



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA -  
MESTRADO**

**Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma**

**Marina Rolo Pinheiro da Rosa**

**Belém - Pará**

**2013**

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA -  
MESTRADO**

**Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma**

**Marina Rolo Pinheiro da Rosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Mestrado) da Universidade Federal do Pará como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior.

**Belém - Pará**

**2013**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

---

#### **Da Rosa, Marina Rolo Pinheiro**

Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma. / Marina Rolo Pinheiro da Rosa; Orientador, Sérgio de Melo Alves Júnior – 2013.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Belém, 2013.

1. Ameloblastoma. 2. Metaloproteinases da matriz. 3. Fatores de crescimento. I. Título: Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma. II. Orientador: Alves Júnior, Sérgio de Melo. CDD 617.6.

---

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO**

---

**Candidato:** Marina Rolo Pinheiro da Rosa

**Título da dissertação:** Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma.

**Orientador:** Sérgio de Melo Alves Júnior

**A comissão julgadora de trabalhos de defesa de dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 29 de julho de 2013 na cidade de Belém, considerou o candidato:**

( ) Aprovado ( ) Reprovado

**Examinador: Nome:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Examinador: Nome:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Examinador: Nome:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

*“Melhor é o fim das coisas do que o princípio delas,  
e o paciente é melhor que o orgulhoso”*

*Salomão*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Senhor Deus** porque sempre esteve me guiando e orientando em todos os momentos, principalmente nos momentos difíceis e de fraqueza. Sempre me dando forças para continuar e por ter permitido essa benção na minha vida que foi o mestrado.

Aos meus pais **Inês e Elcimar**, pelo cuidado, amor e atenção que sempre dedicaram a mim. Por acreditarem no meu sonho e no meu potencial e pelas palavras de motivação e encorajamento em todos os momentos.

À minha irmã **Samara**, que sempre torceu pelo meu sucesso e também me apoiou em várias circunstâncias.

Ao **Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior**, pela confiança a mim depositada para execução desse trabalho e por ter aceitado o convite de ser meu orientador.

Ao **Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro**, pela oportunidade de trabalhar com você há tanto tempo, pelas palavras nos momentos difíceis e por confiar e acreditar no meu trabalho, mesmo sendo esse difícil. Pela paciência, por tirar minhas dúvidas e por me ensinar quando necessário.

A **Profª. Drª. Maria Sueli da Silva Kataoka**, a primeira pessoa que me concedeu a oportunidade de trabalho ao seu lado, primeiro como sua monitora na clínica, posteriormente me ensinando os primeiros passos do trabalho com cultivo de células em um laboratório, me orientando no trabalho de conclusão de curso e agora me auxiliando nessa tese de mestrado. Muito obrigada pelos seus ensinamentos e por todo seu carinho, atenção e paciência durante todos esses anos.

À amiga **Aline Semblano Dias Falcão**, pelos anos de companheirismo no laboratório e pelas trocas de experiências. Obrigada pelas orientações e treinamentos para execução dos experimentos laboratoriais.

À amiga **Jéssica de Almeida Lopes**, por toda ajuda e companheirismo durante esse período de mestrado. Por participar de vários momentos alegres desse trabalho, e por me encorajar nos momentos difíceis. Muito obrigada por vibrar comigo a cada conquista como se o trabalho fosse seu e pelas trocas de experiências.

Aos colegas de laboratório, **João, Lara e Raíssa**, por toda ajuda concedida a mim no laboratório e por todos os momentos que passamos juntos no laboratório.

Ao amigo **Rodolpho Lobão Cecim**, mesmo não estando todos os dias no laboratório comigo, foi um grande amigo e companheiro durante toda essa caminhada. Obrigada por todo apoio e palavras de ânimo.

Ao **Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia** pela oportunidade a mim oferecida, que ajudará no meu crescimento profissional. A todos os professores que fazem parte do programa e que puderam compartilhar seus conhecimentos em todas as aulas ministradas.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo financiamento desse projeto de pesquisa.

E a todos que de alguma maneira, possibilitaram e participaram da execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1.VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO .....</b>	<b>42</b>
<b>3. METODOLOGIA DETALHADA DO ARTIGO .....</b>	<b>72</b>
1.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	72
1.2 AMOSTRA DO ESTUDO .....	72
1.3 CULTIVO CELULAR .....	72
1.4 TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS AME-1 COM VETOR RETROVIRAL HPV E6/E7 .....	73
1.5 IMUNOFLOURESCÊNCIA .....	74
1.6 ENSAIO DE “FERIDA” EM MONOCAMADA .....	76
1.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM SISTEMA TRANSWELL .....	77
1.8 ENSAIO DE INVASÃO EM SISTEMA TRANSWELL.....	78
1.9 ZIMOGRÁFIA .....	80
1.10 RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA) .....	81
1.11 WESTERN BLOT .....	82
1.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	83
<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>



## RESUMO

O ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico que apresenta diversos padrões histopatológicos e caracteriza-se por sua invasividade local e recorrências frequentes. Apresenta variadas interações indutoras entre o epitélio odontogênico e o estroma tumoral e diante deste microambiente neoplásico, destaca-se a matriz extracelular (MEC), que funciona como reservatório para várias substâncias como, por exemplo, os fatores de crescimento. Dentre os vários tipos de fatores de crescimento destaca-se o fator de crescimento epidérmico (EGF). O aumento da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ativado por seu ligante, pode estimular a síntese de proteases como as metaloproteinases da matriz (MMPs), desempenhando um papel importante nos processos de crescimento, proliferação e invasividade tumoral. Tendo em vista a melhor compreensão de alguns mecanismos do comportamento biológico do ameloblastoma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do EGF na expressão, migração, invasão e secreção de proteases em uma linhagem de células imortalizadas derivadas de ameloblastoma humano (células AME-HPV). A imunofluorescência demonstrou que MMP-2, MMP-9, EGF e EGFR estão expressos *in vitro*. Os ensaios de “ferida”, migração e invasão demonstraram que o EGF estimula as atividades de migração e invasão celular. Por zimografia foi detectado que as células exibiram um aumento de secreção de MMPs quando tratadas com diferentes concentrações do EGF. O silenciamento do EGFR promoveu a diminuição da expressão de MMP-2 e MMP-9. Esses resultados sugerem uma interação entre as MMPs e o EGF, que possivelmente pode estar diretamente ou indiretamente influenciando na remodelação da MEC e conseqüentemente no comportamento invasivo e no processo de tumorigênese do ameloblastoma.

**Descritores:** ameloblastoma; metaloproteinases da matriz; fatores de crescimento.

## ABSTRACT

Ameloblastoma (AME) is an odontogenic tumor with several histopathological patterns and is characterized by its local invasiveness and frequent recurrences. It presents a variety of inducing interactions between the odontogenic epithelium and the tumor stroma and, in face of this neoplastic microenvironment, highlights the extracellular matrix (ECM), which functions as a reservoir for various substances, such as growth factors. Among these growth factors, the epidermal growth factor (EGF) draws the attention. An increased expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR), activated by its ligand, can stimulate the synthesis of proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs), playing an important role in the processes of growth, proliferation and tumor invasiveness. With a view to better understanding some mechanisms of the biological behavior of ameloblastoma, this study aimed to evaluate the effects of EGF in expression, migration, invasion and protease secretion in an immortalized cell line derived from human ameloblastoma (AME-HPV cells). Immunofluorescence showed that MMP-2, MMP-9, EGF and EGFR were expressed *in vitro*. The wound healing, migration and invasion assays demonstrated that EGF stimulates cell migration and invasion. It was detected by zymography that cells exhibit an increase in MMP secretion when treated with various concentrations of EGF. Silencing of EGFR induced a decreased in MMP-2 and MMP-9 expression. These results suggest an interaction between MMPs and EGF, which may possibly be directly or indirectly influencing in the ECM remodeling and subsequent invasive behavior and in ameloblastoma tumorigenesis.

**Keywords:** ameloblastoma; matrix metalloproteinases; growth factors.

## 2. VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGÊS

**Journal of Oral Pathology & Medicine**

**Editor: Erik Dabelsteen**

**Fator de Impacto: 2.055**

**Online ISSN: 1600-0714**

**Estudo in vitro da modulação das metaloproteínases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma**

**Modulação das MMPs mediada por EGF**

**Descritores:** ameloblastoma; matrix metalloproteinases; growth factors.

**Marina Rolo Pinheiro da Rosa**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Aline Semblano Dias Carreira**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Jéssica de Almeida Lopes**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Raíssa Mendonça**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Lara Carolina D'Araújo Pinto**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**João Rafael Habib Souza Aquime**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Maria Sueli da Silva Kataoka**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil.

**Sérgio de Melo Alves Júnior**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil. Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará-CESUPA, Belém, Pará, Brasil. Av. Governador José Malcher, 1963. Belém, PA, 66060-230, Brasil.

**João de Jesus Viana Pinheiro**

Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, PA, Brasil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brasil. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Av. Prof Lineu Prestes, 1524 Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brasil.

