

Neliana Salomão Rodrigues

**Influência das células mioepiteliais
neoplásicas benignas de adenoma
pleomórfico na produção de MMPs -1, -2, -
8, -9 e -13 por células epiteliais malignas e
sua possível relação com o índice de
invasão**

ARAÇATUBA-SP

2015

Neliana Salomão Rodrigues

**Influência das células mioepiteliais
neoplásicas benignas de adenoma
pleomórfico na produção de MMPs -1, -2, -
8, -9 e -13 por células epiteliais malignas e
sua possível relação com o índice de
invasão**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia do Câmpus de Araçatuba-Unesp, para
obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia”- Área
de concentração Estomatologia

Orientador: Profa.Dra. Cristiane Furuse

**ARAÇATUBA-SP
2015**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R696i Rodrigues, Neliana Salomão
Influência das células mioepiteliais neoplásicas
Benignas de adenoma pleomórfico na produção de
MMPs -1, -2, -8, -9 e -13 por células epiteliais malignas
e sua possível relação com o índice de invasão /
Neliana Salomão Rodrigues. - Araçatuba, 2015
71 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Furuse

1. Glândulas salivares 2. Metaloproteases 3. Adeno-
carcinoma I. Título

Black D6
CDD 617.63

Dedicatória

A minha família, minha orientadora e meus amigos com muito amor, alegria, carinho, admiração, gratidão pela capacidade de acreditar no meu trabalho, pela compreensão, carinho, respeito, presença, grande incentivo e apoio ao longo do período de elaboração deste projeto.

Agradecimentos Especiais

A **Deus**, meu mestre e protetor sempre presente, me protegendo, orientando e abençoando meus passos.

A **Nossa Senhora Aparecida**, por interceder sempre por mim, guiando e abrindo os meus caminhos.

Aos meus pais, **Newton e Cristina**, meu irmão **Renan** por proporcionarem a concretização deste sonho e sempre me apoiarem em todos os sentidos e em todas as situações, me incentivando a continuar e jamais desanimar ou desistir diante de qualquer obstáculo. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação e compreensão de vocês.

A **minha família**, em especial, a minha madrinha, **Aparecida (Tia Pá) e prima Luísa**, pelo apoio, torcida e orações.

A minha orientadora, Professora Doutora **Cristiane Furuse**, pelo exemplo de profissional e ser humano que é. Obrigada por extrair e querer sempre o meu melhor. Obrigada por me incentivar e apoiar sempre e principalmente por acreditar no meu trabalho. Muito obrigada de todo coração pelo privilégio de tê-la como orientadora, professora e amiga, por todo conhecimento transmitido e incentivo ao aprendizado e pelo exemplo de profissionalismo, ética e sabedoria que levarei para sempre em minha vida.

Aos Professores Doutores **Glauco Issamu Miyahara, Daniel Galera Bernabé, Ana Maria Pires Soubhia, Ana Cláudia Okamoto, Éder Ricardo Biasoli, Renata Callestini, Marcelo Macedo Crivelini, Leda Maria Pescinini Salzedas, Sandra Helena Penha Oliveira e Antonio Hernades** pelos valiosos ensinamentos profissionais e humanos, pela atenção e colaboração em todos os momentos, pela colaboração e fundamental ajuda na realização deste Projeto.

Em especial aos Professores Doutores **Vera Cavalcanti de Araujo, Elizabeth Ferreira Martinez, Carolina Amália Barcellos da Silva, Ana Paula Dias Demasi** e as funcionárias **Jerusa, Pollyana, Vanessa, Nadir e Rita** por toda contribuição, dedicação e essencial assistência para a realização deste trabalho e pela competência, bondade e generosidade com que nos recebeu e acolheu no laboratório de Patologia da Faculdade São Leopoldo Mandic.

Aos queridos amigos e funcionários **Giseli Mitsuy Kayahara, Adriana Rahal e Miriam Lima** e em especial ao **José Marcelo Tramarim**, por toda contribuição, dedicação, carinho e amizade na execução desta pesquisa e pelo companheirismo durante este período. A amizade, carinho, força e os ensinamentos de vocês foram fundamentais para minha evolução como pessoa e como profissional. Levarei para sempre em meu coração esta amizade e carinho recebido de vocês.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic e Laboratório de Farmacologia**, na pessoa da **Profa. Sandra Helena Penha Oliveira** pela oportunidade e por toda estrutura e suporte viabilizados para realização desta pesquisa.

Ao **CNPQ e FAPESP**, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Aos meus amigos **Gláucia, Noelle, Sidnei, Victor, Aline, Lígia, Maurício, Murilo, Jéssica, Carluci e Simone**, pela amizade incondicional, e pela troca de conhecimento e experiência, compartilhando comigo os momentos bons e ruins, sempre me dando força e coragem para prosseguir. Obrigada pelo apoio e pelos ensinamentos de vida, por me influenciaram e incentivaram a trilhar este caminho. Sem vocês esta caminhada seria muito mais difícil. Estarão sempre em meu coração.

As secretárias do **Programa da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP** **Valéria, Lilian e Cristiane** pela total disponibilidade em nos ajudar sempre e pela amizade.

As queridas amigas **Laíse e Elisa**, amigas fundamentais nesta caminhada, sempre me incentivando, motivando e apoiando nos momentos difíceis, compreendendo minha ausência, mesmo distantes, estavam sempre torcendo pela minha vitória.

A minha amiga e companheira de iniciação científica, **Marina**, pela fundamental ajuda na realização desta pesquisa, pelo carinho e amizade que construímos nesse tempo.

Ao **Sr. Amintas**, nosso querido motorista e amigo, por todo apoio e carinho com o qual me conduziu durante esta caminhada.

A todos meus **amigos**, que souberam compreender minha ausência.
Obrigada por fazerem parte da minha vida.

A **todos**, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Epígrafe

“ No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Rodrigues, NS. Influência das células mioepiteliais neoplásicas benignas de adenoma pleomórfico na produção de MMPs -1, -2, -8, -9 e -13 por células epiteliais malignas e sua possível relação com o índice de invasão [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

A célula mioepitelial é um componente de diversos órgãos glandulares, incluindo glândulas salivares e mamárias, que auxilia na excreção do conteúdo glandular, atuando também na sua embriogênese e morfogênese. Além de suas funções normais, ação supressora tumoral tem sido atribuída a esta célula. Utilizando como modelo o Carcinoma Ex-Adenoma Pleomórfico, neoplasia maligna proveniente da malignização das células do Adenoma Pleomórfico (AP), foi estudada a influência das células mioepiteliais neoplásicas no comportamento invasivo de células epiteliais malignas, em um estudo *in vitro*. Para isso, células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27, ATCC) e de carcinoma ductal (HS578T, ATCC) foram cultivadas em câmaras de invasão, sobre matrigel, com meios condicionados de células mioepiteliais de AP por 96 h. Foi calculado o índice de invasão, quantificada a secreção de MMPs-1,-2,-8,-9 e -13 e de TIMP-1 e -2, por meio de ELISA, e a atividade proteolítica por Zimografia. Os resultados foram submetidos à análise estatística e demonstraram que os meios condicionados de células mioepiteliais provocaram aumento do potencial invasivo de ambas as células malignas. Os meios condicionados exibiram, em geral, maiores quantidades e atividades proteolíticas de MMPs-1 e -2 e quantidades de TIMPs-1 e -2 do que as células malignas. A MMP-8 apresentou baixos níveis em todas as amostras e as MMPs-9 e -13 não foram detectadas. Nestas condições experimentais, as células mioepiteliais promoveram aumento do comportamento invasivo das células epiteliais malignas e as MMPs-1 e -2 produzidas por elas podem estar envolvidas no processo.

Palavras chaves: Glândulas salivares, metaloproteinases e adenocarcinoma

Rodrigues, NS. Influence of benign neoplastic myoepithelial cells of pleomorphic adenoma in the production of MMPs -1, -2, -8, -9 and -13 for malignant epithelial cells and their possible relationship with the invasion index [dissertation]. Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2005.

ABSTRACT

The myoepithelial cell is a component of various glandular organs, including salivary and mammary glands, which aids in the excretion of glandular content, also acting in embryogenesis and morphogenesis of the gland. In addition to their normal functions, tumor suppressive action has been attributed to this cell. Using as a model the carcinoma ex pleomorphic adenoma, malignant neoplasm from the malignancy of pleomorphic adenoma cells (PA), the influence of neoplastic myoepithelial cells in the invasive behavior of malignant epithelial cells in an *in vitro* study was studied. Therefore, cells of oral squamous cell carcinoma (CAL 27, ATCC) and ductal carcinoma (HS578T, ATCC) were cultured in invasion chambers on matrigel with conditioned media of myoepithelial cells of PA for 96 hours. We calculated the invasion index, quantified the secretion of MMP-1, -2, -8, -9 and -13 and TIMP-1 and -2 by ELISA and the proteolytic activity by zymography. The results were statistically analyzed and showed that the conditioned media of myoepithelial cells caused increased invasive potential of both malignant cells. The conditioned media showed, in general, larger amounts and proteolytic activities of MMP-1 and -2 and amounts of TIMP-1 and -2 than the malignant cells. MMP-8 was decreased in all samples and MMP-9 and -13 were not detected. Under these experimental conditions, myoepithelial cells caused an increase in invasive behavior of malignant epithelial cells and MMP-1 and -2 produced by them may be involved in the process.

