should be numbered consecutively according to the first time mentioned within the article. The reference list should be limited to only those citations essential to the presentation. Before submission of the manuscript, authors should verify the accuracy of all references and check that all references have been cited in the text.

Cite only the number assigned to the reference. Use [] not (). For example: "according to Vogelstein [1]". References should include only the articles that are published or in press. Unpublished data, submitted manuscripts, abstracts, and personal communications should be cited within the text only. Personal communication should be documented by a letter of permission.

Authors are strongly encouraged to use an automated reference manager such as Thomson Reuters Endnote, Zotero, or Mendeley. Follow the links to download output styles for *Oncotarget*.

Please use the following style for references in all types of papers except Editorial and News.

Papers (except Editorials):

Please use the following style for references in all types of papers except editorials:

1. Article in a periodical (strictly, no variation is allowed): Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J, Liu G, Hendricks W, Lengauer C, Gabelli SB, Kinzler KW, Vogelstein B, Huso DL, Zhou S. PI3K α inhibitors that inhibit metastasis. *Oncotarget*. 2010; 1: 339-348. Note: "et al." should only be used after 13 authors.
2. Article in a book and book chapters: any style is acceptable
3. Article in press: Articles in press may be listed among the references provided a journal name and tentative year of publication can be verified.

Tables

Tabular material should not duplicate data already presented in detail in the text, nor should tables be only lists. A table should compare values. If you are putting data in a table, summarize the data in the text and provide a citation for it. Unnecessary columns of data that can easily be derived from other data in the table should not be included. Large groups of individual values should be avoided; instead, these should be averaged and an appropriate designation of the dispersion, such as standard deviation or standard error, should be included. Tables should not be included as part of a figure. Legends should be short and to the point and should generally not include references. Authors are discouraged from submitting tables that have been previously published, even with permission.

Authors are obligated to indicate the significance of their observations by appropriate statistical analysis.

Every table *must* have a descriptive title and enough explanatory information so the reader can understand the data without reference to the text. Each column must carry an appropriate heading and, if measurements are given, the units should be given with the column heading. Number tables using Arabic numerals; table footnotes should be indicated with lower-case alphabetical letters: a, b, c, etc. Include a note after the footnotes in which all abbreviations used in the table that have not been used in the text are explained. Complex or large tables should be uploaded as Supplementary Data.

Figures

Types of figures include line drawings, graphs, and halftone illustrations, such as photographs, photomicrographs, or electrophoretic patterns. Figures should be used when salient points need illustration for better comprehension by the reader. Figures must be cited and numbered in the order in which they appear in the text. Figures should be original. Authors are discouraged from submitting figures that have been previously published, even with permission. If use of a previously published figure is necessary, the author must apply for written permission from the copyright holder and supply confirmation of the permission grant before publication.

Please note that figures should be submitted in their final format. If you do not intend for your figure(s) to appear in color in the journal should your manuscript be accepted for publication, please ensure that you submit a black and white version. This makes it possible for the editors and reviewers to make an informed evaluation of your work.

All figures must have legends that *briefly* describe the data shown; details given in the text of the manuscript should not be repeated. Legends should be short and to the point and should generally not include references. Please note that all figure legends should be listed together in one section (Figure Legends) directly preceding the appearance of the figures in the manuscript. Ensure that both legends and figures are numbered and match up appropriately. Stains and original magnifications should be listed where applicable. Each legend should adequately identify all parts, symbols, abbreviations, mathematical expressions, abscissas, ordinates, units, and reference points on the figure. Abbreviations explained in the text of the article need not be redefined in the figure legend.

When graphs are reduced to the size of a single column (7.9375 cm / 3.125 in), the text in the graph must be no smaller than 6 point type and no larger than 12 point type, and all symbols must be discernible. Avoid use of very thin, broken, or dotted lines.

Figure symbols should be defined in the legend. Only those common symbols for which the printer has type should be used. Lines connecting the symbols should not extend beyond the data points. In the published form, the minimum thickness of lines (rules) used to present drawn art is 0.5 point. If a drawn image will be reduced in size for publication, the lines used to draw the original art must be thick enough to be reduced and still meet the minimum requirement. Lines thinner than 0.5 point thickness may be completely lost if an image is reduced in size.

Graphs should be ruled off close to the area occupied by the curve, and abscissas and ordinates should be clearly marked with appropriate units. Explanations of the coordinates should not extend beyond the respective lines. Do not box-in graphs with top and right-hand frame lines unless these are essential for reference. Titles printed outside the confines of the drawing waste space; all of this information should be included in the legend. Also, to conserve space those curves that may appropriately appear together should be included in a single graph.

Halftones that must appear together for comparison should be grouped under one figure number with each section given sequential letters (A, B, C) in the upper left-hand corner on the face of the illustration. Composite figures may be mounted on a plate, with the sections abutted together and tooling (thin lines) placed between the parts of the figure. For optimal reproduction, the contrast among photographs on a plate should be consistent. The overall dimensions of photographs on a plate should not exceed 18.41 cm x 22.86 cm / 7.25 in x 9 in.

Symbols, arrows, or letters used in photomicrographs should contrast with the background so as to be clearly visible. Internal scale markers should be included on the photographs themselves or the original magnification should be given in the legend because it may be necessary to reduce the figures.

Supplementary data

General guidelines

Supplementary data should provide additional substantive material, but the article must stand on its own merits and be complete and self-explanatory without them. Additional text, including results or discussions related to the article, is not acceptable; these should be included in the article itself.