**Autor Correspondente:**

Sérgio de Melo Alves Júnior

**Endereço:**

Universidade Federal do Pará

Faculdade de Odontologia

Instituto de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

Avenida Augusto Corrêa, 01. Belém PA, 66075-110 Brasil

Tefone: 55-91-92065207

Fax: 55-91-32017563

E-mail: [sergiomalves@gmail.com](mailto:sergiomalves@gmail.com)

## RESUMO

O ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico que apresenta diversos padrões histopatológicos e caracteriza-se por sua invasividade local e recorrências frequentes. Apresenta variadas interações indutoras entre o epitélio odontogênico e o estroma tumoral e diante deste microambiente neoplásico, destaca-se a matriz extracelular (MEC), que funciona como reservatório para várias substâncias como, por exemplo, os fatores de crescimento. Dentre os vários tipos de fatores de crescimento destaca-se o fator de crescimento epidérmico (EGF). O aumento da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ativado por seu ligante, pode estimular a síntese de proteases como as metaloproteinases da matriz (MMPs), desempenhando um papel importante nos processos de crescimento, proliferação e invasividade tumoral. Tendo em vista a melhor compreensão de alguns mecanismos do comportamento biológico do ameloblastoma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do EGF na expressão, migração, invasão e secreção de proteases em uma linhagem de células imortalizadas derivadas de ameloblastoma humano (células AME-HPV). A imunofluorescência demonstrou que a MMP-2, MMP-9, EGF e EGFR estão expressos *in vitro*. Os ensaios de “ferida”, migração e invasão demonstraram que o EGF estimula as atividades de migração e invasão celular. Por zimografia foi detectado que as células exibiram um aumento de secreção de MMPs quando tratadas com diferentes concentrações do EGF. O silenciamento do EGFR promoveu a diminuição da expressão de MMP-2 e MMP-9. Esses resultados sugerem uma interação entre as MMPs e o EGF, que possivelmente pode estar diretamente ou indiretamente influenciando na remodelação da MEC e conseqüentemente no comportamento invasivo e no processo de tumorigênese do ameloblastoma.

## INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos compreendem um grupo complexo de lesões de diversos tipos histopatológicos e comportamentos clínicos, que demonstram variadas interações indutoras entre o epitélio e ectomesênquima odontogênico (1).

O ameloblastoma é um tumor odontogênico de origem ectodérmica, que pode surgir dos remanescentes da lâmina dentária, do epitélio reduzido do esmalte, de restos

epiteliais de Malassez ou da camada de células basais do epitélio de superfície e é caracterizado por proliferação do epitélio odontogênico sem o ectomesênquima (2,3,4).

É uma neoplasia benigna que apresenta crescimento lento. Embora seja caracterizado dessa maneira, o ameloblastoma é uma neoplasia localmente invasiva e com alta taxa de recorrência, mesmo depois de um procedimento cirúrgico radical (5-8).

Utilizando a classificação de tumores odontogênicos da OMS (2005), estudos têm evidenciado que o ameloblastoma é um dos tumores odontogênicos mais freqüentes, seguido pelo tumor odontogênico queratocístico e pelo odontoma (9,10).

A progressão de diversos tumores tem sido reconhecida como o produto de uma série de eventos que ocorrem entre diferentes tipos de células dentro do tumor e dos tecidos circundantes, principalmente o estroma (11). O estroma do tumor direta ou indiretamente influencia o crescimento e proliferação das células neoplásicas. A maioria das investigações em ameloblastoma tem como objetivo estudar as características do componente epitelial que constitui o parênquima do tumor, enquanto poucos estudos examinaram as funções do estroma (12,13,14).

Alguns estudos em carcinoma de células escamosas e câncer de mama, já demonstraram o papel importante do estroma na tumorigênese, invasão, metástase, progressão tumoral e nos mecanismos moleculares subjacentes (11,15-18). Contudo, poucos estudos investigam essa contribuição do estroma no desenvolvimento dos tumores odontogênicos (19).

No ambiente estromal do tumor podem existir células especializadas que exibem um fenótipo entre fibroblastos e células musculares lisas chamadas miofibroblastos. Contemporaneamente, os estudos mostraram que as possíveis correlações entre a presença de miofibroblastos e a expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) e fatores de crescimento podem influenciar a capacidade de invasão tumoral e proliferação (20,21,22).

Foi verificado que a remodelação da matriz extracelular (MEC) é iniciada por células tumorais, enquanto que as células estromais são responsáveis pela organização do processo (17). As células tumorais ativam o ambiente do estroma através da secreção de fatores de crescimento e proteases. Em seguida, inicia-se a secreção de componentes pró-específicos migratórios e invasivos da MEC, juntamente com os seus receptores respectivos, promovendo a redução da expressão de inibidores de protease. O desequilíbrio entre as proteases e seus inibidores leva à degradação dos componentes da MEC (11).

As moléculas da MEC são reguladas ou modificadas por MMPs, uma família de enzimas capazes de modular o destino da célula, promovendo a migração e a liberação de fatores de crescimento ligados à MEC e ativando vias de sinalização moleculares (23,24). As MMPs podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de tumores agressivos, visto que a invasividade de células neoplásicas, tem sido associada com a sobre-expressão de MMP (25).

Tanto as células tumorais como as do estroma do ameloblastoma expressam MMPs 1, 2 e 9. Estas enzimas podem degradar a matriz óssea e libertar fatores mitogênicos, o que aumentaria a proliferação do tumor. Um mecanismo interdependente, envolvendo a síntese e atividade de MMPs, que pode contribuir para a proliferação e invasividade local do tumor (26). Além disso, as células tumorais e do estroma desta lesão também expressam inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) e fatores de crescimento, sugerindo que estas moléculas podem atuar em conjunto para influenciar o comportamento biológico do tumor (27).

Sabe-se que a atividade proliferativa, assim como a capacidade de resposta celular a inúmeros sinais extracelulares, depende da ativação de receptores de fatores de crescimento e por isso, muitos estudos têm dedicado atenção a eles, buscando encontrar mecanismos de controle dos níveis desses receptores e dessa forma, da proliferação celular (28-31).

Dentre os vários tipos de fatores de crescimento destaca-se o fator de crescimento epidérmico (EGF) (31). O EFG apresenta afinidade pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), induzindo a produção de respostas mitogênicas (28,32).

Portanto, tendo em vista a importância de se elucidar alguns mecanismos do comportamento biológico do ameloblastoma o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da expressão, migração, invasão e secreção de proteases induzidas pelo fator de crescimento EGF em uma linhagem de células derivadas de ameloblastoma humano.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFGPA) (protocolo nº131/10).

### **Cultura de células**

Fragmentos de tecido cirúrgico foram obtidos a partir de um ameloblastoma localizado na mandíbula de uma paciente de 44 anos de idade. Resumidamente, a amostra do tumor foi dissecada sob estereoscópio (Nikon SMZ660 – Japan), e com auxílio de tesoura foi reduzida a pequenos fragmentos chamados de explantes. Esses explantes foram transferidos para frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup>, tratados previamente com poly-D-lisina (1mg/mL, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), contendo meio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco Invitrogen Co. CA, USA), suplementado com 20% de FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*, Gibco®), glutamina (2mM, Sigma®), solução de penicilina/estreptomicina (100µg/mL, Gibco®), bicarbonato de sódio (3mM, Sigma®), fungizona (2,5µg/mL, Gibco®) e glicose (33mM, Merck AS, RJ, Brasil) e mantidos em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células (AME-1) foram então subcultivadas no mesmo meio e utilizadas para os ensaios.

### **Imortalização da linhagem celular AME-1 utilizando transfecção com vetor retroviral HPV E6/E7**

A linhagem AM-12 (linhagem que contém o vetor HPV E6/E7) foi cultivada em placa de Petri, com meio DMEM-F12 (Gibco®) suplementado com 10% de FBS (Gibco®), e incubada a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> por 48h até atingir uma confluência de aproximadamente 40-50%. O meio contendo as partículas retrovirais foi recolhido e em seguida filtrado utilizando filtro de 22µm e gotejado sobre as células alvo (AME-1). Polibreno foi adicionado (3mg/mL) e as células alvo foram incubadas durante 8h. Para selecionar as células que foram transfectadas, 400µg/mL de G418 (Sigma®) foi adicionado ao meio durante por 1 semana. Após seleção com G418, as células transfectadas (AME-HPV) foram cultivadas em DMEM-F12 contendo 10% de SFB. Posteriormente para confirmação da imortalização celular foram realizados dois ensaios diferentes. Primeiramente foi realizado a imunofluorescência indireta contra o anticorpo HPV E6/E7 e posteriormente o western blot contra p-53, pois essa proteína tem afinidade pelo fragmento E6.



## **Imunofluorescência**

As células AME-HPV foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços por 48h. As células foram fixadas em 2% paraformaldeído por 10min em temperatura ambiente. Para as marcações com HPV E6/E7, fibronectina, vimentina,  $\alpha$ -actina de músculo liso, CK-14, CK 19, MMP-2 e MMP-9 as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 (Sigma®) a 0,5% durante 5min e o bloqueio foi realizado com 10% de soro de cabra em PBS/BSA a 1% por 30min. As amostras foram incubadas com anti-HPV E6/E7, monoclonal feito em camundongo (1:100, Abcam, Cambridge, USA), anti-fibronectina, policlonal feito em coelho (1:200, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA), anti-vimentina, monoclonal feito em camundongo (1:100, Dako®), anti- $\alpha$ -actina de músculo liso, monoclonal mouse (1:100, Dako®), anti-CK-14, monoclonal feito em camundongo (1:50, Millipore Inc, Bedford, MA, USA), anti-CK-19, monoclonal feito em camundongo (1:50, DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA); anti- TIMP-1, monoclonais feitos em camundongo (1:100, Dako®); anti- TIMP-2, monoclonais feitos em camundongo (1:100, Dako®); anti-MMP-2, monoclonal feito em camundongo (1:100, Millipore®), anti-MMP-9, policlonal feito em coelho (1:100 Millipore®) diluído em PBS/BSA a 1% contendo 10% de soro de cabra. O anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 568 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) revelou o anticorpo primário. As amostras foram bloqueadas com 10% de soro de cabra e depois incubadas com anti-EGFR, monoclonal feito em camundongo (1:100, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) e anti-EGF, policlonal feito em camundongo (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluídos em PBS/BSA a 1% contendo 10% de soro de cabra. O anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 568 (Invitrogen®) revelou o anticorpo primário. Hoechst 33258 (1:1000, Sigma®) foi utilizado para marcação nuclear. Os controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por PBS/BSA a 1%. A análise das amostras e as aquisições de imagens foram realizadas utilizando microscópio de fluorescência (Axio Scope A1, Zeiss, SP, Brazil), equipado com uma câmera fotográfica digital (AxioCam MRc, Zeiss®).