Keywords: Salivary glands, metalloproteinases, adenocarcinoma

Listas de Figuras

Gráfico 1- Índice de invasão de células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença e ausência de meio condicionado de células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15). Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

31

Gráfico 2- Secreção de MMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

32

Gráfico 3- Secreção de MMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

33

Gráfico 4- Secreção de MMP-8 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

34

Gráfico 5- A atividade proteolítica da MMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

35

Gráfico 6- A atividade proteolítica da MMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

36

Gráfico 7- A atividade proteolítica da MMP-8 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

37

Gráfico 8- Secreção de TIMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

38

Gráfico 9- Secreção de TIMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes independentes em triplicata Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Listas de Abreviaturas

ANOVA -	análise de variância
ATCC -	<i>American type culture collection</i>
AP -	adenoma pleomórfico
AP3 -	células mioepiteliais do adenoma pleomórfico nº3
AP4 -	células mioepiteliais do adenoma pleomórfico nº4
AP8 -	células mioepiteliais do adenoma pleomórfico nº8
α -AML -	alfa-actina de músculo liso
CaCl -	cloreto de cálcio
CAL27	linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide bucal
CD -	carcinoma ductal
CD10 -	proteína da superfície celular
CEB -	carcinoma epidermoide bucal
CK7 -	citoqueratina 7
CK14-	citoqueratina 14
CME -	célula mioepitelial
°C -	grau Celsius
CXAP -	carcinoma ex-adenoma pleomórfico
CXCL12	quimiocina da família CXC ligante 12
CXCL14-	quimiocina da família CXC ligante 14
CXCR4-	receptor da família CXC ligante 4
DMEM -	meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
D2-40-	marcador endotelial linfático
ELISA-	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF-2-	fator de crescimento de fibroblastos 2
h -	hora(s)

HS578T-	linhagem celular derivada de carcinoma ductal de mama
H ₂ O -	água
IL-6 -	interleucina 6
IL-8 -	interleucina 8
kDa -	quilodalton
LDL -	lipoproteína de baixa densidade
LRP1 -	proteína-1 receptora de baixa densidade
MEC -	matriz extracelular
mL -	mililitro
mm -	milímetros
MMPs -	metaloproteinases da matriz (<i>matrix metalloproteinases</i>)
MMP-1 -	metaloproteinase da matriz 2 (<i>matrix metalloproteinase 1</i>)
MMP-2 -	metaloproteinase da matriz 9 (<i>matrix metalloproteinase 2</i>)
MMP-8 -	metaloproteinase da matriz 9 (<i>matrix metalloproteinase 8</i>)
MMP-9 -	metaloproteinase da matriz 9 (<i>matrix metalloproteinase 9</i>)
MMP-13 -	metaloproteinase da matriz 9 (<i>matrix metalloproteinase 13</i>)
MT-MMP-	metaloproteinase da matriz tipo membrana
nm -	nanômetro
PET -	polietireno terefelato
pH -	potencial hidroxiliônico
PMA -	phorbol-12-miristato-13-acetato
p63 -	membro da família do gene p53
SBF -	soro fetal bovino
SDS -	sodium dodecyl sulfate
TIMPs -	inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (<i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>)

TIMP-1 -	inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz 1 (<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1</i>)
TIMP-2 -	inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz 2 (<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2</i>)
Tris-HCl-	trisaminometano ácido clorídrico
µg -	micrograma
µL -	microlitro
µm -	micrômetro

Sumário

1.INTRODUÇÃO	19
2.PROPOSIÇÃO	25
3.MATERIAL E MÉTODOS	27
4.RESULTADOS	31
5.DISSCUSSÃO	41
6.CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A	57
ANEXO B	58

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A célula mioepitelial é uma célula epitelial que apresenta alguns aspectos de células musculares. Ela está presente não apenas nas glândulas salivares, mas também em outras glândulas exócrinas como mamária, sudorípara, lacrimal e nas glândulas mucosas e muco-serosas do trato digestório, localizando-se entre as células acinares e ductais e a membrana basal. Ainda envolve com seus prolongamentos ácinos e ductos intercalares e por vezes estriados (1-5).

Quanto à sua função, acreditava-se, no passado, que seu papel era apenas restrito à ação contrátil, auxiliando na excreção do conteúdo glandular (3,4). Na atualidade, sabe-se que ela apresenta muitas outras funções tanto na embriogênese da glândula normal quanto nos tumores. Durante o desenvolvimento embrionário, elas atuam na morfogênese exercendo papel na ramificação e promovendo a diferenciação das células epiteliais. Também são responsáveis pela síntese de matriz extracelular, especialmente membrana basal. Na glândula normal, as células mioepiteliais exercem um papel parácrino regulador de trocas de eletrólitos bem como de sinalização endócrina, além de auxiliar a excreção de seus produtos (6-8).

Atualmente, foi atribuído às células mioepiteliais o papel supressor de tumor, promovendo defesa importante contra a invasão do câncer. Esta atribuição é baseada na capacidade da célula mioepitelial acumular quantidades abundantes de matriz extracelular e de secretar níveis baixos de proteases capazes de degradar a matriz e ao mesmo tempo altos níveis de maspina e outros inibidores de proteases (9,10) e diminuição da expressão de genes de fatores angiogênicos (8). Além disso, foi demonstrado que as células mioepiteliais normais exercem um efeito supressor parácrino através da diminuição da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) por fibroblastos e células tumorais (11-24).

O Carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) é uma neoplasia maligna proveniente da malignização de uma neoplasia benigna, o Adenoma Pleomórfico, representando um interessante modelo para o estudo dos eventos que ocorrem durante o processo de transformação maligna, tanto das modificações que ocorrem nas células tumorais bem como nas células e tecidos adjacentes (25). Como em 75% dos CXAPs ocorre somente a transformação maligna das células luminais (epiteliais) do AP, este tumor possibilita o estudo do papel das células mioepiteliais benignas,

que circundam estas células, na transição do estágio *in situ* a invasivo desta neoplasia (26).

Altemani et al. (2005) (26) demonstraram que, nas áreas *in situ* dos CXAP com transformação maligna das células luminais das estruturas ductais do adenoma pleomórfico, as células mioepiteliais benignas que circundam estas estruturas apresentaram forte marcação para Alfa-actina de músculo liso (α -AML) e citoqueratina 14 (CK14). A forte marcação para CK14, possivelmente, melhora a ancoragem celular à membrana basal, sendo uma importante defesa contra a invasão. Durante a aquisição do fenótipo maligno pelas células epiteliais das estruturas ductais do adenoma pleomórfico, as células mioepiteliais em contato com estas são estimuladas a alcançar completa diferenciação, apresentando imunofenótipo semelhante ao das células mioepiteliais maduras dos ductos intercalares da glândula salivar normal.

Em um novo estudo, Araújo et al. (2006) (25) investigaram o imunoperfil das células mioepiteliais benignas em áreas de CXAP *in situ* e compararam com células mioepiteliais de estruturas ductiformes do adenoma pleomórfico. A expressão de α -AML, calponina, CK14, p63, CD10, D2-40, laminina e maspina foi mais forte nas células mioepiteliais que circundavam as células epiteliais malignas do que nas células mioepiteliais benignas das estruturas ductiformes do adenoma pleomórfico, demonstrando que as células mioepiteliais benignas são, provavelmente sinalizadas no começo da transformação maligna a se diferenciarem e produzir importantes proteínas relacionadas à função supressora de tumor. Parece que, pelo menos naquele momento, há uma tentativa de conter as células malignas, sugerindo, portanto, que o mioepitélio provavelmente desempenhe papel importante supressor tumoral nesta fase inicial da carcinogênese do adenoma pleomórfico.

No entanto, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* recentes utilizaram diferentes sistemas experimentais e demonstraram que o crescimento, a polaridade, a sobrevivência e o comportamento de células cancerosas da mama poderiam ser modulados pelas células mioepiteliais e outras células estromais e que também diversos genes estariam implicados nos processos de invasão e progressão tumoral (27).

Allinen et al. (2004) (28), demonstraram que as células mioepiteliais presentes em um carcinoma *in situ* se apresentaram anormais e neoplásicas,

secretando quimiocinas e outros fatores promotores de crescimento, distinguindo fortemente de células mioepiteliais normais e indicando que essas células neoplásicas não enviam corretamente sinais para a polarização das células luminiais. Ainda por meio deste estudo, foi identificada a expressão gênica distinta entre as células mioepiteliais neoplásicas e normais. Os investigadores notaram que as células mioepiteliais neoplásicas exibiram grandes alterações na expressão gênica e altos níveis de quimiocina CXCL14.

Recentemente, as quimiocinas CXCL12/SDF-1 e o receptor CXCR4 foram identificados no favorecimento do crescimento das células tumorais e metástase (29). Enquanto no estudo efetuado por Martinez et al.(2010) (30) as células mioepiteliais das áreas *in situ* de CXAP demonstraram um aumento de FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos), enquanto seu receptor foi expresso nas células epiteliais malignas, sugerindo uma possível atuação parácrina do FGF-2 expresso pelas células mioepiteliais, exercendo um possível papel facilitador da invasão tumoral

Sabe-se que as células tumorais não são as únicas responsáveis pelo comportamento do tumor. Células normais do estroma do hospedeiro, como fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias e também as células mioepiteliais podem exercer influência direta ou indireta nos processos de invasão e metástase. A interação entre as células tumorais e as células do estroma do hospedeiro é essencial para criar um microambiente que leva à progressão tumoral (31). O papel do microambiente tumoral na carcinogênese tem representado uma grande área de interesse dos pesquisadores, isto é devido a estudos recentes demonstrarem que alterações genéticas, como a perda de funções normais ocorrem não somente nas células tumorais, mas também nas células do estroma e células mioepiteliais (32).

