

PES141 - INFLUÊNCIA DA METALOTIONEÍNA NA ATIVIDADE PROLIFERATIVA DO CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO

CAIO TADASHI SAAB ABE¹; ADRIANY DIAS FERNANDES¹; EDUARDO LUIS DE SOUZA CRUZ¹; JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO²; SÉRGIO DE MELO ALVES JÚNIOR²

caioabe16@gmail.com

¹Graduação, ²Doutorado

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: O Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) é uma neoplasia maligna que acomete especialmente as glândulas salivares menores, sendo responsável por cerca de 10 a 15% de todos os tumores na região da cabeça e pescoço. Esta neoplasia frequentemente dá origem a lesões muito invasivas, com altas taxas de recorrência, metástase e mortalidade. A invasão tumoral inerente ao CAC 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). Sabe-se que as MMPs são endopeptidases que dependem de zinco para exercer sua função enzimática. Desse modo, os fenômenos relacionados às MMPs podem ocorrer com o auxílio da metalotioneína, proteína que funciona como reservatório intracelular de íons zinco para a ativação dessas proteases, bem como de certos fatores de transcrição. Além disso, a metalotioneína tem sido correlacionada com vários eventos, como reparo celular, proliferação, diferenciação e carcinogênese. Ainda, faz-se necessário estabelecer o papel da metalotioneína na regulação de eventos celulares como a proliferação, capaz de promover o avanço da doença e, por conseguinte, agravar o prognóstico. A adequada compreensão entre a metalotioneína e a proliferação do carcinoma adenoide cístico será de extrema importância para um melhor conhecimento da patogenia deste tumor, podendo futuramente auxiliar em seu tratamento. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é correlacionar a expressão de metalotioneína com a taxa de proliferação celular no carcinoma adenoide cístico. **Métodos:** Para realização do cultivo celular, a linhagem celular CAC2, derivada de carcinoma adenoide cístico humano, foi descongelada e transferida para frascos de 25cm² de área cultivável, em meio de cultivo DMEM-F/12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Com o objetivo de uma melhor compreensão do padrão de proliferação celular da linhagem CAC2, bem como do seu período de maior viabilidade, realizou-se as curvas de crescimento. Para isso, as células foram desprendidas enzimaticamente do frasco de cultivo com solução de tripsina-EDTA a 0,25% e transferidas para uma placa de 24 poços, onde cada poço recebeu uma concentração de 1 x 10⁴ células em um volume de 500µL de meio de cultivo DMEM-F/12 suplementado. As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C em ambiente úmido contendo 5% de CO₂ e contadas após 24, 48 e 72 horas. Para a contagem celular utilizou-se uma câmara de Neubauer e o método de exclusão de morte celular com marcação pelo azul de trypan a 0,4% em microscópio de contraste de fase. Para que houvesse uma melhor compreensão do papel da metalotioneína (isoforma MT2A) sobre a atividade proliferativa dessa linhagem celular, sua expressão foi reduzida utilizando RNA de interferência (siRNA). Com este propósito, essas células foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 50% de confluência. A seguir, o meio de transfecção, o reagente de transfecção e o siRNA para MT2A, na concentração de 30nm, foram

misturados e incubados à linhagem. Após o período de incubação, as células transfectadas com siRNA foram submetidas ao protocolo de curva de crescimento. Por fim, para observar se o tratamento com siRNA diminuiu a expressão de metalotioneína, a linhagem foi submetida à técnica de Western Blot. Para isso, foi realizada a quantificação das amostras pelo método BCA e, em seguida, foram carregadas em gel de poliacrilamida para que assim passassem pelo processo de eletroforese possibilitando a separação das proteínas por peso molecular. Após isso, houve a transferência destas proteínas para uma membrana de nitrocelulose, assim como a incubação dos anticorpos. Por fim, aplicou-se o protocolo de quimioluminescência para que a reação entre antígeno e anticorpo fosse evidenciada em um filme radiográfico. Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5 e o teste utilizado para comparação entre os grupos foi o de Mann-Whitney. **Resultados e Discussão:** Os resultados obtidos mostram que as células tratadas com siRNA não apresentaram uma diferença significativa na proliferação celular no período de adaptação (24 horas), no entanto, apresentaram uma diminuição significativa nos períodos de 48 (p**Conclusão:** A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que a metalotioneína (MT2A) está diretamente relacionada com a atividade proliferativa apresentada pelo carcinoma adenoide cístico, visto que com a sua expressão diminuída, houve uma redução significativa na taxa de proliferação celular da linhagem CAC2.

Referências Bibliográficas:

- Dantas AN, Morais EF, Macedo RAP, Tinôco JML, Morais MLSA. Clinico pathological characteristics and perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015; 81(3):329-35.
- Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, Poorten VV, Triantafyllou A, Hunt JL, et al. Adenoidcystic carcinoma of the head and neck – an update. *Oral Oncol.* 2015 Jul; 51(7):652–61.
- Sakulsak N. Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int. J. Morphol.* 2012; 30(3):1007-1012.
- King JC. Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J ClinNutr.* 2011 Aug; 94(2):679S–84S.
- 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 Jan; 585(2):421-8.