## **Ensaio de ferida em monocamada**

A migração das células AME-HPV foi investigada in vitro por meio de um ensaio de ferida em monocamada. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, na presença de meio DMEM-F12 com 10% de FBS, até alcançarem a confluência de

monocamada. Com auxílio de ponteira de micropipeta foi realizada uma descontinuidade nesta monocamada criando uma área livre de células (“ferida”). As monocamadas com as “feridas” foram lavadas com meio DMEM-F12 sem FBS para a remoção dos debris celulares e posteriormente incubadas com o polipeptídeo EGF (Sigma®) diluído em meio de cultivo sem FBS em diferentes concentrações (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL). O controle positivo foi realizado com incubação das células em meio contendo 10% de FBS e o controle negativo em meio sem SFB. O fechamento das “feridas” foi observado em 0, 12, 24, 48 e 72h. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada poço da placa para localizar os campos correspondentes às áreas livres de células, dessa forma permitiu a aquisição de imagens de uma mesma área em diferentes intervalos de tempo. As áreas livres de células nos grupos tratados e controles foram calculadas como porcentagem da área livre de células em 0h, arbitrariamente marcada como 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Ensaio de migração**

Para complementar os resultados obtidos com o ensaio de “ferida” em monocamada, a migração foi avaliada utilizando câmaras de quimiotaxia (Millipore®), com membrana de polietileno (PET, do inglês *Polyethylene Terephthalate*) contendo poros de 8µm de diâmetro. As células AME-HPV ( $25 \times 10^4$ ) foram semeadas em DMEM-F12 isento de FBS na câmara superior. A parte inferior da câmara foi preenchida com DMEM-F12 isento de FBS contendo o polipeptídeo EGF (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL). Poços da câmara inferior preenchidos com meio sem FBS ou contendo 0,5% de FBS serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. As células foram cultivadas nestas condições durante 24h em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. As células localizadas na face superior da membrana foram removidas com auxílio de um cotonete e as células localizadas na face inferior da membrana foram fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em metanol a 20%. Foram adquiridas imagens de sete campos para cada grupo experimental, utilizando câmera digital (Axiocam MRc, Zeiss®) que permitiu a contagem das células que migraram. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Ensaio de invasão**

O ensaio de invasão foi realizado em câmaras de quimiotaxia (Millipore®), com membrana de PET contendo poros de 8µm de diâmetro revestida com matrigel. As

células AME-HPV ( $3 \times 10^4$ ) foram semeadas em DMEM-F12 isento de FBS na câmara superior. A câmara inferior foi preenchida com DMEM-F12 isento de FBS contendo o polipeptídeo EGF (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL). Poços da câmara inferior preenchidos com meio sem FBS ou contendo 0,5% de FBS serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. As células foram cultivadas nestas condições durante 72h em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. As células localizadas na face superior da membrana foram removidas com auxílio de um cotonete e as células que invadiram localizadas na face inferior da membrana foram fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em metanol a 20%. A aquisição de imagens de sete campos para cada grupo experimental, utilizando câmera digital (Axiocam MRc, Zeiss®) permitiu a contagem das células que invadiram. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **Atividade de proteases das células tratadas com EGF**

As células AME-HPV foram cultivadas em placas de 6 poços cobertas com concentrações crescentes de EGF (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL) diluídas em meio DMEM-F12 sem FBS durante 24h. Esse meio de cultura foi removido e as células foram mantidas em meio DMEM-F12 sem FBS durante 24h. A presença de MMPs em meio condicionado foi avaliada pela técnica de zimografia. Os meios condicionados foram coletados, concentrados (Microcom 3000D, Millipore®), tratados com inibidores de proteases (Sigma®) e ressuspensos em tampão de amostra SDS-PAGE. A quantidade de proteínas foi estimada pela curva BSA. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de gelatina (Sigma®). Após a eletroforese, os géis foram lavados em solução Renaturing Buffer 1x por 1h e incubados por 16-20h a 37°C em solução tampão revelador de gel Zymogram Developing Buffer 1x (Biogen Idec Inc., Cambridge, MA, EUA) por 18h. Os géis foram então corados com Comassie Brilliant Blue a 0,1% (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA) e descorados em solução de metanol a 40% e ácido acético glacial a 10% em água destilada. Após essa etapa, as MMPs ativas foram identificadas no gel como bandas claras de lise em fundo azul.

#### **RNA de interferência (RNAi)**

As células AME-HPV foram transfectadas com RNAi para EGFR (SC-29301, Santa Cruz®) seguindo as informações do fabricante. Um dia antes da transfecção,

células AME-HPV foram cultivadas em DMEM-F12, sem solução antibiótica e antimicótica, contendo 10% de FSB. As células foram incubadas com um complexo formado por RNAi (20nM, 30nM e 40nM), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Gibco®) e meio de transfecção (Opti-MEM 1, Gibco®), durante 24h a 37°C. RNAi com sequência embaralhada (Santa Cruz®) foi utilizado como controle. A eficiência da transfecção foi confirmada por Western Blot.

### **Western Blot**

As células foram lisadas em tampão RIPA (Sigma®), foi adicionado inibidor de protease (Sigma®) e as amostras foram centrifugadas (5000rpm por 15min a 4°C). Os sobrenadantes foram coletados, quantificados (método BCA – Thermo Fisher Scientific) e ressuspensos em tampão de amostra Laemmil contendo 62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8), SDS a 2%, glicerol a 25%, mercaptoetanol a 5% e azul de bromofenol a 0,01%. Quantidades iguais de lisados celulares (25µg) foram submetidas à eletroforese em géis de gradiente de 10% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – Amersham Biosciences, USA) e foi realizado o bloqueio com leite desnatado a 5% por 30min a 4°C. Após três lavagens em solução salina tamponada contendo Tween 20 (Amersham Biosciences, USA) a 0,05% membrana foi incubada com o anticorpo primário. Os anticorpos primários foram detectados pelo anticorpo secundário (1:10000) e revelados utilizando um substrato quimioluminescente (ECL – Amersham Biosciences®). Os anticorpos primários utilizados incluem  $\beta$ -actina (1:2000, Sigma®), p-53 (1:500, Leica®), EGFR (1:1000, Spring Bioscience®), MMP-2 (1:1000, Millipore®) e MMP-9 (1:1000, Millipore®).

### **Análise estatística**

O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre três ou mais grupos com amostras independentes, variável contínua e distribuição anormal. As diferenças entre três ou mais grupos foi estimada através de análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Imortalização das células AME-1**

As células AME-1 foram imortalizadas com a transfecção de vetores retrovirais HPV E6/E7. Células AME-HPV expressaram a proteína E6/E7 (Figura 1A), a qual foi localizada como pontos ao redor e no próprio do núcleo. Amostras da linhagem celular AME-1 foram utilizadas como controle e não mostraram marcação para esta proteína (Figura 1B). Além disso, western blot confirmou a expressão de p-53 nas células AME-HPV, mas não nas células AME-1 (Figura 1C).

### **Imunofluorescência na linhagem AME-HPV**

As células AME-HPV expressaram proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto como a fibronectina, vimentina,  $\alpha$ -actina (Figura 2A-C) e citoqueratinas 14 e 19 com marcações intracelulares puntiformes (Figura 3D-E). Ainda foi possível verificar a expressão de TIMP-1, TIMP-2 (Figura 4F-G), ambos com marcações intracelular puntiformes assim como as MMP-2 e MMP-9 (Figura 4H-I). EGF e EGFR (Figura 5J-K) foram observados como pontos ao longo da membrana celular. Além disso, células AME-HPV exibiram EGF e EGFR colocalizados como pontos na superfície da célula (Figura 5L). Os controles negativos não apresentaram marcação (dados não mostrados).

### **EGF aumenta a migração das células AME-HPV**

O fator de crescimento epidérmico, EGF, aumentou a migração das células AME-HPV. O ensaio de ferida em monocamada (Figura 6A) mostrou que as células AME-HPV tratadas com o EGF (50ng/mL e 100ng/mL) aumentaram sua atividade migratória em comparação com células cultivadas em meio isento de soro.

Após 24h, a área livre de células foi reduzida para 61% nas células AME-HPV tratadas com 50ng/mL de EGF, enquanto que a redução da área, nas células tratadas com meio isento de soro foi de 80% ( $p < 0,05$ ). Após 48h, apenas 39% da área da ferida permaneceu livre de células no grupo de EGF em comparação com o controle negativo, com 65% da área livre de células ( $p < 0,0001$ ). Após 72h, apenas 26% da área da ferida permaneceu livre de células em comparação com o controle negativo, que apresentou 53% da área livre de células ( $p < 0,001$ ).

Além disso, a área livre de células diminuiu para 39% ( $p < 0,0001$ ) nas células AME-HPV tratadas com 100ng/mL de EGF por 24h. Após 48h de tratamento, apenas 20% da área da ferida permaneceu livre de células ( $p < 0,0001$ ) e depois de 72h somente

10% da área da ferida permaneceu livre de células em comparação com o controle negativo, que apresentou 54% da área livre de células ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 10 e 25ng/mL.

Os ensaios de migração foram realizados em câmaras de quimiotaxia por 24h e confirmaram os resultados obtidos nos ensaios de ferida em monocamada. Concentrações crescentes de EGF induziram a migração das células AME-HPV comparado com o controle (DMEM sem FBS) (Figura 6B).

### **EGF aumenta a invasão das células AME-HPV e a secreção de MMPs**

O fator de crescimento EGF também aumentou a atividade de invasão das células AME-HPV e a secreção de MMPs. Os ensaios de invasão em câmaras de quimiotaxia revestida com matrigel mostraram que o EGF (100ng/mL) aumentou significativamente a invasão das células AME-HPV (Figura 7A).