Durante o processo de invasão das células tumorais ocorre degradação da membrana basal e matriz extracelular. Dentre as enzimas degradadoras de matriz extracelular, destacam-se as Metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs são classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural, além do substrato específico para degradação. Existem mais de 25 subtipos de MMPs identificadas em mamíferos, sendo 23 delas encontradas em seres humanos e são divididas em subgrupos das collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases,

metaloelastase, metaloproteinases tipo membrana e outras MMP de acordo com a especificidade e função do substrato (33).

As collagenases 1, 2 e 3 (MMP-1, -8 e -13) degradam o colágeno intersticial tipos I, II e III, além de digerirem outras moléculas da matriz extracelular. As gelatinases A e B (MMP-2 e -9) degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas) e colágeno tipo IV, enquanto as estromelinas 1 e 2 (MMP-3 e -10) podem degradar fibronectina e proteoglicanas. As matrilisinas 1 e 2 (MMP-7 e -26, respectivamente) digerem diversos componentes da matriz, dentre os quais estão a fibronectina e o colágeno tipo IV. As MT-MMP são numeradas de 1 a 6: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP, correspondendo respectivamente às MMP- 14, -15, -16, -17, -24 e -25. Além de apresentarem papel importante na ativação das outras MMP, os subtipos das MT-MMP são responsáveis pela degradação de diferentes componentes da matriz extracelular (33). As MMP são produzidas e secretadas na forma de pró-enzimas, zimógenos, que são posteriormente ativadas, sendo o controle da quantidade de enzima ativa feito pelos inibidores teciduais das MMP (TIMPs).

A membrana basal é a primeira e principal estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células neoplásicas. Desta forma, as MMP-2 e MMP-9 têm papel fundamental na progressão tumoral uma vez que atuam diretamente sobre os componentes da membrana basal. Altos níveis das MMP- 2 e -9 foram relatados em cânceres com grande potencial de invasão e metástase. Ikebe et al. (1999) (34) verificaram em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, que as MMP-2 e -9 estavam correlacionadas com o potencial de invasão. Hong et al. (2000) (35), em estudo com carcinomas epidermóides bucais metastáticos e não-metastáticos, também verificaram que os níveis de MMP-2 e -9 são indicadores do potencial de invasão e metástase.

As collagenases (MMPs-1, -8 e -13), por degradarem colágeno fibrilar tipos I, II e III, são essenciais na invasão e progressão das células malignas. Vários estudos demonstraram a super-expressão de collagenases em tumores malignos quando comparados ao tecido normal, sugerindo sua importância na invasão das células tumorais. A MMP-1 tem sido demonstrada em uma variedade de cânceres avançados e sua presença local ou superexpressão é associada a pobre prognóstico em carcinomas colorretal, gástricos e esofágicos bem como em melanoma metastático e adenocarcinoma metastático (36-41).

A MMP-8 é a collagenase mais efetiva na degradação do colágeno tipo I e foi também detectada em alguns tumores malignos, incluindo os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e cânceres ovarianos (42,43). A MMP-13 também tem sido detectada em muitos tumores invasivos como carcinomas de mama, carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, melanomas primários e metastáticos entre outros. Uma vez que ela não foi observada em lesões pré-malignas da pele, em pele intacta ou em cicatrização nem em queratinócitos normais cultivados, a expressão da MMP-13 parece servir como um marcador da transformação das células do epitélio escamoso (44-51).

Na intenção de criar o microambiente tumoral baseado nos estudos prévios, utilizamos como modelo o CXAP, onde foi investigada a influência da célula mioepitelial neoplásica benigna no potencial de invasão de células epiteliais malignas em ensaios de invasão com técnica de cultivo celular. O presente projeto buscou investigar também o envolvimento das metaloproteinases da matriz (MMPs) para o melhor entendimento do mecanismo exercido pela célula mioepitelial no processo de invasão tumoral.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência das células mioepiteliais neoplásicas benignas de Adenomas Pleomórficos de glândula salivar, por meio de seus meios condicionados, no comportamento invasivo de células epiteliais malignas do Carcinoma Epidermoide Bucal e do Carcinoma Ductal, e a possível relação com a secreção e atividade das metaloproteinases (MMPs) -1, -2, -8, -9 e -13, , e secreção de inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) -1 e -2

Material e Método

3.MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo *in vitro*, com técnicas de cultivo celular, utilizando-se de câmaras de invasão a fim de verificar o potencial invasivo das células eitepias malignas em diferentes condições. Testes ELISA foram realizados para a quantificação da secreção de MMPs e TIMPs, e zimografia para a análise da atividade proteolítica das enzimas. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas (Pelotas-RS), sob parecer nº 08/2012.

3.1. Cultura de células

Foram utilizadas células mioepiteliais neoplásicas benignas de Adenomas Pleomórficos de glândula salivar provenientes de três diferentes pacientes (AP3, AP8 e AP15) e linhagens de células epiteliais malignas de um Carcinoma Epidermoide Bucal (HS578T) e um Carcinoma Ductal (CAL 27), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em estufa a 37°C. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas e a troca dos meios de cultivo dos frascos a cada três dias.

3.2. Ensaios de invasão

Os ensaios *in vitro* foram executados em câmaras de invasão com uma membrana PET (polietileno terefelato) com poros de 8µm, gerando dois compartimentos distintos, não permitindo a passagem involuntária das células de uma face da membrana para outra. A fim de mimetizar a membrana basal, esta membrana PET foi recoberta com membrana basal reconstituída-Matrigel (BD matrigel matrix BD matrigel matrix, lot A2586).

As células epiteliais malignas foram plaqueadas no compartimento superior da câmara em uma densidade de 110 células/mm². Após 48h do plaqueamento, nos grupos experimentais, o meio de cultura do compartimento superior foi

substituído pelo meio condicionado de células mioepiteliais dos adenomas pleomórficos (AP). No compartimento inferior, utilizou somente meio DMEM com 1% de solução antibiótica-antimicótica sem soro fetal bovino. Nos grupos controles, as células foram cultivadas somente em meio DMEM com 1% de solução antibiótica-antimicótica e sem soro fetal bovino, em ambos os compartimentos. Após 96 horas, realizou-se a avaliação do índice de invasão das células malignas por meio da contagem das células presentes na face inferior das membranas (células invasoras).

Para isso, as células foram fixadas em metanol, coradas em HE e as membranas PET foram removidas do dispositivo e montadas em lâminas de vidro. Fotomicrografias com objetiva de 20x em 25 campos (quantidade máxima de campos para a área total da membrana) foram realizadas utilizando microscópio óptico de luz convencional (Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Götting, Germany) e a contagem das células foi realizada com auxílio do programa *Image J*.

Os ensaios de invasão foram realizados em triplicata e em 3 dias diferentes.

Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para posterior análise por ELISA e Zimografia

3.3. ELISA

Para a investigação da produção de MMPs-1, -2, -8, -9 e -13 e das TIMPs-1 e -2 pelos grupos controles e experimentais, foram utilizados Human MMP-ELISA kit (cat no.RAB0361Sigma), seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, seguiram-se os seguintes passos, intercalados por lavagens: as placas de 96 poços foram revestidas com anticorpo de detecção com incubação *overnight* a 4°C; incubação das soluções-padrão contendo diferentes concentrações das proteínas avaliadas e as amostras por 1h em temperatura ambiente; incubação do anticorpo de detecção conjugado à biotina (anti-MMP-1, -2, -8, -9 e -13 e anti-TIMP-1 e -2) por 1h em temperatura ambiente; incubação da estreptavidina-HRP por meia hora em temperatura ambiente; adição do substrato TMB; adição do tampão de parada de reação (H₂SO₄).

As placas foram lidas em espectrofotômetro ThermoPlate® a 450nm.

3.4. Zimografia

A atividade proteolítica foi examinada com os substratos gelatina para MMP-2 e -9 e colágeno para MMP-1, -8 e -13, adicionados ao gel de poliacrilamida a 10%. As amostras dos grupos controles e experimentais foram misturadas ao tampão de amostra (2% SDS; 125mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aplicadas ao gel para eletroforese. Em seguida, o gel foi lavado 2x em Triton X-100 2% por 60 minutos à temperatura ambiente e incubado a 37°C por 24h (gelatinase) e 20h (colagenase) em tampão de incubação 10mM Tris-HCl pH 7,4 - 5mM CaCl₂. Após a incubação, os géis foram corados com Azul de Coomassie G-250 a 0,05%. A atividade proteolítica foi detectada como bandas não coradas no gel e quantificada por densitometria através do programa *Scion Image*

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de um critério de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Invasão celular

Os resultados do índice de invasão demonstraram que os meios condicionados das células mioepiteliais de todos os adenomas pleomórficos (AP3, AP8 e AP15) provocaram aumento dos índices de invasão tanto das células do carcinoma epidermoide bucal quanto do carcinoma ductal, sendo as células do carcinoma ductal (HS578T) muito mais invasivas do que as do carcinoma epidermoide bucal (CAL 27). Entretanto, para o carcinoma epidermoide bucal, este aumento foi de 142% (AP3), 196% (AP8) e 153% (AP15) ($p < 0,01$), enquanto que para o carcinoma ductal foi de apenas 20% (AP3), 40% (AP8) e 33% (AP15) ($p < 0,01$) (Gráfico 1).