Supplementary data should fall within the conceptual scope of the main paper but not extend beyond it. Preliminary data that simply extend the scope of the study and unnecessary control data should not be included.

Supplementary data are not essential to understanding the conclusions of the paper but are additional or complementary and directly relevant to the article content.

Supplementary material should not repeat material that is already included in the main article.

Data that have been previously published are not acceptable.

Supplementary material may also be that which cannot be included in the main version of the paper due to space constraints (e.g., limits placed on the number of figures and tables allowed in an article) or format restrictions.

Within the above guidelines, supplementary files may include the following:

- Figures (TIFF (**preferable**), JPG, or PNG format)
- More detailed materials and methods than can be included in the body of the article, but the main text should contain sufficient methodology for an experienced investigator to replicate the experiments
- Tables (editable Word or Excel format)
- Electronic multimedia files (e.g., animations, videos, audios)
- Database information
- Three-dimensional structures/images, sequence alignments, and data sets that are very large, such as those obtained with microarray hybridization experiments

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Isolamento e caracterização de células derivadas do carcinoma mucoepidermoide. Estudo in vitro da relação entre a expressão de metalotioneína, metaloproteinases da matriz, fatores de crescimento e eventos de proliferação celular.

Pesquisador: JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18775313.4.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 358.227

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais prevalente, chegando a representar cerca de 10% de todos os tumores que acometem as glândulas salivares maiores. Clinicamente, apresenta-se como um aumento de volume assintomático ocorrendo frequentemente na glândula parótida ou palato, em indivíduos de diferentes faixas etárias, desde a segunda até a sétima década de vida. Estudos já demonstraram a presença e a relação da proteína Metalotioneína (MT) com o prognóstico dos carcinomas epidermoides, mas pouco se sabe sobre a sua participação nos processos e de invasividade no carcinoma mucoepidermoide. A presença de características histopatológicas semelhantes nestas duas lesões levanta a possibilidade de a MT também estar presente e participar na via de sinalização do CME. A invasão tumoral inerente ao CME é um processo complexo mediado, dentre outros fatores, pela proliferação celular e pela proteólise localizada da matriz extracelular, realizada principalmente por enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs). Dentre estas proteases, as MMP-2 e -9 possuem destacado papel na invasividade de tumores, uma vez que degradam diversos componentes da matriz, como o colágeno. Sabidamente, as MMPs são endopeptidases que dependem de zinco para exercer sua função

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 358.227

enzimática. Desse modo, os fenômenos relacionados às MMPs podem ocorrer com o auxílio da metalotioneína, proteína que funciona como reservatório intracelular de íons zinco. Baseando-se nestes dados espera-se determinar, através de um estudo com uma linhagem de CME, se a MT participa do processo de proliferação e invasão tumoral, e se tem influência sobre a expressão das metaloproteinases -2 e -9. Para isto serão realizados experimentos com RNA de interferência para bloquear a atividade da MT e assim determinar se a sua inatividade interfere no comportamento celular do CME. Verificaremos se fatores de crescimento como EGF, TGF- β e TNF- α possuem influência na expressão da MT. Adicionalmente, realizaremos a caracterização da linhagem celular oriunda de carcinoma mucoepidermóide humano por análise transcriptômica. Essa análise se constitui uma das principais ferramentas para isolar e caracterizar genes, assim como estudar as interações entre eles. Nesse contexto, a análise transcriptômica permitirá um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na expressão e interação dos genes, assim como a compreensão das redes funcionais estabelecidas pelas proteínas no CME.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a correlação da expressão de metalotioneína (MT) e o comportamento biológico do carcinoma mucoepidermóide (CME) em uma linhagem celular derivada dessa neoplasia.

Objetivo Secundário:

Estabelecer e caracterizar uma linhagem celular derivada de CME, incluindo análise transcriptômica; Analisar a expressão da MT em linhagem celular de CME; Analisar a expressão da MT in vivo utilizando imunohistoquímica; Analisar a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs); Analisar a expressão de fatores de crescimento (FCs); Correlacionar a expressão de MT com MMPs; Correlacionar a expressão de MT com

FCs; Correlacionar a expressão de MT e proliferação celular; Correlacionar a expressão de MT com a invasão celular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existem riscos ou desconfortos relacionados aos procedimentos experimentais. Os riscos e desconfortos relacionados aos procedimentos corriqueiros, no caso biópsia e remoção tumoral, são os decorrentes de uma cirurgia, tais como alergia a substâncias utilizadas durante o

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 358.227

procedimento cirúrgico (o que pode ser evitado obtendo informações do paciente durante a anamnese) e o desconforto pós-operatório que pode ser mitigado com a prescrição de analgésicos.

Benefícios:

Não há benefício direto para o paciente, pois, trata-se de um estudo experimental no qual espera-se bloquear a proteína metalotioneína nas células em cultura e com isto observar quais alterações ocorrerão em outras proteínas que também participam do processo de invasão e proliferação celular desta neoplasia. Somente no final do estudo, ou até mesmo a longo prazo, poderemos concluir a presença de algum benefício para o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresentado, nesta 2ª versão, contém metodologia e critérios definidos em acordo com a Resolução 466/12 do CNS/MS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados contemplam as resoluções pertinentes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, somos pela aprovação do projeto. Este é nosso parecer, SMJ.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 358.227

BELEM, 13 de Agosto de 2013

Assinador por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamã **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br