O processo de invasão de células tumorais envolve a atividade das MMPs. Assim, para avaliar a presença e atividade das MMPs, meios condicionados das células AME-HPV cultivadas em diferentes concentrações de EGF foram submetidos à técnica de zimografia. Células AME-HPV tratadas com EGF mostrou bandas gelatinolítica correspondentes aos pesos moleculares das MMPs -2 e -9.

Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 50ng/mL e o meio condicionado sem a oferta de EGF nas formas ativas de MMP-2 e MMP-9 ( $p < 0,05$ ) (Figura 7B). Para determinar se estas bandas eram MMPs, zimogramas de meio condicionado a partir de células tratadas com EGF foram incubadas na presença de um quelante de cálcio, o EDTA. O tratamento resultou em perda da atividade das gelatinases demonstrando que as bandas eram de MMPs (não ilustrado). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Bloqueio do EGFR diminuiu a secreção de MMPs nas células AME-HPV**

RNA de interferência (siRNA) foi utilizado para bloquear a expressão de EGFR e compreender melhor o seu papel na linhagem de células AME-HPV. O bloqueio do EGFR diminuiu a secreção de MMPs nas células AME-HPV. A eficiência do silenciamento do EGFR foi confirmada por western blot. Células tratadas com diferentes concentrações de RNAi exibiram uma diminuição na expressão de EGFR comparado-se com as células transfectadas com o grupo controle (RNAi "scrambled"). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas.

Uma vez que, não houve diferença no silenciamento do gene do EGFR nas concentrações de 20, 30 e 40nM utilizou-se a concentração de 30nM para o RNAi. Adicionalmente, bandas de aproximadamente 150kDa foram observadas, que provavelmente correspondem ao EGFRvIII, um mutante de EGFR do tipo que tem a sua expressão aumentada em tumores malignos. Além disso, diminuição da expressão de MMPs foi observada no grupo tratado com 30nM de siRNA para EGFR, como se mostrou por uma redução da expressão de MMP-9 inativa e ativa e MMP-2 inativa (Figura 8).

## **DISCUSSÃO**

O AME entre os tumores odontogênicos benignos é o mais comum com altas taxas de recorrências e invasivo. Pouco se sabe sobre a expressão de fatores de crescimento em tumores odontogênicos. Com o intuito de compreender melhor o comportamento biológico do AME, utilizou-se uma linhagem de células derivadas desse tumor (9,10).

A atividade proliferativa, assim como a capacidade de resposta celular a inúmeros sinais extracelulares, depende da ativação de receptores de fatores de crescimento e estes por sua vez têm um importante papel na progressão tumoral (28-31).

Entre os vários fatores de crescimento, o EGF é um dos mais importantes (31). Esse fator de crescimento apresenta afinidade de ligação pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), induzindo a produção de respostas mitogênicas (28,31).

O EGF é presente em órgãos humanos e possui papéis fundamentais em diferentes processos, como: embriogênese, desenvolvimento, expressão de proto-oncogenes, angiogênese, atividade imunossupressora, diferenciação e proliferação, tanto de células normais quanto células neoplásicas. Algumas evidências sugerem que o sistema regulatório celular estimulado por EGF pode desenvolver um importante papel na carcinogênese (33-37). O EGF liberado após degradação da MEC pode induzir proliferação celular através de uma via de sinalização regulada por sinal extracelular (ERK) (38,39).

Elevados níveis de EGFR têm sido identificados como um componente comum de numerosos tipos de neoplasias (40). Nesse caso, com uma maior expressão, haverá uma intensa geração de sinais e ativação de uma cascata de fosforilação de proteínas,

resultando em células com crescimento mais agressivo e com características de invasividade (41). O aumento da expressão de EGFR é, provavelmente, um forte fator prognóstico em muitos tumores, e a inibição dessas ações celulares podem produzir substancial benefício terapêutico (40).

Para que fosse possível realizar os ensaios e verificar a inter-relação entre esses fatores de crescimento e as MMPs em uma linhagem de células derivadas desse tumor, AME-1, foi necessário realizar um procedimento conhecido como imortalização celular, uma vez que esse tumor apresenta um crescimento lento e entra em senescência muito rápido em cultivos celulares.

Para evitar esse processo de senescência, as células AME-1 foram transfectadas com o retrovírus HPV E6/E7. Uma transfecção na qual o sobrenadante contendo essas partículas retrovirais são introduzidas nas células alvo, assim o DNA viral acessa o genoma e começa a expressão estável dos genes E6 e E7, que por sua vez ativam a telomerase, responsável pela proliferação celular e inibem o processo de apoptose (12,42,43).

A fim de provar que as células de AME-1 foram transfectadas com o HPV E6/E7, foram utilizados dois métodos diferentes. Utilizando a imunofluorescência foi possível observar a expressão do fragmento E7 na linhagem celular AME-HPV e o western blot revelou a expressão da proteína p-53 nas células imortalizadas, enquanto que as células não transfectadas a expressão estava ausente. Utilizou-se a proteína p-53, pois esta possui afinidade com os fragmentos E6/E7 de células transfectadas com esse tipo de vetor retroviral.

Sabe-se que o ameloblastoma tem origem no epitélio odontogênico, porém a literatura já evidencia que as células oriundas do estroma têm uma ampla interação com o parênquima, o que deixa clara a importância de se estudar as células presente nesse ambiente (44-47). Essas células foram caracterizadas pela expressão de proteínas, que identificaram sua origem epitelial e mesenquimal.

A expressão das citoqueratinas 14 e 19, proteínas presentes no citoesqueleto de células epiteliais, foi analisada por imunofluorescência indireta, sugerindo a presença de células epiteliais odontogênicas (48-51). O padrão de marcação se revelou granular, disperso por todo o citoplasma.

A expressão de fibronectina, proteínas da MEC, de vimentina e  $\alpha$ -actina de músculo liso, proteínas do citoesqueleto foram analisadas por imunofluorescência indireta. Houve marcante expressão dessas três proteínas nos cultivos celulares. A



fibronectina apresentou marcação com padrão de rede filamentar difusa; a vimentina apresentou marcação fibrilar por todo o citoplasma, estendendo-se do núcleo até a membrana celular, enquanto que a  $\alpha$ -actina de músculo liso apresentou uma marcação mais filamentar por todo o citoplasma da célula. Resultados semelhantes quanto ao padrão de imunofluorescência das células estromais de ameloblastoma não foram encontrados na literatura, no entanto a coloração positiva para vimentina foi observada em células do estroma provenientes de outros tumores, como em carcinomas humanos do esôfago, do pulmão e pâncreas. A expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso denota a presença de miofibroblastos. Alguns trabalhos têm mostrado a presença de células miofibroblástica em tecidos normais e neoplasias, tanto benignas como malignas, além de possíveis correlações entre a presença de miofibroblastos e a expressão das MMPs, TIMPs e fatores de crescimento os quais têm influenciando nas interações epitélio-mesenquimal, na capacidade de invasão tumoral e proliferação celular, além de funcionar como marcador de prognóstico (21,53-55).

Quando da utilização de imunofluorescência foi possível observar a expressão de EGF, EGFR *in vitro*. Estudos têm demonstrado a presença do EGFR, principalmente em tecidos com alta atividade proliferativa (56,57). Siqueira et al. (27) em seus estudos com ameloblastoma também observaram imunorreatividade ao EGF e ao EGFR.

Para que haja a invasão das células neoplásicas faz-se necessário que haja uma migração dessas células. Nessa pesquisa utilizaram-se dois métodos para visualizar essa migração celular, ensaios de “ferida” e de migração em câmaras bipartites, utilizando concentrações diferentes de EGF. Observou-se que houve um aumento na migração das células AME-HPV. Esses resultados corroboram outros estudos onde foi possível verificar o aumento desse fator de crescimento em outros tipos celulares tais como células de carcinoma da mama, carcinoma de células escamosas orais e células epiteliais da córnea (57,58).

Para que haja a progressão tumoral é necessário que ocorra a degradação da MEC (59). Essa degradação se dá pela atividade de enzimas conhecidas como MMPs. As MMPs fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de zinco. Existem inúmeras MMPs, porém as MMP-2 e -9 possuem um importante papel na degradação da MEC durante o processo de invasão tumoral (60-63). Neste estudo, utilizando ensaios de invasão, observamos que as células AME-HPV foram capazes de lisar a membrana basal reconstituída, quando estimuladas por diferentes concentrações de EGF.

Alguns estudos têm evidenciado que os fatores de crescimento regulam as MMPs. Trabalhos relatam que o EGF estimula a expressão de MMP-9 e, além disso, a ativação do EGFR estimulou a expressão de MMP-9 (59,64).

A interação entre o EGF com a MMP-2 e MMP-9 no ameloblastoma ainda é incerta, mas, no presente estudo, as células de AME-HPV secretaram metaloproteínases quando foram expostas a diferentes concentrações do fator de crescimento, como mostra o ensaio de zimografia.

Para compreender melhor a interação entre as MMPs e o EGF foi realizado o bloqueio do EGFR por RNAi. Como resultado observou-se a diminuição da expressão de MMP-2 e 9. A diminuição da expressão de MMP-9 também foi observada por Kang et al. (65) utilizando RNAi para o EGFR. Elevados níveis de EGFR têm sido identificados como um componente comum de numerosos tipos de neoplasias (40). Nesse caso, com uma maior expressão, haverá uma intensa geração de sinais e ativação de uma cascata de fosforilação de proteínas, resultando em células com crescimento mais agressivo e com características de invasividade (41). O aumento da expressão de EGFR é, provavelmente, um forte fator prognóstico em muitos tumores, e a inibição dessas ações celulares podem produzir substancial benefício terapêutico (40,66).