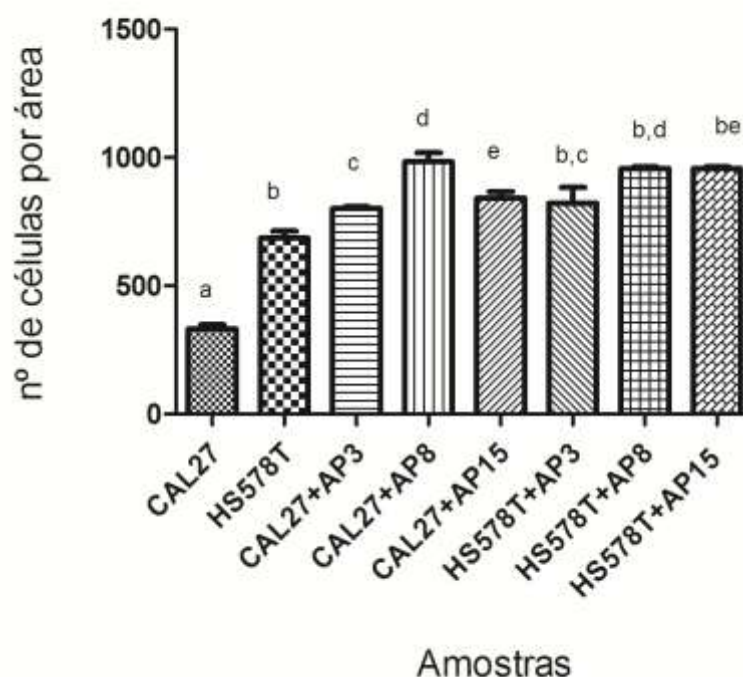


Gráfico 1: Índice de invasão de células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença e ausência de meio condicionado de células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15). Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

4.2. Expressão de MMPs

Através dos testes ELISA, quantificamos (proteínas totais: pro-enzimas + enzimas ativas) as gelatinases, MMP-2 e MMP-9 e as collagenases MMP-1, MMP-8 e MMP-13, nos sobrenadantes coletados nas diferentes condições do cultivo celular.

Pelos testes ELISA, os resultados mostraram que, as células do carcinoma ductal, secretam o dobro de MMP-2 totais em relação as células do carcinoma epidermoide bucal (1685,943 e 868,431ng/mL) ($p<0,01$). Curiosamente, as células AP3, AP8 e AP15 produziram maior quantidade de MMP-2 do que ambas as células malignas, sendo 2,1 vezes (AP3), 4,7 vezes (AP8) e 3,2 vezes (AP15) a produção das células do carcinoma ductal ($p<0,01$) A maioria das amostras dos grupos experimentais (CAL27/HS578T + APs) apresentaram valores intermediários entre a quantidade secretada pelas células malignas isoladas e pelos APs respectivos (Gráfico 2).

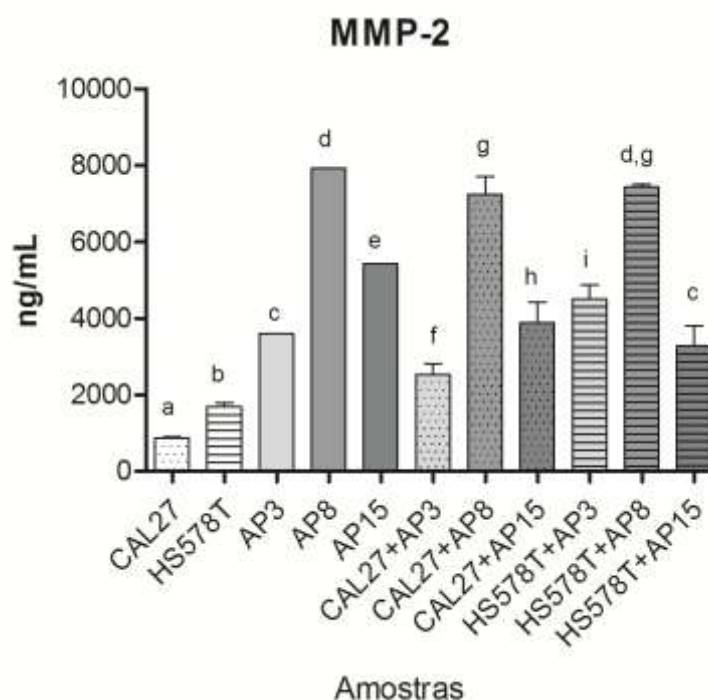


Gráfico 2: Secreção de MMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Na análise da MMP-1, observamos que as células do carcinoma epidermoide bucal e as células mioepiteliais produziram quantidades similares de proteínas totais ($p>0,01$), enquanto que as do carcinoma ductal não produziram níveis detectáveis. As amostras dos grupos experimentais CAL27 + APs apresentaram menores quantidades de MMP-1 que as da CAL27 e APs isoladas. Já as amostras HS578T + APs apresentaram quantidades maiores que a HS578T isoladas e menores que as amostras dos respectivos APs isolados (Gráfico 3).

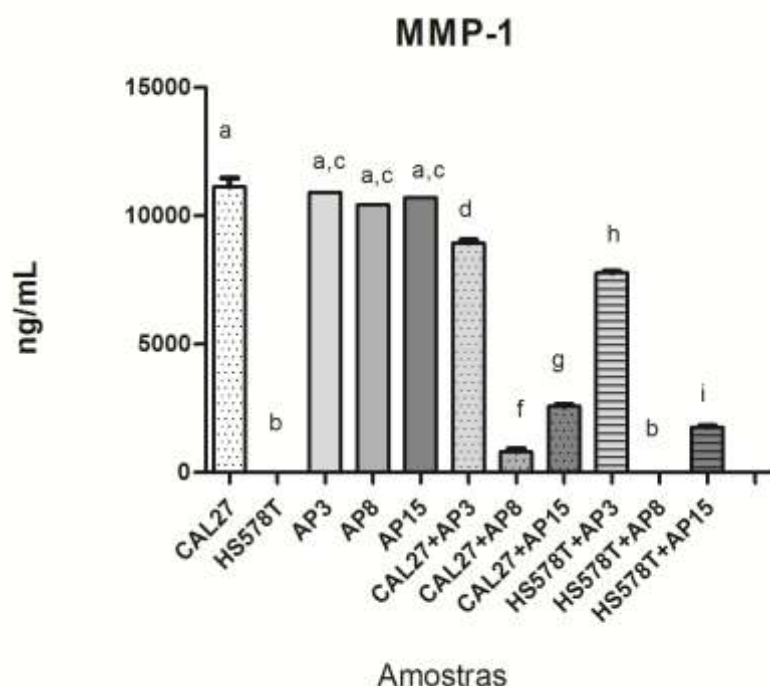


Gráfico 3: Secreção de MMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Para a MMP-8, os resultados mostraram maior produção pelas células do carcinoma epidermoide bucal ($p<0,01$), sendo 4 vezes maior que a das células do carcinoma ductal. As células mioepiteliais produziram quantidades menores ($p<0,01$) e apresentaram variações entre as linhagens ($p>0,01$). As amostras dos grupos experimentais CAL27 + APs apresentaram menores quantidades de MMP-8 que a da CAL27 isolada ($p<0,01$), e maiores que as dos APs isolados ($p>0,01$). Já as

amostras HS578T + APs apresentaram maiores quantidades que as da HS578T e respectivos APs isolados ($p < 0,01$) (Gráfico 4).

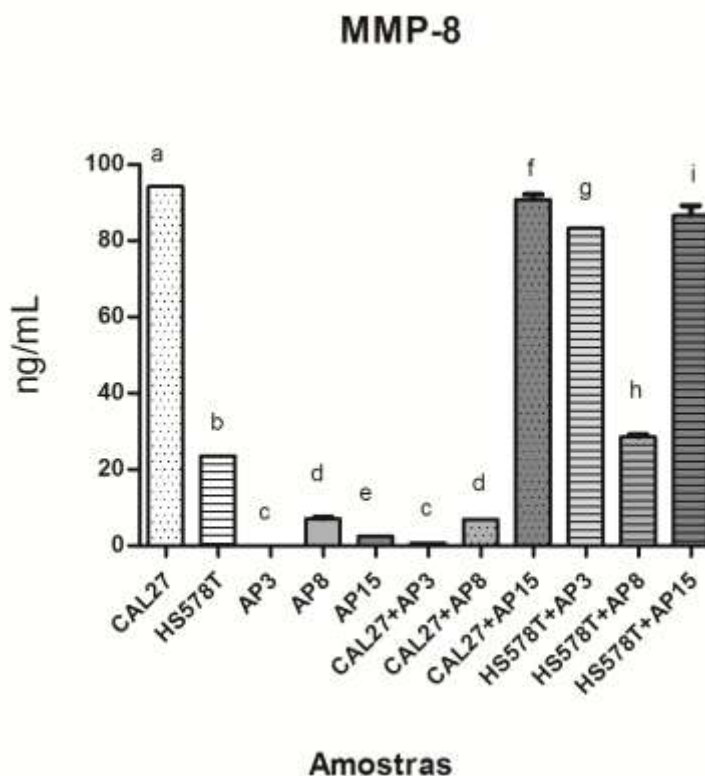


Gráfico 4: Secreção de MMP-8 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Não foram detectadas secreções de MMP-9 e -13 em nenhuma das amostras provenientes das diversas condições do cultivo celular.

