

ANÁLISE CITOGENÉTICA E SUA RELAÇÃO COM A INVASÃO TUMORAL EM UMA LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

João Rafael Habib Souza Aquime¹; Lara Carolina D'Araújo Pinto²; Nelson Antônio Bailão Ribeiro³; Maria Sueli da Silva Kataoka⁴; João de Jesus Viana Pinheiro⁴

¹Graduação, ²Mestrado, ^{3,4}Doutorado

^{1,2,4}Universidade Federal do Pará (UFPA),

³Universidade do Estado do Pará (UEPA)

joao_habib@hotmail.com

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. 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, à diferenciação celular, espaços císticos e atipia celular. 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. 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. 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 metaloproteínases da matriz (MMPs), responsáveis pela remodelação tecidual, especialmente pela degradação dos componentes da matriz extracelular, incluindo colágenos, elastina, gelatina e proteoglicanos, 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. Estudos comprovaram que a expressão de MMP-2 e MMP-9 está relacionada ao comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares. O resultado dessa proteólise localizada possivelmente libera fatores de crescimento que, por sua vez, ativam vias de sinalização celular, resultando em maior atividade proliferativa da linhagem. No entanto, sabe-se que além de fatores estimulatórios, o crescimento tumoral envolve ainda fatores inibitórios, 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 e, por isso, de ação contrária à tumorigênese. **Objetivos:** Este trabalho visou avaliar a expressão das MMPs -2 e -9 e do TNF- α , assim como correlacionar os achados citogenéticos da linhagem com a expressão dessas proteínas envolvidas no processo de invasão tumoral. **Métodos:** Utilizou-se a linhagem celular denominada CME, derivada de carcinoma mucoepidermoide. As células, então, foram cultivadas em frascos específicos com meio de cultura DMEM F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas em incubadora na temperatura de 37°C e em atmosfera úmida de 5% de CO₂, até alcançarem a confluência necessária para a realização dos ensaios. Para verificar se as proteínas de interesse estavam presentes na linhagem, executou-se a técnica

de imunofluorescência indireta. Para tal, as 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 a 0,05%. Posteriormente foram bloqueadas com 10% de soro de cabra e incubadas com anticorpos primários (Anti-MMP2, Anti-MMP9 e Anti-TNF α) em PBS/BSA a 1% (do inglês Phosphate Buffered Saline/ Bovine Serum Albumin) e anticorpos secundários conjugados à Alexa Fluor 488 ou 588. Para a análise citogenética, os cromossomos metafásicos foram obtidos por meio da adição de 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 e submetidas à técnica de bandeamento G, com solução de Wright, para a identificação das alterações cromossômicas numéricas e estruturais. As lâminas processadas foram visualizadas em foto microscópio e capturadas usando-se uma câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio, com objetiva de imersão (100x) e ocular de 10x. Para a análise das células utilizou-se o sistema de software 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 e a correlação com as proteínas de interesse foi feita utilizando um atlas de genética e citogenética em oncologia. **Resultados e Discussão:** As células derivadas de CME demonstraram imunexpressão positiva para as MMPs -2 e -9 e para o TNF- α , sugerindo a presença dessas proteínas na linhagem. A análise citogenética, por sua vez, revelou alterações numéricas e estruturais. A identificação de alterações cromossômicas específicas em neoplasias é considerada um 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. 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, 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 à 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. Em contraste, a MMP-9 possivelmente apresenta atuação determinante na instalação e progressão neoplásica do CME, visto que é codificada pelo gene homônimo, localizado no cromossomo 20 na região 20q13.12, o qual apresentou alterações numéricas de trissomia e tetrassomia. Tais resultados sugerem a presença de cópias extras do gene que codifica essa MMP, denotando assim, sua maior expressão e provável contribuição ao comportamento invasivo da neoplasia. **Conclusão:** Com os resultados obtidos, é possível sugerir a presença e participação das proteínas estudadas na linhagem celular derivada de carcinoma mucoepidermoide, todas atuando no complexo processo de invasão tumoral dessa neoplasia.

Referências:

1. McHugh CH, Roberts DB, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS et al. Prognostic Factors in Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Glands. *Cancer*. 2012;118(16):3928-36.
2. 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.
3. Van Horsen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 2006;11(4):397-408.
4. 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.
5. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology, 2012. Disponível em <http://atlasgeneticsoncology.org/>.