Com o bloqueio do EGFR nas células AME-HPV ainda foi possível visualizar a diminuição da expressão de uma outra proteína com um peso molecular correspondente ao EGFRvIII. Estudos recentes descobriram que o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço expressa uma mutação do EGFR, o EGFRvIII (67,68). O EGFRvIII é uma proteína de 150kDa constituída de uma deleção do gene EGFR que é específico de cânceres (69). Dados recentes sugerem que a expressão do EGFRvIII aumenta a capacidade das células malignas de migrarem e invadirem tecidos normais, que são eventos importantes na metástase tumoral (70,71).

Com base na morfologia e na análise da expressão de proteínas observadas nessa pesquisa, constatou-se que tanto as células do estroma quanto as do parênquima estão presentes na linhagem celular de AME-HPV estabelecida em nosso laboratório e que as mesmas expressaram as MMPs -2 e -9, assim como o EGF e o EGFR. Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam que o EGF induz a atividade de migração, invasão e secreção de proteases nas células de ameloblastoma e que o bloqueio da via de sinalização do EGFR diminuiu a expressão de MMPs nessas mesmas células, sugerindo que a inter-relação entre as MMPs, EGF e EGFR é um importante papel no desenvolvimento da tumorigênese dessa neoplasia.

**AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa foi realizada na Universidade Federal do Pará (Belém, Pará, Brasil), e no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, São Paulo, Brasil). Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa 4815537/2010-4).

**CONFLITOS DE INTERESSE**

Nada a declarar.

**REFERÊNCIAS**

1. Neville, BW et al. Patologia oral e maxilofacial. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009, 972p.
2. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer*. 1992 Dec 15;70(12):2988-94.
3. Hughes CA, Wilson WR, Olding M. Giant ameloblastoma: report of an extreme case and a description of its treatment. *Ear Nose Throat J*. 1999 Aug;78(8):568, 570-2, 574.
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours (WHO Classification of Tumours). Lyon: IARC Press, 2005.
5. Jones RH. Ameloblastoma revisited. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 1996 Apr;13:174-80.
6. Fernandes AM, Duarte EC, Pimenta FJ, Souza LN, Santos VR, Mesquita RA, de Aguiar MC. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. *J Oral Pathol Med*. 2005 Nov;34(10):583-7.
7. Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar;64(3):484-94.
8. Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol*. 2007 Dec;30(6):645-8.
9. Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):474-81.
10. Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM. Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. *Pathol Res Pract*. 2012 Apr 15;208(4):225-30.
11. Mueller, MM, Fusenig, NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):839-49.
12. Harada H, Mitsuyasu T, Nakamura N, Higuchi Y, Toyoshima K, Taniguchi A, Yasumoto S. Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1. *J Oral Pathol Med*. 1998 May;27(5):207-12.
13. Tao Q, Huang H. Establishment of immortalized ameloblastoma cell line TAM-1. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2002 May;37(3):167-9.

14. Tao Q, Lv B, Qiao B, Zheng CQ, Chen ZF. Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):239-44.
15. Liotta, L. A. & Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature.* 2001 May;411(6835):375-9.
16. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJ, Cukierman E. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol.* 2005 Aug;167(2):475-88.
17. Beacham B, Hill C, McDermott F, O'Brien M, Turner J. Therapy with women with metastatic breast cancer. *Australas Psychiatry.* 2005 Mar;13(1):50-3.
18. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392-401.
19. Ito Y, Abiko Y, Tanaka Y, Rahemtulla F, Kaku T. Immunohistochemical localization of large chondroitin sulfate proteoglycan in odontogenic tumor. *Med Electron Microsc.* 2002 Sep;35(3):173-7.
20. Declerck, YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer.* 2000 Jun;36(10):1258-68.
21. Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res.* 2009 Jun;15(2):231-40.
22. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Feb;21(1):21-6.
23. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):227-33.
24. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221-33.
25. Pereira AL, Veras SS, Silveira EJ, Seabra FR, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005 Jan-Feb;71(1):81-6.
26. Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology.* 2004 Jul;45(1):65-72.

27. Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology*. 2010 Jul;57(1):128-37.
28. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S16-22.
29. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*. 2002;7 Suppl 4:2-8.
30. Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer*. 2003 Jul;39(10):1348-54.
31. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):21-6.
32. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):31-53.
33. Stoscheck CM, King LE Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res*. 1986 Mar;46(3):1030-7.
34. Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 1992 Aug;21(7):314-7.
35. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):143-8.
36. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):2-13.
37. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):99-110.
38. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jun;31(6):637-43.
39. Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):30-5.
40. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S9-15.
41. Ethier SP. Signal transduction pathways: the molecular basis for targeted therapies. *Semin Radiat Oncol*. 2002 Jul;12(3 Suppl 2):3-10.

42. Demers GW, Halbert CL, Galloway DA. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology*. 1994 Jan;198(1):169-74.
43. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):324-34.
44. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):133-44.
45. Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):162-76.
46. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Jan;6(1):209-17.
47. Campbell I, Qiu W, Haviv I. Genetic changes in tumour microenvironments. *J Pathol*. 2011 Mar;223(4):450-8.
48. Ong'uti MN, Howells GL, Williams DM. An immunohistochemical study of keratin expression in ameloblastoma from a Kenyan population. *Oral Dis*. 1999 Apr;5(2):111-6.
49. Fukumashi K, Enokiya Y, Inoue T. Cytokeratins expression of constituting cells in ameloblastoma. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2002 Feb;43(1):13-21.
50. Crivelini MM, de Araújo VC, de Sousa SO, de Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis*. 2003 Jan;9(1):1-6.
51. Pal SK, Sakamoto K, Aragaki T, Akashi T, Yamaguchi A. The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Apr;115(4):523-31.
52. Kopantzev EP, Vayshlya NA, Kopantseva MR, Egorov VI, Pikunov M, Zinovyeva MV, et al. Cellular and molecular phenotypes of proliferating stromal cells from human carcinomas. *Br J Cancer*. 2010 May;102(10):1533-40.
53. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4443-52.
54. Kuroda N, Shimasaki N, Miyazaki E, Hamauzu T, Toi M, Hiroi M, Shuin T, Enzan H. The distribution of myofibroblasts and CD34-positive stromal cells in normal renal pelvis and ureter and their cancers. *Histol Histopathol*. 2006 Dec;21(12):1303-7.

55. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006 Aug;5(15):1597-601.
56. Hopkins CR. Internalization of polypeptide growth factor receptors and the regulation of transcription. *Biochem Pharmacol*. 1994 Jan 13;47(1):151-4.
57. Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*. 2001 Jun;21(12):4016-31.
58. Wang L, Deng SX, Lu L. Role of CTCF in EGF-induced migration of immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Feb 23;53(2):946-51.
59. Dilly M, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C. Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells. *Mol Reprod Dev*. 2010 Jul;77(7):622-9.
60. Soua AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002;10(1):1-6.
61. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2003 Feb;32(2):114-20.
62. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Oct;16(5):558-64.
63. Naka T, Kuester D, Boltze C, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A. Expression of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2; cathepsin B; urokinase plasminogen activator; and plasminogen activator inhibitor, type I in skull base chordoma. *Hum Pathol*. 2008 Feb;39(2):217-23.
64. Rothhut B, Ghoneim C, Antonicelli F, Soula-Rothhut M. Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. *Biochimie*. 2007 May;89(5):613-24.
65. Kang CS, Pu PY, Li YH, Zhang ZY, Qiu MZ, Huang Q, et al. An in vitro study on the suppressive effect of glioma cell growth induced by plasmid-based small interference RNA (siRNA) targeting human epidermal growth factor receptor. *J Neurooncol* 74(3):267-73, 2005.



66. Chen S, Liu X, Gong W, Yang H, Luo D, Zuo X, Li W, Wu P, Liu L, Xu Q, Ji A. Combination therapy with VEGFR2 and EGFR siRNA enhances the antitumor effect of cisplatin in non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep.* 2013 Jan;29(1):260-8.
67. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12(17):5064-73, 2006.
68. Keller J, Shroyer KR, Batajoo SK, Zhao HL, Dong LM, Hayman MJ, et al. Combination of phosphorylated and truncated EGFR correlates with higher tumor and nodal stage in head and neck cancer. *Cancer Invest* 28(10):1054-62, 2010.
69. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53(15):3579-84, 1993.
70. Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29(37):5135-45, 2010.
71. Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD, Schroeder MA, Sarkaria JN, White FM. Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Dec;11(12):1724-40.

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Por imunofluorescência verificou-se que as células de ameloblastoma transfectadas (AME-HPV) expressaram o gene HPV E6/E7 de forma puntiforme ao redor e no próprio núcleo (A), enquanto as células não transfectadas (AME-1) não expressaram esse gene (B). Western Blot confirmou a expressão do p-53 nas células AME-HPV, mas não nas células AME-1 (C).

**Figura 2. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto. Anti-fibronectina (A), anti-vimentina (B), anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (C). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.

**Figura 3. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra proteínas do citoesqueleto. Anti-citoqueratina 14 (D) e Anti-citoqueratina 19 (E). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.