4.3. Atividades proteolíticas: gelatinases e collagenases

Com a técnica de zimografia, analisamos de forma semi-quantitativa a atividade gelatinolítica e collagenolítica das MMPs (enzimas ativas).

Por meio da zimografia observamos que as variações de atividade de MMP-2 entre as diferentes condições testadas correspondem às variações de concentração

desta MMP (Gráfico 2), demonstrando assim, resultados similares aos obtidos com ELISA. Isto é, os grupos experimentais, ou seja, aqueles em que as células malignas foram cultivadas com os meios condicionados de células mioepiteliais benignas apresentaram maior atividade proteolítica da MMP-2 quando comparados às células malignas isoladas ($p < 0,01$); e uma redução da atividade quando comparados à dos seus meios condicionados, entretanto, se mostrando significativo ($p < 0,01$) (Gráfico 5).

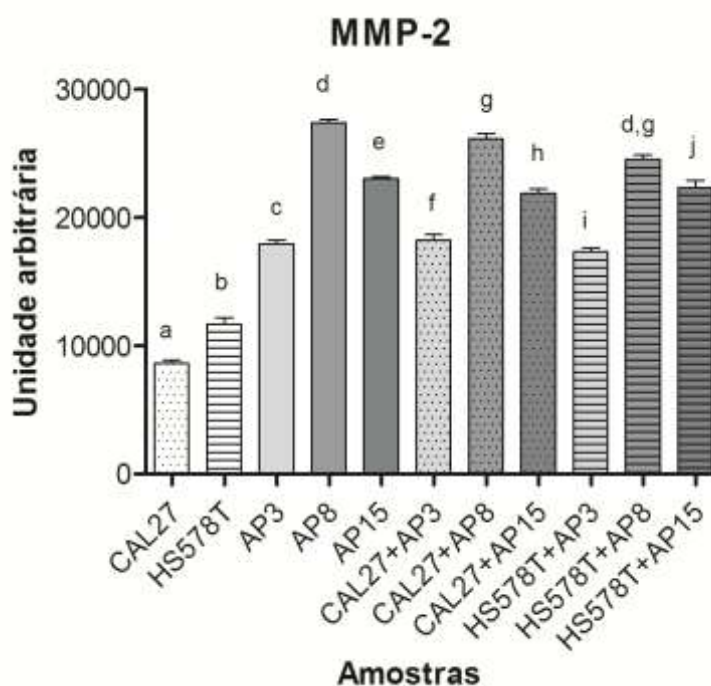


Gráfico 5: A atividade proteolítica da MMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Quando analisados os grupos experimentais, ou seja, aqueles em que as células malignas foram cultivadas nos meios condicionados de células epiteliais malignas, notou-se que a quantidade de MMP-2, verificada tanto pelo ELISA e Zimografia mostrou uma redução quando comparado às quantidades referentes aos seus meios condicionados.

A zimografia para MMP-1 mostrou maior atividade desta MMP no grupo CAL27 quando comparada ao grupo HS578T ($p<0,01$). Por esta técnica, as células mioepiteliais benignas apresentaram maior atividade colagenolítica que as malignas ($p<0,01$), embora entre o grupo dos APs, diferenças entre algumas linhagens celulares tenham sido observadas (AP3 e P15, $p<0,01$). Nos grupos experimentais, a atividade colagenolítica apresentou valores intermediários entre o das células malignas e o dos APs isolados respectivos ($p>0,01$) (Gráfico 6).

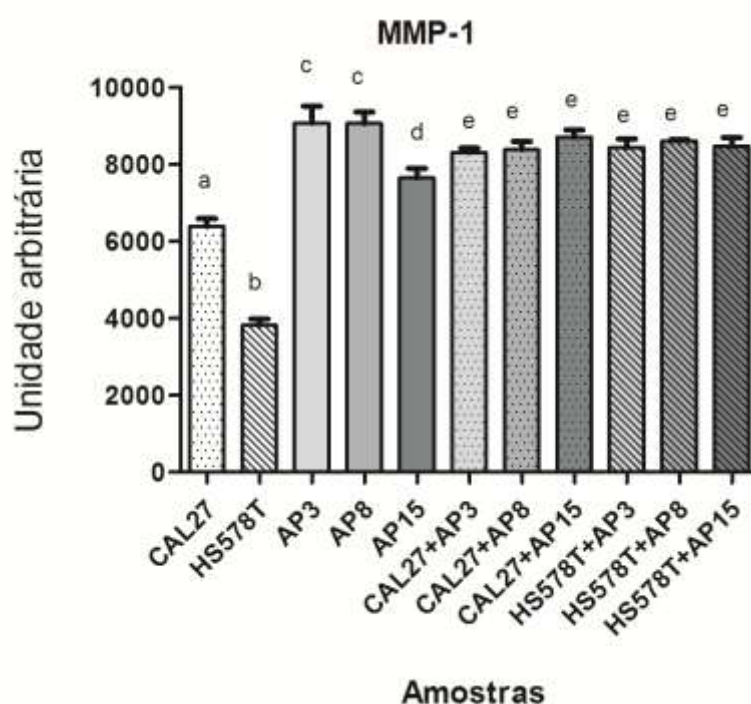


Gráfico 6: A atividade proteolítica da MMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Na verificação da atividade proteolítica da MMP-8 pela Zimografia, as células da CAL27 apresentaram, também, maior atividade enzimática que as células do HS578T ($p<0,01$). Os grupos dos APs, por essa técnica, apresentaram maior atividade que as células malignas, com diferenças entre as linhagens ($p<0,01$). A

maioria dos grupos experimentais apresentou menor atividade em relação à dos APs isolados respectivos. Quando os grupos experimentais foram comparados a sua respectiva célula maligna, variações na quantidade de atividade proteolítica foram observadas com a CAL25, sendo por vezes maior ou menor. Os grupos experimentais com a HS578T, entretanto, apresentaram sempre maior atividade que a HS578T isolada ($p < 0,01$) (Gráfico 7)

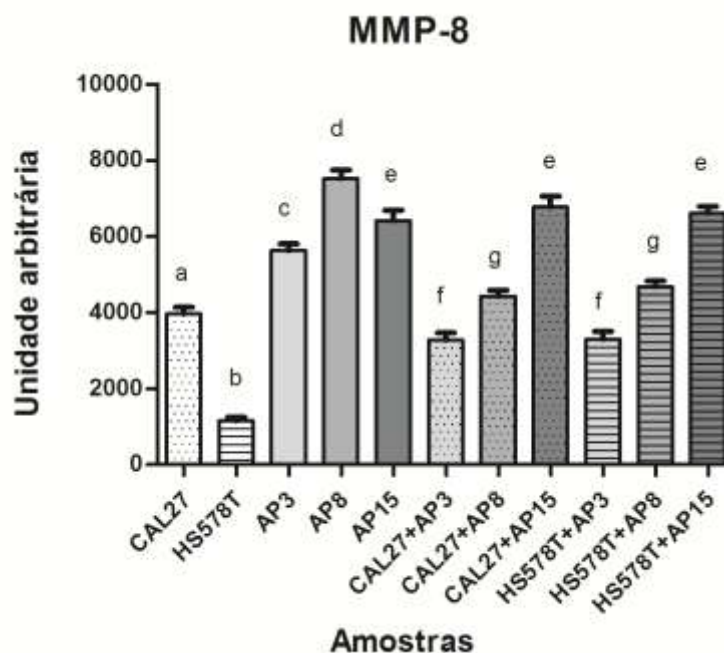


Gráfico 7: A atividade proteolítica da MMP-8 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através da zimografia. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Nenhuma das amostras provenientes das diversas condições de cultura celular exibiu níveis detectáveis de atividade proteolítica das MMPs-9 e -13.

A partir dos dados acima, notamos que, embora a secreção e a atividade proteolítica das MMP-2, MMP-1 e MMP-8 sejam maiores nos grupos experimentais (CAL27 + APs e HS578T + APs) que nos grupos controles malignos correspondentes (grupos CAL27 e HS578T), estes números são menores que a soma dos valores dos grupos controles malignos (CAL27 e HS578T) e benignos (AP3, AP8 e AP15) respectivos. Esse fato pode ser devido à destruição de parte das MMPs presentes no meio condicionado após o período experimental de 96h ou pela

menor produção delas pelas células malignas quando cultivadas em meio condicionado

4.4. Expressão de TIMPs (Inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz)

O ELISA para a quantificação de TIMP-1 mostrou baixa secreção por ambas as células malignas e grande secreção pelas células dos APs, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Todos os grupos experimentais apresentaram também grande quantidade de TIMP-1, discretamente inferior à dos APs ($p > 0,01$) (Gráfico 8).

