

ESTUDO *IN VITRO* DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA, METALOPROTEINASES DA MATRIZ E FATORES DE CRESCIMENTO NO CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

Carolina Carmine Proietti¹; João Rafael Habib Souza Aquime¹; Lara Carolina D'Araújo Pinto²; Maria Sueli da Silva Kataoka³; João de Jesus Viana Pinheiro⁴

¹Acadêmico de Odontologia; ²Mestranda em Odontologia; ³Doutora em Ciências Morfológicas; ⁴Doutor em Patologia Bucal

carol.proietti@hotmail.com

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a neoplasia maligna de glândula salivar mais prevalente. Clinicamente manifesta-se como um aumento de volume de evolução lenta, normalmente assintomático, ocorrendo em uma ampla faixa etária, que se estende da segunda até a sétima década de vida. A invasão tumoral do CME é um processo complexo mediado, dentre outros fatores, pela proliferação celular e proteólise localizada da matriz extracelular, promovida principalmente por enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs), onde se destacam as MMPs-2 e -9, visto que são gelatinases e degradam diversos componentes dessa matriz. Tais eventos podem ocorrer com a contribuição da metalotioneína (MT), proteína que funciona como reservatório intracelular de íons zinco, para ativação dessas proteases, bem como de certos fatores de transcrição. Estudos já demonstraram a presença e a relação da MT com o prognóstico dos carcinomas epidermoides, mas pouco se sabe sobre sua participação nos processos de invasividade no CME, e haja vista a semelhança histopatológica entre essas duas patologias, levanta-se a possibilidade da MT estar presente e participar da tumorigênese do CME. Pesquisas recentes têm citado a isoforma metalotioneína-2A (MT2A) como um importante marcador prognóstico em neoplasias de glândulas salivares, estando sua presença associada a um comportamento ainda mais agressivo e invasivo do tumor. Estudos demonstraram que a atividade proliferativa das células depende da ativação de fatores de crescimento (FCs) como do fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), do fator de crescimento epidérmico (EGF) e de seu receptor (EGFR). A presença desses FCs está relacionada à maior ativação de cascatas de fosforilação de proteínas, promovendo maior invasividade das neoplasias, agravando assim o prognóstico do tumor.

Objetivos: Analisar a expressão de metalotioneína, metaloproteinases e fatores de crescimento (TGF- α , TNF- α , EGF e EGFR) no comportamento biológico do CME, assim como correlacionar a expressão de metalotioneína com fatores de crescimento e com as metaloproteinases -2 e -9 numa linhagem celular derivada de CME. **Métodos:** As células da linhagem de CME foram descongeladas e cultivadas em frascos específicos em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para detectar a imunexpressão dos FCs na cultura, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços, submetidas ao protocolo de imunofluorescência indireta e as imagens adquiridas em microscópio de fluorescência. Para verificar a influência da metalotioneína na expressão das MMPs -2 e -9 realizou-se o silenciamento temporário do gene da MT2A empregando ensaio de RNA de interferência (siRNA), nas concentrações de 20, 30 e 40nM. A eficácia dessa técnica foi confirmada por western blot. Ensaios de western blot também foram realizados para avaliar a expressão da MT2A e das MMPs-2 e -9, além da análise do efeito do TGF- α sobre a expressão de MT2A. Para isso, as células de CME foram cultivadas em placas de 6 poços, até alcançarem a confluência. Depois, foram lisadas em tampão RIPA contendo inibidores de protease e quantificadas pelo método BCA. As amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra e carregadas em gel de poli(acrilamida) a 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em Tween-20 a 0,05% em TBS (do inglês tris-buffered saline), e incubadas com anticorpos anti-MT2A, anti-MMP-2, anti-MMP-9 e anti- β -actina. Esses

anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. O protocolo de quimioluminescência foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos. Para possibilitar a marcação com diferentes anticorpos, as membranas foram “stripped” com Restore Western Blot Stripping Buffer e submetidas à nova marcação. **Resultados/Discussão:** A técnica de imunofluorescência demonstrou imunopositividade para TGF- α , TNF- α e imunopositividade colocalizada do EGF com o seu receptor. A eficácia do ensaio que tinha como objetivo diminuir a expressão da MT foi verificada por meio de western blot, onde foi possível observar uma diminuição na expressão desta proteína na concentração de 40nM quando comparada ao grupo controle. Observamos que a depleção de MT2A, utilizando siRNA não alterou a expressão de MMP-2, no entanto ocasionou a diminuição na expressão de MMP-9, sugerindo a presença de correlação entre a expressão de metalotioneína e esta última metaloproteinase. A MMP-2 é uma metaloproteinase constitutiva e por essa razão pode não ter sofrido alteração mediante silenciamento do gene da MT2A. Por outro lado, a MMP-9 está envolvida diretamente na invasividade tumoral. Esse achado, portanto, sugere uma possível correlação entre MT2A e MMP-9. Estudos tem mostrado que a MT atua como doadora de íons zinco por ser reservatório natural deste metal. As MMPs são endopeptidases que dependem de zinco para exercer sua função enzimática, portanto a redução na expressão de MMP-9 pode ser justificada pela diminuição da expressão de MT2A. Os achados desse estudo reforçam outros que já observaram uma correlação positiva entre MT2A e MMP-9, sugerindo uma participação conjunta dessas proteínas no carcinoma de mama. Como ensaios de western blot também foi possível verificar a expressão de MT2A, das MMPs-2 e -9, ativa e inativa, além de correlacionar a expressão de MT2A com o TGF- α . Observou-se que com a indução das células do CME com o TGF- α no período de 24 horas houve aumento na expressão de MT2A, quando comparados aos controles, sugerindo uma relação concentração-dependente entre TGF- α e a MT2A. Efeito inverso foi observado quando as células do CME foram incubadas por um período de 48 horas. Hipoteticamente, a exposição aumentada ao TGF- α pode ter alcançado níveis tóxicos para a linhagem celular em estudo, podendo, por este motivo, ter levado a uma diminuição de suas atividades e conseqüentemente na expressão da MT2A. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram a expressão da metalotioneína, metaloproteinases da matriz-2 e 9, bem como dos fatores de crescimento TGF- α , TNF- α e EGF no carcinoma mucoepidermoide. A expressão de MT2A foi reduzida empregando siRNA e a expressão da MMP-9 foi diminuída. Sugerindo correlação entre a expressão de MT2A e MMP-9. A MT2A também teve sua expressão alterada com a incubação do TGF- α . Dessa forma, é possível sugerir correlação entre a expressão de MT2A e TGF- α no comportamento biológico do carcinoma mucoepidermoide *in vitro*.

Referências:

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):4717

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 Jan; 585(2):421-8.

KIM JY, LEE KJ, KIM HD, JEONG TC, LEE ES, CHOI YM, JEONG HG. **Cytokine-mediated induction of metallothionein in Hepa-1c1c7 cells by oleanolic acid.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004; 792–797.