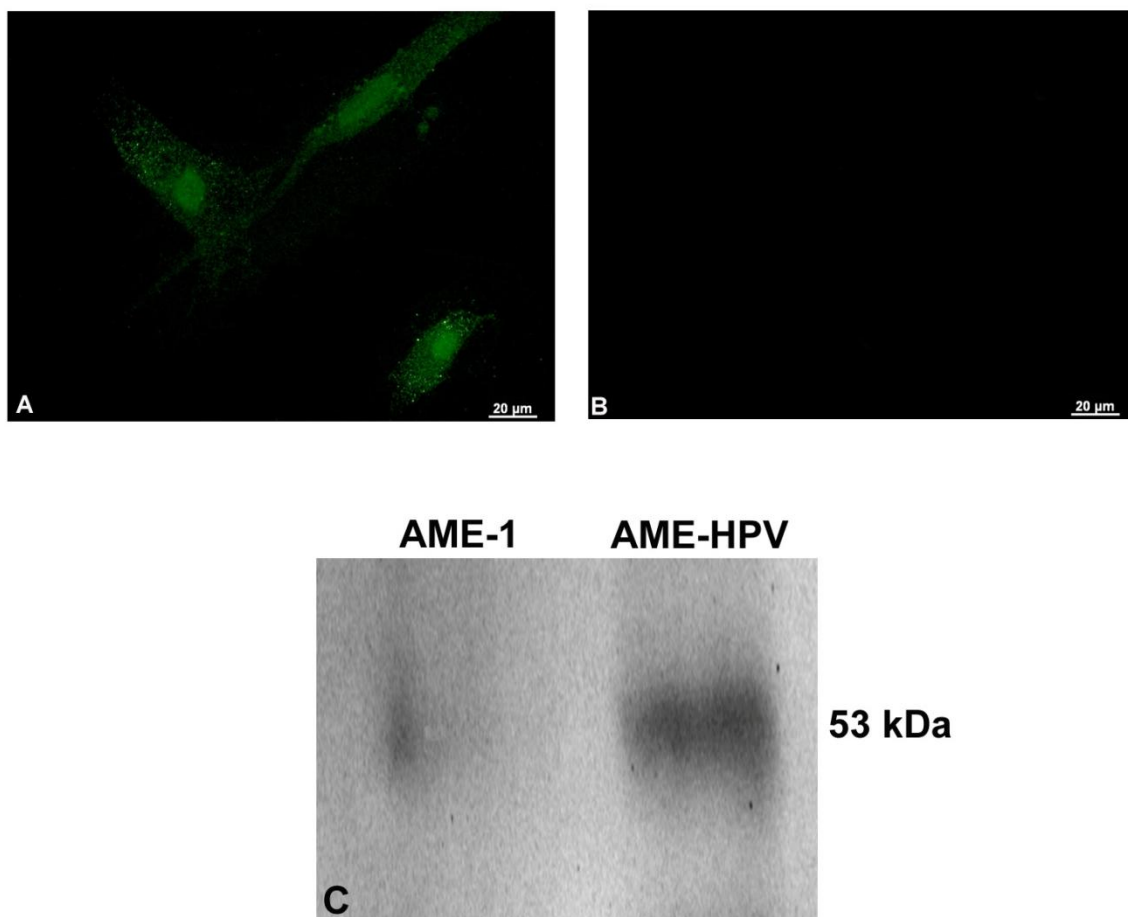
**Figura 4. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra inibidores teciduais de metaloproteínas (TIMPs) e metaloproteínas da matriz (MMPs). Anti-TIMP-1 (F), anti-TIMP-2 (G), anti-MMP-2 (H) e anti-MMP-9 (I). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.

**Figura 5. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra EGF (J), EGFR (K) sobreposição de EGF e EGFR mostrando a colocalização das proteínas (L). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.

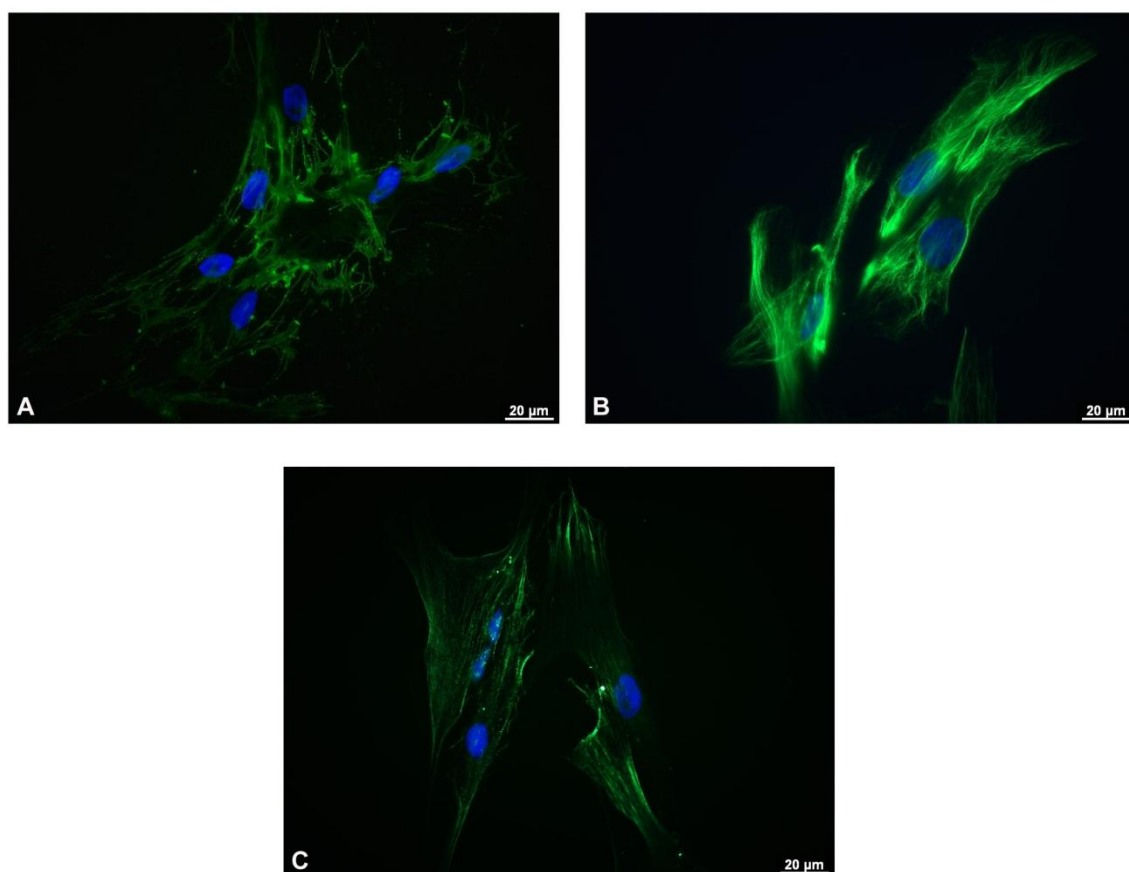
**Figura 6. EGF induz a migração das células AME-HPV.** Nos ensaios de ferida, células AME-HPV tratadas com EGF (50ng/mL; 100ng/mL) mostraram um aumento da atividade migratória em comparação com células cultivadas em meio isento de soro (A e B, micrografias). Linhas definem área da ferida inicial. Células crescendo para além das linhas são consideradas como o fechamento da ferida. A medição da área livre de células demonstrou que o EGF estimulou a taxa de migração das células AME-HPV (A, gráfico). A migração foi também avaliada usando câmaras de quimiotaxia (B, micrografias). A contagem das células revelou que as concentrações crescentes de EGF induziram a migração das células AME-HPV em comparação com o controle negativo (DMEM isento de soro - B, gráfico).

**Figura 7. EGF estimula a invasão e atividade de protease nas células AME-HPV.** Os ensaios de invasão foram realizados em câmaras de quimiotaxia revestidas com matrigel (A, micrografias). A contagem das células demonstrou que a taxa de invasão das células AME-HPV tratadas com EGF 100ng/mL é significativamente aumentada em comparação com o controle 0% de FBS (A, gráfico). A zimografia mostra bandas gelatinolítica correspondentes a MMP-2 e MMP-9 (B). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Os asteriscos em A e B indicam dados significativos estatisticamente em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).

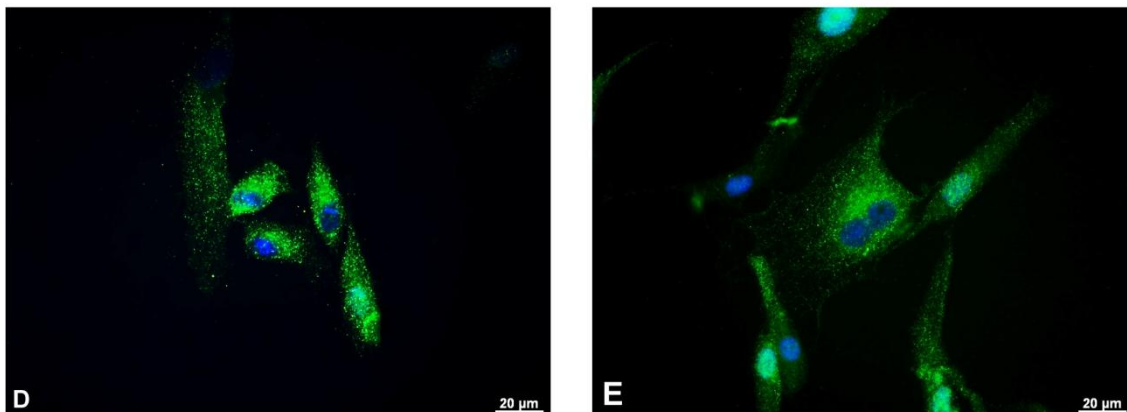
**Figura 8. Bloqueio do EGFR promove a redução da expressão de MMPs.** A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi diminuída nas amostras que tiveram o EGFR silenciado por siRNA (30 nM). A eficiência de transfecção do siRNA para o EGFR foi confirmada por Western blot, que mostra uma diminuição na expressão de EGFR (170 kDa). Observou-se também uma redução na expressão de uma proteína de 150KDa, que provavelmente corresponde a mutação do EGFR, EGFRvIII.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de carregamento.