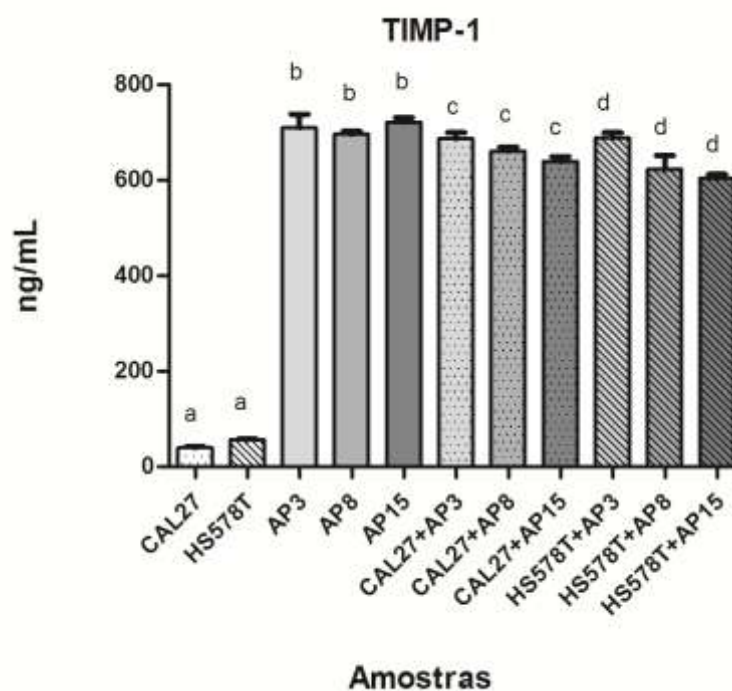


Gráfico 8- Secreção de TIMP-1 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

A TIMP-2 também foi secretada em pequenas quantidades pelas células malignas e em maiores quantidades pelos APs, sendo estatisticamente significativa esta diferença ($p < 0,01$), com diferença entre eles. Os grupos experimentais

apresentaram valores intermediários entre a quantidade secretada pelas células malignas isoladas e pelos APs respectivos (Gráfico 9).

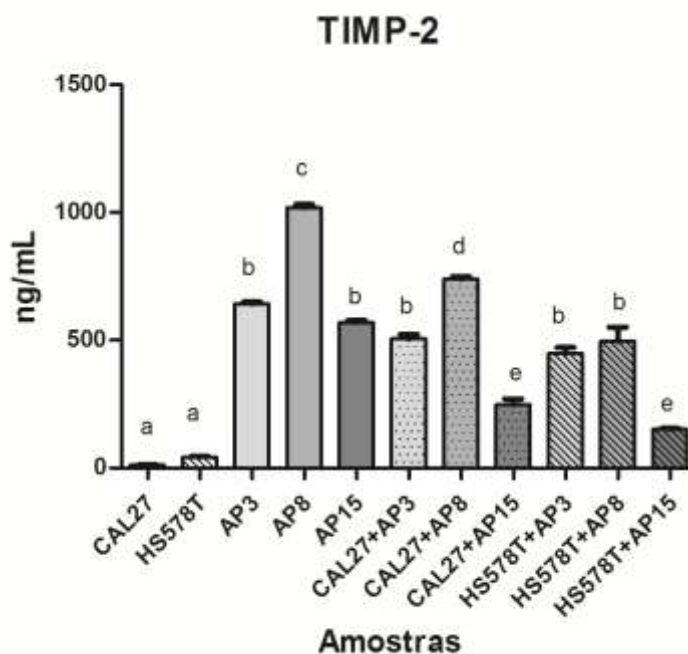


Gráfico 9- Secreção de TIMP-2 por células mioepiteliais derivadas de adenomas pleomórficos distintos (AP3, AP8 e AP15) e por células de carcinoma epidermoide bucal (CAL 27) e carcinoma ductal (HS578T) na presença ou ausência de meio condicionado das células mioepiteliais, através de ELISA. Valores representam média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA um critério de variância seguida por teste Tukey).

Discussão

5.DISCUSSÃO

Estudos recentes têm atribuído à célula mioepitelial um possível papel supressor tumoral (20,21,26). A fim de buscar um melhor entendimento acerca da influência dessas células no comportamento biológico das neoplasias malignas, este estudo utilizou como modelo o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP), uma neoplasia maligna resultante da malignização do adenoma pleomórfico. O adenoma pleomórfico é uma neoplasia glandular benigna composta por células lumbais e, principalmente, mioepiteliais, e sua malignização podem ocorrer em apenas um tipo celular, epitelial ou mioepitelial, ou, ainda, em ambos. Em 75% dos casos, a malignização se dá nas células lumbais (26), que se arranjam em estruturas ductiformes envolvidas pelas células mioepiteliais. A partir daí, o carcinoma evolui desta condição *in situ*, ou seja, ainda envolvido pelas células mioepiteliais benignas, para uma condição denominada intracapsular, quando esta camada é rompida, mas o carcinoma ainda se encontra no interior do adenoma pleomórfico que o originou. O carcinoma torna-se invasivo uma vez que as suas células invadem a cápsula do adenoma pleomórfico e/ou os tecidos circunjacentes (26).

Para mimetizar *in vitro* esta condição, ensaios de invasão em cultivo celular foram realizados utilizando células do carcinoma epidermoide bucal e do carcinoma ductal, pela similaridade com as células do CXAP, e meios condicionados de culturas primárias de adenomas pleomórficos de 3 doadores diferentes, a fim de se obter uma triplicata biológica.

Os resultados mostraram que os meios condicionados de células mioepiteliais provocaram aumento do índice de invasão de ambas as células malignas, embora um papel supressor tumoral tenha sido sugerido nos estudos de Barky, Karlin.(2005) (52), que enfatizaram o papel das células mioepiteliais neoplásicas no aumento da síntese de matriz extracelular, acumulando quantidades essenciais que servem de barreira mecânica e bioquímica contra a progressão. Entretanto, em um estudo *in vivo* com células mioepiteliais de áreas *in situ* de CXAP realizado por Martinez et al. (2015) (53), foi demonstrado que estas células podem favorecer a progressão tumoral, por meio de dois importantes achados, o primeiro, demonstrou que as células epiteliais malignas presentes no meio condicionado induzem a secreção de FGF-2 por células mioepiteliais, havendo uma interação parácrina entre a célula epitelial/mioepitelial, favorecendo o crescimento tumoral. Enquanto o segundo

achado, permitiu a observação da presença de citocinas na regulação do processo neoplásico, no qual houve grande produção de IL-6 pelas células mioepiteliais. Como se sabe por meio da literatura, a IL-6 é reconhecida pela sua ação promotora de crescimento em diversos tumores em seres humanos (53-55)

Na busca de um melhor entendimento do mecanismo envolvido na relação entre as células epiteliais malignas e as células mioepiteliais durante o processo de invasão tumoral, foram estudadas as metaloproteinases (MMPs), principais enzimas envolvidas na degradação da membrana basal e matriz extracelular, eventos fundamentais para a invasão celular, e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que modulam a ação das MMPs. Como as MMPs são secretadas na forma de pro-enzimas e que sua ativação e inativação podem depender de fatores não presentes na simulação *in vitro*, foram realizadas a quantificação das proteínas totais secretadas (pro-enzima e enzima), por ELISA, e a quantificação das enzimas ativas, por meio da zimografia.

Os resultados mostraram que a MMP-2 foi a MMP mais expressiva tanto nos grupos controles quanto experimentais. Ela tem sido relacionada principalmente à progressão tumoral, metástase e um pior prognóstico em diversos tipos de câncer, apresentando um papel fundamental na degradação da matriz extracelular, especialmente do colágeno tipo IV, o mais vital componente da membrana basal e maior barreira estrutural contra invasão de células tumorais (56,57). A MMP-2 foi observada em todas as amostras, sendo, entretanto, mais evidente nas células mioepiteliais dos adenomas pleomórficos do que em ambas células epiteliais malignas.

A maioria dos grupos experimentais, ou seja, naqueles em que as células malignas eram cultivadas com os meios condicionados dos APs, valores intermediários entre a quantidade secretada pelas células malignas isoladas e pelos APs respectivos. Este fato pode ser devido à degradação ou inibição de parte da MMP presente no meio condicionado após o período experimental de 96h e/ou pela menor produção dela pelas células malignas quando cultivadas em meio condicionado. A degradação ou inibição das MMPs é realizada principalmente pelos TIMPs (58,59), e os resultados mostraram a produção de TIMP-1 e TIMP-2 pelos grupos estudados, também principalmente pelas células mioepiteliais.

Entre as collagenases, a quantidade de MMP-1 foi mais expressiva, seguida pela MMP-8, e sua quantidade nas amostras malignas mostrou-se variável dependendo da origem da neoplasia, sendo abundantemente produzida pelas células do carcinoma epidermoide bucal e apresentando níveis não detectáveis pelas células do carcinoma ductal. Kayano et al. (2004) (58) verificaram também altos níveis de MMP-1 em tumores de glândula salivar. As collagenases estão implicadas na degradação do colágeno tipo I, II, III e V e clivagem do colágeno tipo IV, X e XIV. A MMP-1 foi observada em quase todas as amostras, inclusive em grandes quantidades nas das células mioepiteliais. por ambas as técnicas. Em algumas amostras, a Zimografia mostrou-se mais sensível, o que pode ser em decorrência desta técnica não ser tão específica quanto o ELISA.

O ELISA é específico para cada isoforma, ou seja, o anticorpo identifica a proteínase específica analisada; já a zimografia não exibe especificidade para cada isoforma uma vez que identifica a atividade proteolítica das MMPs pelos pesos moleculares, podendo identificar conjuntamente MMPs de pesos moleculares semelhantes. Ressaltamos que a MMP-1 apresenta peso molecular muito próximo aos das MMP-3 e MMP-10 (52, 57 e 57kDa, respectivamente) e estas degradam substratos em comum como colágeno III, VII e X, que podem ter sido interpretadas como uma única banda do gel pela Zimografia.

Da mesma forma que para a MMP-2, os grupos experimentais apresentaram quantidades menores de MMP-1 que os respectivos meios condicionados. Degradação desta MMP após 96h de cultivo pode ser um dos motivos, entretanto nossa metodologia não permite esta afirmação.

