

PES083 - TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR EXPRESSAM PROTEÍNAS RELACIONADAS AOS INVADOPÓDIOS: CORTACTINA, TKS-5, TKS-4 E MT1-MMP

NATACHA MALU MIRANDA DA COSTA¹; DIMITRA CASTELO BRANCO¹; WALESSA BRASIL DA SILVA¹; MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA²; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO²

natacha_malu@hotmail.com

¹Graduação, ²Doutorado

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: Os tumores de glândula salivar compreendem um gama de neoplasias benignas e malignas, com características clínicas e morfológicas variáveis. Dentre eles, podemos destacar o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o adenoma pleomórfico (AP). O CME é o tumor maligno de glândula salivar mais comum e mais reconhecido, chegando a representar 30% de todos os tumores malignos de glândula salivar. Essa neoplasia pode ser classificada pelo grau de malignidade e padrão histológico. Para os casos de grau intermediário, e, sobretudo, os de elevado grau de malignidade o prognóstico é mais limitado, tornando-se mais frequente a ocorrência de metástases e/ou recidivas, representando um sério agravo à saúde dos pacientes. O AP representa a neoplasia de glândula salivar mais frequente. Este tumor apresenta comportamento benigno e prognóstico favorável, mas pode ocorrer transformação maligna após tratamento inapropriado. Para compreendermos os processos inerentes relacionados ao comportamento de tais neoplasias é necessário elucidarmos os mecanismos moleculares relacionados à invasividade tumoral. A disseminação neoplásica é um processo complexo mediado, dentre outros fatores, pela proliferação celular e pela proteólise localizada da matriz extracelular (MEC), realizada principalmente por enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs). Ao longo do processo de disseminação e metástase do CME e progressão tumoral do AP, MMPs são liberadas, propiciando a invasividade local de tais neoplasias. Possivelmente a ativação e liberação focal das MMPs sejam mediadas pelos invadopódios, protruções da membrana celular responsáveis pela degradação focal da MEC. Existe uma variedade de proteínas relacionadas à formação dos invadopódios. Dentre elas podemos destacar a cortactina, o substrato de tirosina quinase-5 (TKs-5), o substrato de tirosina quinase-4 (TKs-4) e a metaloproteinase transmembrana tipo 1 (MT1-MMP). A cortactina é responsável pela regulação da polimerização da actina, que constitui o citoesqueleto dessas estruturas subcelulares, sendo recrutada na etapa de iniciação dos invadopódios. Ao longo desta etapa, sinalizações fazem com que substratos da família Src sejam ativados, dentre eles a TKs-5 e TKs-4. A TKs-5 participa na alongação da estrutura e possivelmente está associada à cortactina. Já a TKs-4 é responsável por regular a localização, a secreção e a estabilização da MT1-MMP. Com a MT1-MMP estabilizada, as MMPs serão ativadas resultando na proteólise localizada da MEC e, por conseguinte, a invasão tumoral.

Objetivos: Verificar a expressão de cortactina, TKs-4, TKs-5 e MT1-MMP no CME, AP e em glândula salivar (GS) por imunohistoquímica para avaliar se há diferença na imunoexpressão entre tais grupos e também esclarecer possíveis eventos celulares relacionados ao comportamento biológico das duas neoplasias em questão. **Métodos:** Para o delineamento do estudo foram utilizados onze (11) casos de CME, onze (11) de AP e dez (10) de GS. Todas as amostras foram adquiridas nos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará (CESUPA) e no Hospital Ophir Loyola. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade

Federal do Pará (parecer nº 329.843). Os blocos de parafina contendo as amostras foram submetidos a cortes seriados com 3 µm de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram montados em lâminas de vidro tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano, seguindo uma sequência de diafanização em xilol e hidratação em sequência decrescente de etanol. Após isso, as lâminas foram então imersas em solução de H₂O₂ a 20% e metanol, na proporção 1:1, durante 20 minutos para inibição da atividade da peroxidase endógena. Feita esta etapa, a recuperação antigênica foi efetuada em tampão citrato (pH 6,0) em câmara Pascal durante 30 segundos. Ligações inespecíficas dos anticorpos foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 hora e subsequente incubação com anticorpos primários anti-cortactina (1:200), anti-TKs-5 (1:25), anti-TKs-4 (1:25) e anti-MT1-MMP (1:50) por 1 hora. Posteriormente, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o sistema de detecção EnVision Plus. Diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno e, em seguida, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer e montados com Permount. A avaliação da imunomarcação foi realizada pelas medidas de área (µm) e de fração (%) de marcação das proteínas estudadas nas amostras de CME, AP e GS. Imagens de campo claro de pelo menos seis (6) áreas selecionadas aleatoriamente foram adquiridas em microscópio Axio Scope, com objetiva de 40x. Para quantificar a imunomarcação das proteínas foi utilizado o software de domínio público ImageJ. Para tratamento estatístico foi utilizado o software GraphPad Prism 5. As diferenças entre as áreas marcadas entre os grupos estudados foi verificado pelo teste Mann-Whitney. Para verificarmos correlação entre as proteínas foi utilizado o teste de Spearman. **Resultados e Discussão:** A cortactina, TKs-5, TKs-4 e MT1-MMP foram detectadas em todas as amostras de CME, AP e GS. No CME, todas as proteínas mostraram intensa marcação citoplasmática predominantemente nas células intemediárias e epidermóides. O AP histologicamente apresenta um parênquima tumoral enriquecido com células epiteliais, mioepiteliais e estruturas ductiformes que permeia em estroma mixomatoso. No AP ocorreu marcação de todas as proteínas exclusivamente no citoplasma das células epiteliais, mioepiteliais e ductais. Tanto o CME como o AP apresentaram marcação das proteínas apenas em algumas áreas do estroma tumoral. Na GS notou-se leve marcação apenas nas estruturas ductais e mioepiteliais. Após análise estatística os resultados demonstraram elevada expressão dessas proteínas nas células neoplásicas do CME em relação ao AP e GS (p < 0,05). Ao compararmos o parênquima com o estroma da mesma neoplasia evidenciou-se maior expressão proteica nas células neoplásicas (p < 0,001). O teste de correlação demonstrou no CME correlação da cortactina com TKs-5 e MT1-MMP (p < 0,05). **Conclusão:** Os resultados revelaram a superexpressão de cortactina, TKs-5, TKs-4 e MT1-MMP no CME em relação ao AP e GS. Observou-se também elevada imunoexpressão da TKs-4 e MT1-MMP no AP quando comparado com GS. Em conjunto, esses resultados sugerem uma possível participação dos invadopódios no comportamento biológico destas lesões, possibilitando a elaboração de fármacos na tentativa de reduzir o prognóstico desfavorável do CME e elevada taxa de recidiva do AP.

Referências Bibliográficas:

Falcão AS, Kataoka MS, Ribeiro NA, Diniz JA, Jr., Alves SM, Jr., Ribeiro AL, et al. A novel cell line derived from pleomorphic adenoma expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and shows numeric chromosomal anomalies. PloS one. 2014;9(8):e105231.

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 Mar;44(3):222-31.

Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jul;12(7):413-26.