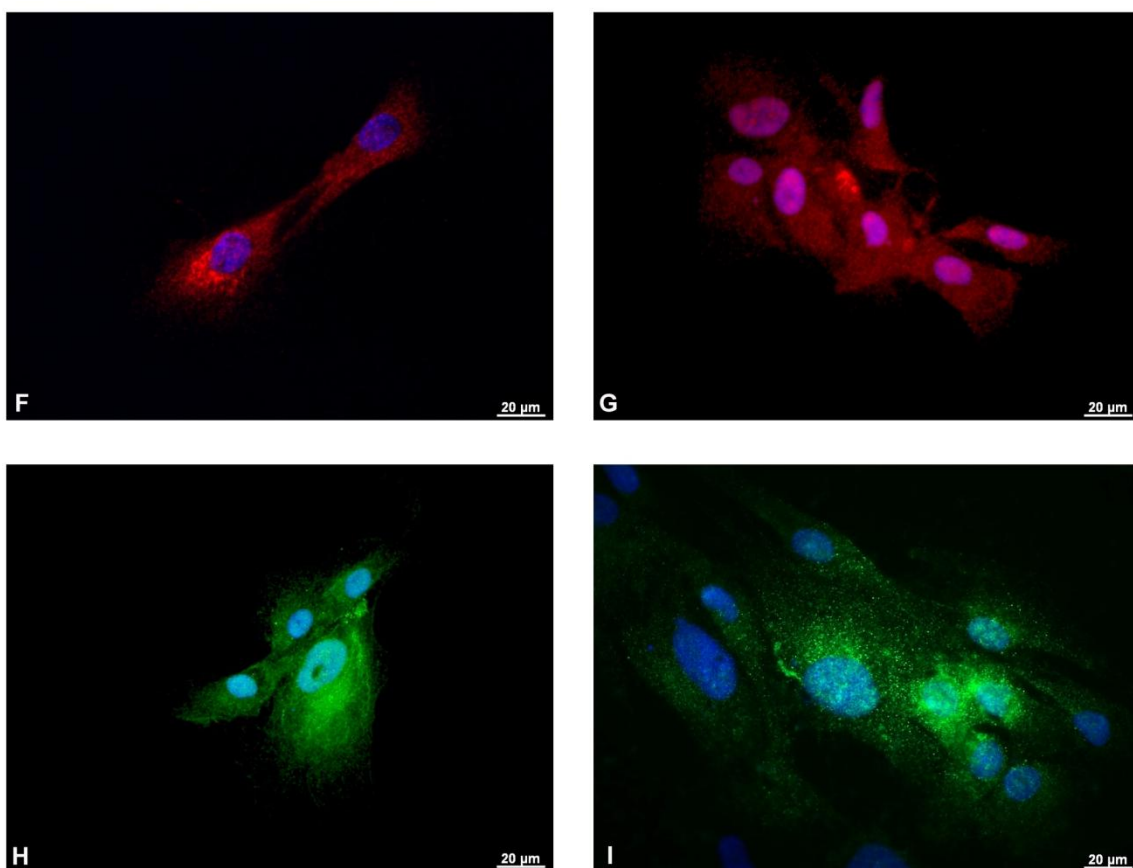
**Figura 1. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Por imunofluorescência verificou-se que as células de ameloblastoma transfectadas (AME-HPV) expressaram o gene HPV E6/E7 de forma puntiforme ao redor e no próprio núcleo (A), enquanto as células não transfectadas (AME-1) não expressaram esse gene (B). Western Blot confirmou a expressão do p-53 nas células AME-HPV, mas não nas células AME-1 (C).



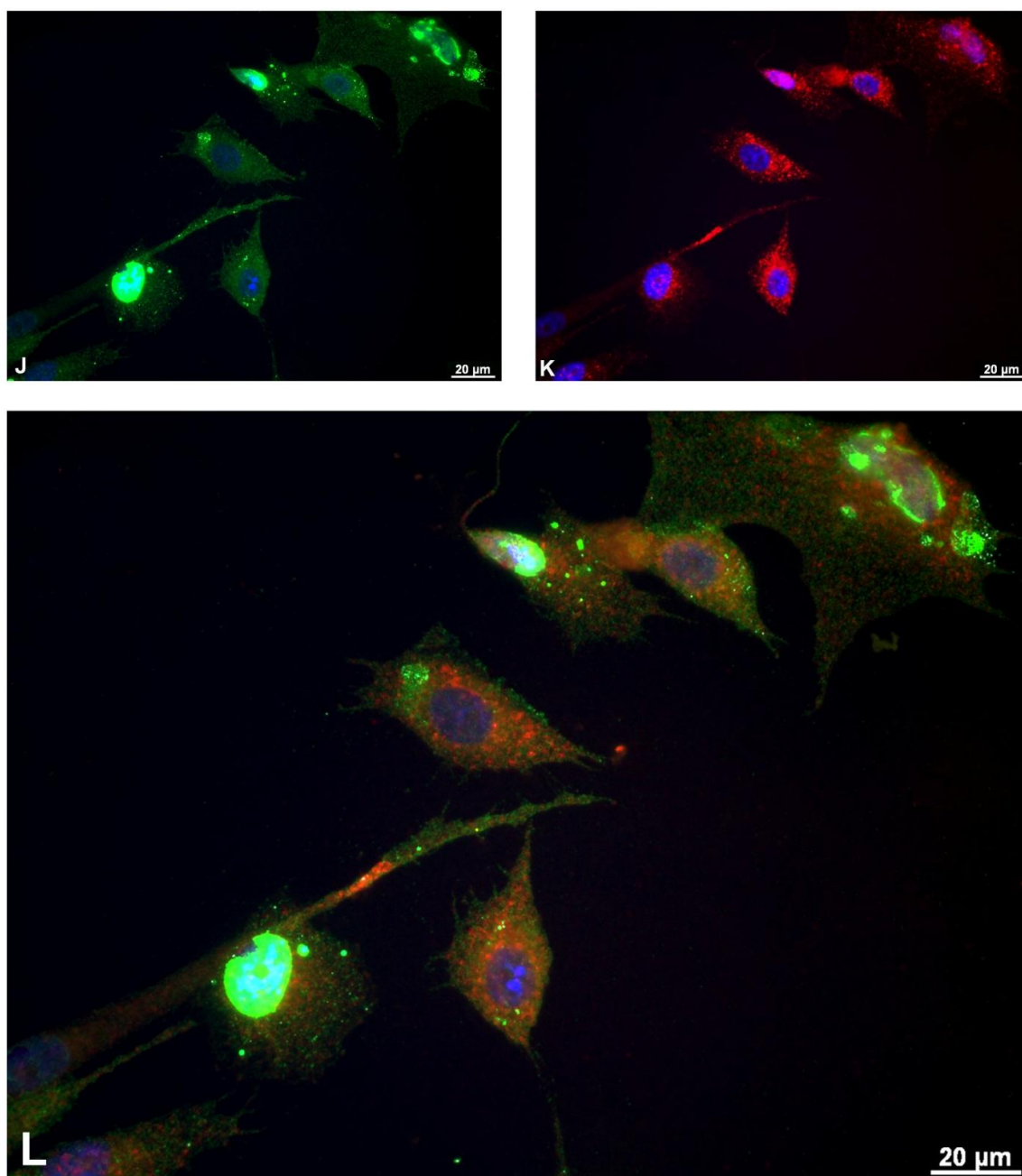
**Figura 2. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto. Anti-fibronectina (A), anti-vimentina (B), anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (C). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.



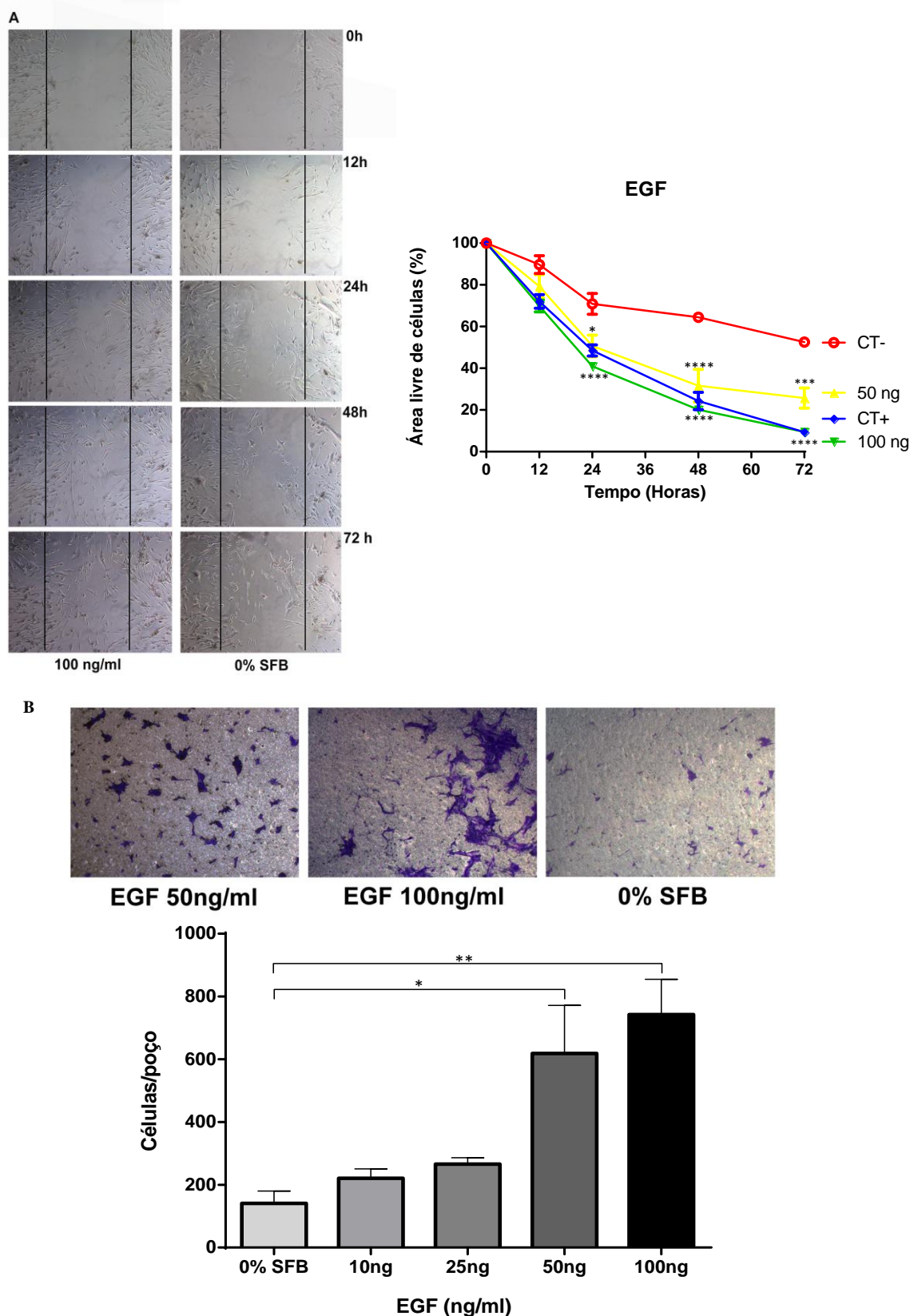
**Figura 3. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra proteínas do citoesqueleto. Anti-citoqueratina 14 (D) e Anti-citoqueratina 19 (E). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.