A MMP-8 foi encontrada em quantidades baixas em quase todas as amostras, fato esperado uma vez que esta MMP tem sido associada à supressão da progressão tumoral e metástase. Em estudo com pacientes portadores de câncer de mama e carcinoma epidermoide de língua, verificou-se aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) pela MMP-8, favorecendo o aumento da resposta imunológica do hospedeiro e conferindo um melhor prognóstico (60-62).

Sabe-se que as MMPs são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membrana basal favorecendo os processos de invasão tumoral e metástase. Entretanto, essas enzimas também atuam em condições fisiológicas, como na embriogênese, morfogênese e angiogênese (63,64), e em condições patológicas não neoplásicas como nas doenças cardiovasculares, doenças

inflamatórias e artrite reumatoide (33,65). Desta forma, embora a princípio inesperada, é compreensível a secreção de grandes quantidades de MMP-1 e MMP-2 pelas células mioepiteliais do AP, superiores até que as quantidades secretadas pelas células malignas. Isso ressalta a importância das MMPs também no crescimento tumoral, principalmente do AP que, muitas vezes apresenta abundante estroma hialino, condroide e osteoide.

Em nosso estudo, gelatinase B (MMP-9) e a collagenase 3 (MMP-13) não foram identificadas. Embora elas não tenham sido detectadas, vários trabalhos relacionam a MMP-9 e -13 a processos de invasão de células tumorais, envolvimento do sistema linfático, metástase, pior prognóstico e baixa sobrevida dos pacientes em diversos tipos de câncer, como carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, câncer de mama, ovário, estômago, câncer colorretal, condrossarcoma, câncer de vulva e melanomas, sendo sugerida como uma importante ferramenta usada para o prognóstico destas lesões (66-69).

Esta divergência de dados conflitantes da literatura pode ser reflexo da variação de comportamentos e mecanismos biológicos entre as lesões estudadas bem como da utilização de materiais e metodologias diversificadas. Inúmeros desenhos experimentais são encontrados na literatura, desde estudos *in vivo*, em humanos e animais, *in vitro* utilizando tecidos e células e até em equipamentos de simulação, o que contribuem para a diversidade de resultados. Baseado na literatura, a não detecção das MMPs-9 e -13 no presente estudo pode estar fortemente justificada pela metodologia aplicada. Na década de 90, foi descoberto que algumas MMPs têm uma vida muito curta no espaço extracelular, sendo a endocitose pelas próprias células que as produzem o processo responsável.

Em 1994, Omura et al. (70) verificaram, em estudo com linhagem de célula ostoblástica de osteossarcoma de rato, que a concentração da collagenase secretada (MMP-13) após tratamento com hormônio paratireoideano atingia um pico entre 12-24h e declinava a níveis indetectáveis em 96h. Os autores excluíram experimentalmente a possibilidade de degradação espontânea ou extracelular mediada por células, e estudos de internalização revelaram o envolvimento de um processo mediado por receptor específico que promovia o acúmulo intracelular da collagenase, atingindo níveis máximos em 30 minutos e completa degradação em 90 minutos, eliminando a collagenase extracelular.

Em 1999, Barmina et al. (71) demonstraram que o desaparecimento era devido à endocitose da MMP-13 pelo LRP1 (Low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1 (LRP1, or CD91)) com auxílio de um receptor específico da MMP-13 de 170 kD. Várias proteases, na forma precursora ou ativa, seus inibidores endógenos e complexos protease-inibidor podem também se ligar e ser internalizado pelo LRP1, entre elas a MMP-9 (72,73). Vale ressaltar que a quantificação da secreção e a atividade enzimática das MMPs-9 e -13 foram feitas após 96h de cultivo celular.

Tendo em vista as limitações do estudo *in vitro* ao mesmo tempo consciente de sua importância no entendimento dos processos neoplásicos, o presente estudo permitiu, em uma análise geral dos resultados, verificar que, nessas condições experimentais, as células mioepiteliais neoplásicas benignas atuaram como promotoras da invasão das células epiteliais malignas do carcinoma epidermoide bucal e do carcinoma ductal. Um dos mecanismos envolvidos pode ser pelo incremento principalmente de MMPs-2, -1 produzidas por elas e inseridas por meio de seus meios condicionados. Para a comprovação deste mecanismo e o envolvimento de outras MMPs, inclusive da 9 e da 13, pesquisas adicionais e metodologias complementares devem ser realizados. A compreensão da participação das MMPs nos processos de invasão tumoral e metástase pode contribuir para a concepção de futuras terapias.

Conclusões

6. CONCLUSÓES

1. Os meios condicionados de células mioepiteliais aumentaram o potencial invasivo de ambas as células malignas;
2. Sobrenadante das células mioepiteliais benignas apresentam maior produção e atividades proteolíticas de MMPs-1, -2 e -8, bem como maior produção de TIMPs-1 e -2, do que o sobrenadante das células malignas;
3. As MMP-9 e -13 não foram detectadas pelas metodologias empregadas.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- 1) Dardick I, Rippstein P, Skimming L, Boivin M, Parks WR, Dairkee SH. Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: histogenetic implications for salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64(6):703-15
- 2) Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery IP, Koteliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(3):999-1003.
- 3) Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. *Microscopy Res Techn* 1994;27:25-45.
- 4) Hardy G, Kramer B. The myoepithelium of human major salivary glands revisited. *SADJ* 1998;57(7):371-5.
- 5) Savera AT, Zarbo RJ. Defining the role of myoepithelium in salivary gland neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2004;11(2):69-85.
- 6) Hara K, Ito M, Takeuchi J, Iijima S, Endo T, Hidaka H. Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Arch Pathol Anat* 1983;40:237-49
- 7) Zarbo RJ, Regezi JA, Batsakis JG. S-100 protein in salivary gland tumors: an immunohistochemical study of 129 cases. *Head Neck Surg* 1986;8:268-75.
- 8) Gugliotta P, Sapino A, Macrí L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G. Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. *J Histochem Cytochem* 1988;36:659-63.
- 9) Araújo VC, Araújo NS. Vimentin as a marker of myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990;247:252-5.
- 10) Hirano T, Gluckman JL, De Vries EJ. The expression of α vascular smooth-muscle actin in salivary gland tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:692-6.
- 11) Jones H, Moshtael F, Simpson RHW. Immunoreactivity of α -smooth muscle actin in salivary gland tumours: a comparison with S100 protein. *J Clin Pathol* 1992;45:938-40.
- 12) Van den Oord JJ, Sunardhi-Widyaputra S, Van Damme B, De Ley M. Monoclonal antibody to liver metallothionein: a novel marker for myoepithelial cells. *Pathol Res Pract* 1993;189(10):1187-90.
- 13) Araújo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors. A comparative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:387-91.

- 14)Savera AT, Gown AM, Zarbo RJ. Immunolocalization of three novel smooth muscle specific proteins in salivary gland pleomorphic adenoma: assessment of the morphogenetic role of myoepithelium. *Mod Pathol* 1997;10:1093-100.
- 15)Foschini MP, Scarpellini F, Gown AM, Eusebi V. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweat and mammary glands. *Int J Surg Pathol* 2000;8:29-37
- 16)Reis-Filho JS, Milanezi F, Silva P, Schmitt FC. Maspín expression in myoepithelial tumors of the breast. *Pathol Res Pract* 2001;197(12):817-21.
- 17)Batistatou A, Stefanou D, Arkoumani E, Agnantis NJ. The usefulness of p63 as a marker of breast myoepithelial cells. *In Vivo* 2003;17(6):573-6.
- 18)Rabban JT, Chen YY. D2-40 expression by breast myoepithelium: potential pitfalls in distinguishing intralymphatic carcinoma from in situ carcinoma. *Hum Pathol* 2008;39(2):175-83.
- 19)Sternlicht MD, Safarians S, Rivera SP, Barsky SH. Characterizations of the extracellular matrix and proteinase inhibitor content of human myoepithelial tumors. *Lab Invest* 1996;74(4):781-96.
- 20)Sternlicht MD, Barsky SH. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med Hypotheses* 1997;48(1):37-46
- 21)Batsakis JG, el-Naggar AK. Myoepithelium in salivary and mammary neoplasms is host-friendly. *Adv Anat Pathol* 1999;6(4):218-26.
- 22)Navarro Rde L, Martins MT, de Araújo VC. Maspín expression in normal and neoplastic salivary gland. *J Oral Pathol Med* 2004;33(7):435-40.
- 23)Furuse, C, Sousa SCOM, Nunes FD, Magalhaes MHCG, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *International Journal of Surgical Pathology* 2005;13(1):57-65
- 24)Araújo VC, Sousa SOM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *AIMM* 2000;8:195-202.
- 25)Araújo VC, Altemani A, Furuse C, Martins MT, Araújo NS. Immunoprofile of reactive salivary myoepithelial cells in intraductal areas of carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(10):1011-16
- 26)Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXAP): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathol.* 2005; 46(6):635-41.

- 27)Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 2001;11(2):97-104.
- 28)Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004; 6(1):17-32
- 29)Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2003; 17(5): 792-803.
- 30)Martinez EF, Demasi AP, Miguita L, Altemani A, Araújo NS, Araújo VC. FGF-2 is overexpressed in myoepithelial cells of carcinoma ex-pleomorphic adenoma in situ structures. *Oncol Rep*. 2010; 24(1): 155-60
- 31)Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, Offner FA, Mikuz G, Dirnhof S, Moch H. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:2499– 505.
- 32)Bissel MJ, Radisky D. Putting tumors in context. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(1):46-54.
- 33)Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011;278(1):16-27
- 34)Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(4):315-23
- 35)Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36(2):207-13.
- 36)Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996;2(4):461–2.
- 37)Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 1998A;43(6):791–7
- 38)Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 1998B;185(3):256–61.

- 39) Ito T, Ito M, Shiozawa J, Naito S, Kanematsu T, Sekine I. Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor. *Mod Pathol* 1999;12(7):669–74.
- 40) Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri V-M, Pyrhönen S. High expression levels of collagenase-1 (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 2002;97(4):432–8.
- 41) Nikkola-Paakkari J, Vihinen P, Vuoristo M, Kellokumpu-Lehtinen P, Kähäri V-M, Pyrhönen S. Prognostic value of serum gelatinase-B (MMP-9) and collagenase-1 (MMP-1) and collagenase-3 (MMP-13) in human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(14):5158–66.
- 42) Moilanen M, Pirilä E, Grénman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2002;197:72–81.
- 43) Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, Offner FA, Mikuz G, Dirnhofer S, Moch H. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:2499–505.
- 44) Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269:16766–73
- 45) Airola K, Johansson N, Kariniemi A-L, Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol* 1997;109:225–31.
- 46) Johansson N, Airola K, Grénman R, Kariniemi A-L, Saarialho-Kere U, Kähäri V-M. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997; 151:499–508.
- 47) Uriá JA, Stähle-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997;57:4882–8.
- 48) Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, Balbín M, López JM, Vizoso F, Fernandez PL, Iwata K, Cardesa A, López-Otín C, Campo E. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998;186:144–50
- 49) Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK, Saarialho-Kere UK. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 1999;80:733–43.

- 50)Nielsen BS, Rank F, Lopéz JM, Balbín M, Vizoso F, Lund LR, Danø K, López-Otín C. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:7091–100.
- 51)Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri V-M, Pyrhönen S. High collagenase-1 expression correlates with a favourable chemoimmunotherapy response in human metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2001;11:157–66.
- 52)Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; 10(3):249-60.
- 53)Martinez EF, Araujo NS, Araujo VC. How do benign myoepithelial cells from in situ areas of carcinomaex-pleomorphic adenoma favor tumor progression?. *J. Cell Commun. Signal*. 2015;9: 279-80.
- 54)Aoki Y, Jaffe ES, Chang Y, Jones K, Teruya-Feldstein J, Moore PS, Tosato G. Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood*. 1999; 93:4034–4
- 55)Jee SH, Shen SC, Chiu HC, TsaiWL, Kuo ML. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases antiapoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene*. 2001;20:198–208
- 56)Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2002;2: 157-66.
- 57)Roomi MV, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Patterns of MMP-2 and MMP9 expression in human câncer cell lines. *Oncology Reports*. 2009;21:1323-33.
- 58)Kayano et al. Activation of pro-MMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. *J Pathol*. 2004;4:403-11.
- 59)Alexander CM, Werb Z: Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J Cell Biol* 1992, 118:727–39
- 60)Li DQ, Shang TY, Kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. egulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-

- 3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(7): 2928-36.
- 61) Thirkettle S, Decock J, Arnold H, Pennington CJ, Jaworski DM, Edwards DR. Matrix metalloproteinase 8 (collagenase 2) induces the expression of interleukins 6 and 8 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2013;23:16282-94.
- 62) Gutiérrez- Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ et al. Matrix Metalloproteinase 8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* 2008;68: 2755-63
- 63) Kupai K, Szucz G, Cseh S, Hadju I, Csonka C, Csont T et al. Matrix Metalloproteinase activity assays: Importance of Zimography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2010;61:205-09
- 64) Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Mäkitie AA, Irish J, Gilbert R et al. Expression of matrix metalloproteinase-1, -7, -9, -13, Ki-67, and HER-2 in epithelial-myoeplithelial salivary gland cancer. *Head Neck.* 2010 Aug;32(8):1019-27. doi: 10.1002/hed.21277.
- 65) Singh RD, Haridas N, Patel JB, Shah FD, Shukla SN, Shah PM et al. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors: Correlation with Invasion and Metastasis in Oral Cancer. *Ind J Clin Biochem.* 2010;3:250-9
- 66) 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. *Histopathol.* 2009; 55(3):250-60.
- 67) O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:813–20.
- 68) Luukkaa H, Klemi P, Hirsimaäki P, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -9 and -13 as prognostic factors in salivary gland cancer. *Acta Otolaryngol* 2008;128:482–90.
- 69) Mardani M, Andisheh-Tadbir A, Khademi B, Biparva P, Malekzadeh M. Serum level of matrix metalloproteinase-9 in patients with salivary gland tumor. *J Dent.* 2014;4:199-203.
- 70) Omura TH, Noguchi A, Johannis CA, Jeffrey JJ, Partridge NC. Identification of a specific receptor of interstitial collagenase on osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 1994;269: 24994-8

- 71) Barmina OU, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JM, López-Otín C, Jeffrey JJ et al. Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem.* 1999;274(42):87-93
- 72) Van den Steen PE, Van Aelst I, Piccard H, Fiten P, Jacobsen C et al. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem.* 2006;281; 18626-37
- 73) Yamamoto K, Murphy G, Troeberg L. Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biology.* 2015;15;1-9

Anexos

Anexo A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

PELOTAS, 10 de abril de 2012

PARECER Nº 08 /2012

O projeto de pesquisa intitulado "Influência das células mioepiteliais neoplásticas benignas de adenoma pleomórfico na produção de MMPs-1, -2, -8, -9 e -13 por células epiteliais malignas e sua relação com o índice de invasão" está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "R. Waldemarin", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Renato Fabrício de Andrade Waldemarin
Coordenador em Exercício do CEP- FOP/UFPEl

Anexo B- Normas da revista selecionada para a publicação do artigo

Types of paper

Oral Oncology accepts the following article types for publication:

Editorial:

Authors who are considering submitting an editorial should contact the Editor-in-Chief with a brief outline of the proposed contribution before submission. Editorials are welcome on any topic; however, they may also be related to work previously published in Oral Oncology. Editorials have no abstract and no keywords, and are usually restricted to 1500 words, up to 10 references and up to 2 tables or figures if not agreed otherwise with the Editor-in-Chief. The Editor-in-Chief can be contacted at ooncology@elsevier.com.

Original Research Articles:

Original research articles present results of original epidemiology and public health, basic, clinical and/or translational (basic research with clinical applications) research. This article focuses on new data collected by the author(s) during the course of a epidemiology and public health research; basic investigation; clinical trial; or translational research, although other studies may be cited for support. Original research articles, which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as original full-length research papers. The article should contain the following sections: Title Page, Abstract, Conflict of Interest Statement, Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, Discussion, and Conclusion. Mechanics: Research articles should contain an abstract, a list of up to 10 keywords and have a limit of 3,500 words, 7 figures and/or tables, and 60 references.

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

By means of a "Conflict of interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, please state "None declared". This document should be found as a separate page within the manuscript and placed directly below the title page.

Role of the Funding Source

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship and acknowledgments

All authors must meet the ICMJE authorship criteria (http://www.icmje.org/ethical_1author.html). The corresponding author must submit a completed [Author Form](#) with their submission. The form must be signed by the corresponding author on behalf of all authors and can be scanned and uploaded to EES. If you are unable to upload your Author Form to EES, please contact the Editorial Office (ooncology@elsevier.com) for further information. No subsequent change in authorship will be possible.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at

the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the

research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct

scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/oo>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Online-only publication

Oral Oncology offers authors the opportunity to select online-only publication as their preferred option for publishing original research papers in the journal, rather than print publication. Letters to the Editor which are accepted for publication and errata and corrigenda will be published online-only and will not appear in print.

Any material which is published online-only will be published online on ScienceDirect as paginated and fully citable electronic article. It will be listed in the contents page of a printed issue and the full citation and abstract will be published in print. The citation and abstract of the paper will also still appear in the usual abstracting and indexing databases, including PubMed/Medline, Current Contents/Clinical Medicine and the Science Citation Index.

Authors will be asked to select which publication option they would prefer when submitting their paper to the Editorial Office.

Prior to Submission

Oral Oncology will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from <http://www.icmje.org>). Authors are advised to read these guidelines.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should

be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.
- **Word Count.** Please include a word count on your Title Page. Your word count should exclude the abstract, keywords, references, tables and figures.

Abstract

A concise and factual abstract of no more than 250 words is required. The abstract must be **structured for original research articles and articles reporting the results of clinical trials**. The abstract should be divided by subheadings as follows: Objectives, Materials and Methods, Results and Conclusion.

The abstract **should not be structured for review articles**. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for Original Research Articles, Review Articles, and Perspectives. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See: <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as Oral Cancer, or Head and Neck cancer.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-electronic artwork

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Figure Captions, Tables, Figures and Schemes

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in

this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/oral-oncology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference Style

Note: For the purposes of using software to format references, please use the AMA reference style.

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file

formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Word limits

Editorials submitted to the journal must be 1,500 words in length or less. Original research articles submitted to the journal must be 3,500 words in length or less.

Review articles submitted to the journal must be 5,000 words in length or less.

Perspectives submitted to the journal must be 2,000 words in length or less. Letters to the Editor must be 1,000 words in length or less. All word counts are excluding the abstract, keywords, references, tables and figures.

Presentation of Manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please

visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions: http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Provide the following data on the title page:

Title: Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations: Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author: Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address: If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>