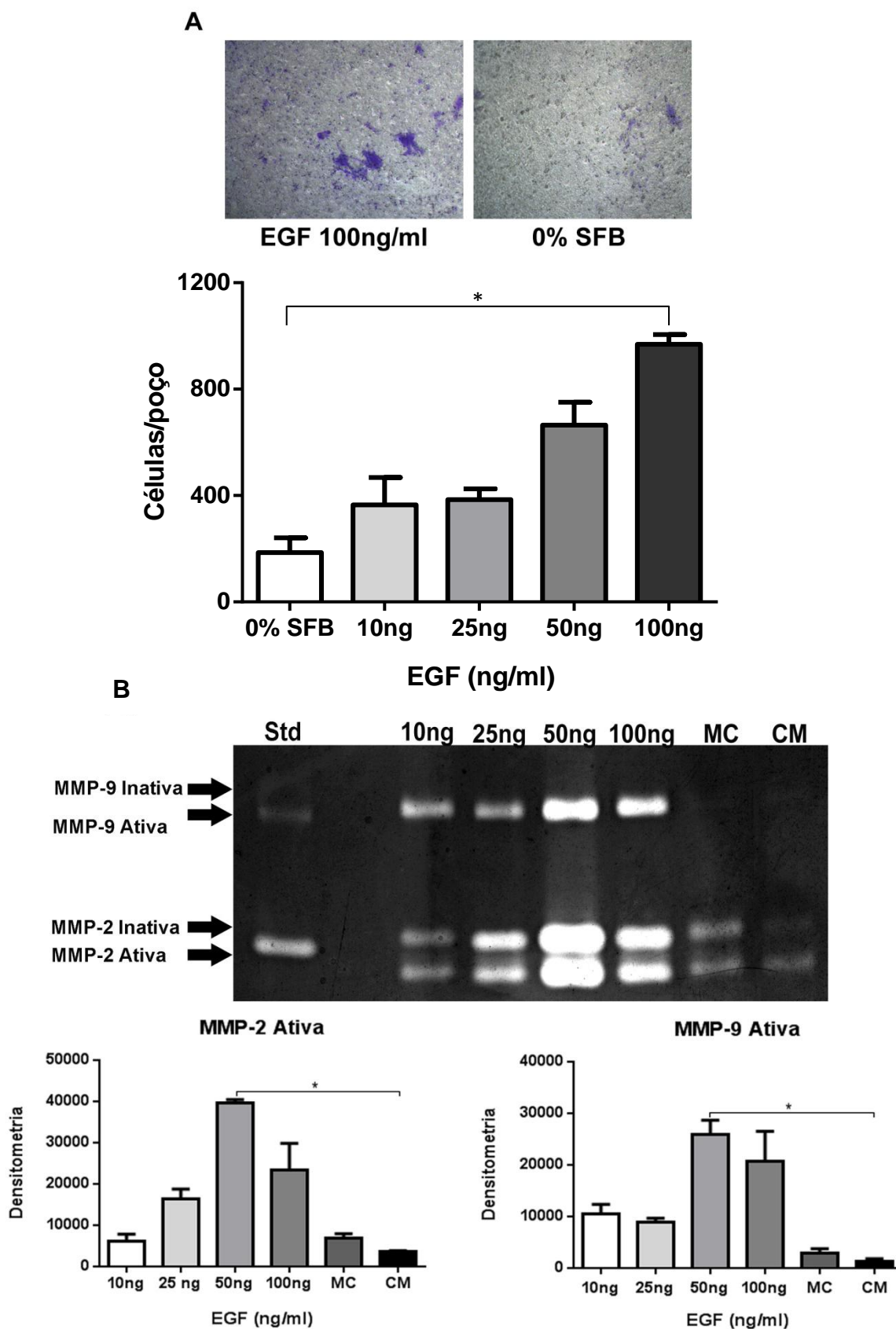
**Figura 4. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e metaloproteinases da matriz (MMPs). Anti-TIMP-1 (F), anti-TIMP-2 (G), anti-MMP-2 (H) e anti-MMP-9 (I). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.



**Figura 5. Fotomicrografias de imunofluorescência indireta da linhagem AME-HPV.** Cultivos imunomarcados contra EGF (J), EGFR (K) sobreposição de EGF e EGFR mostrando a colocalização das proteínas (L). Os núcleos celulares foram marcados com Hoescht 33258.

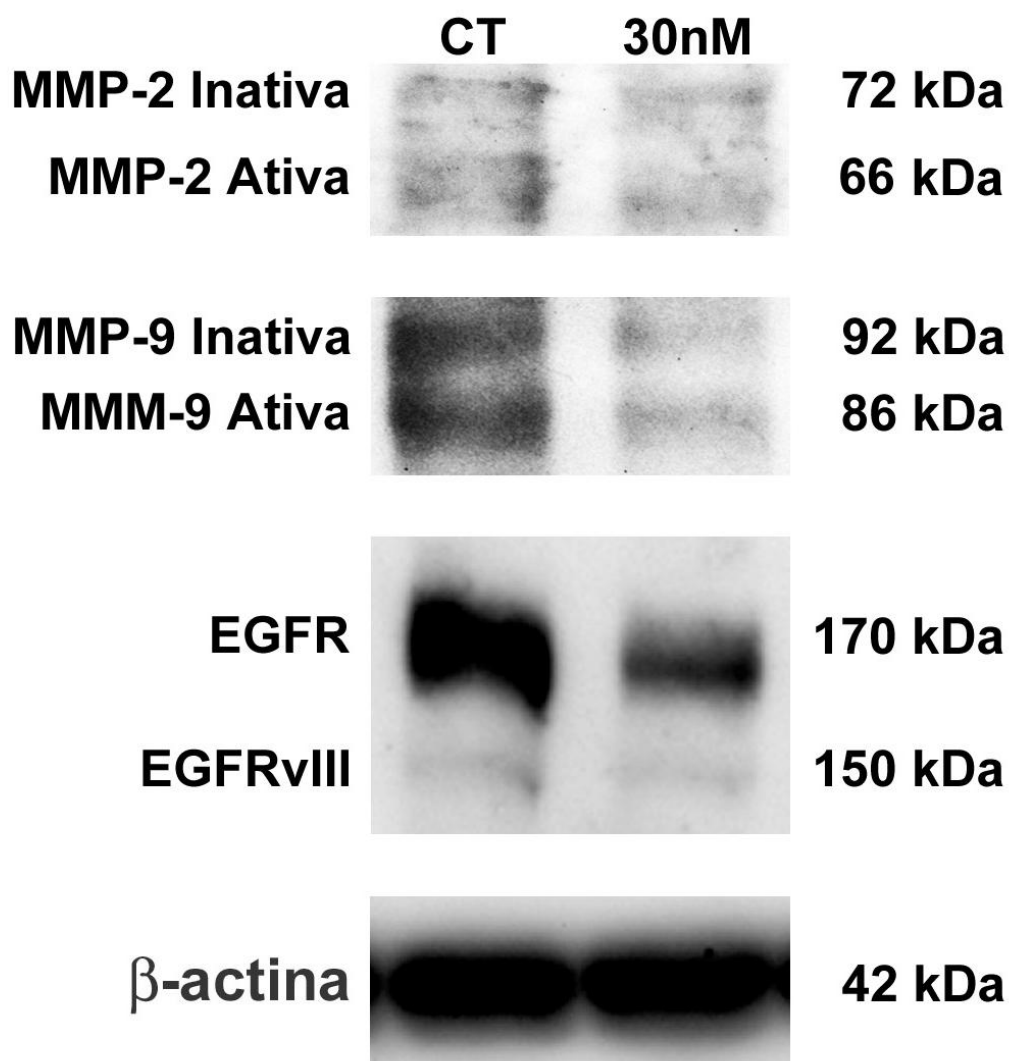


**Figura 6. EGF induz a migração das células AME-HPV.** Nos ensaios de ferida, células AME-HPV tratadas com EGF (50ng/mL; 100ng/mL) mostraram um aumento da atividade migratória em comparação com células cultivadas em meio isento de soro (A e B, micrografias). Linhas definem área da ferida inicial. Células crescendo para além das linhas são consideradas como o fechamento da ferida. A medição da área livre de células demonstrou que o EGF estimulou a taxa de migração das células AME-HPV (A, gráfico). A migração foi também avaliada usando câmaras de quimiotaxia (B, micrografias). A contagem das células revelou que as concentrações crescentes de EGF induziram a migração das células AME-HPV em comparação com o controle negativo (DMEM isento de soro - B, gráfico).



**Figura 7. EGF estimula a invasão e atividade de protease nas células AME-HPV.** Os ensaios de invasão foram realizados em câmaras de quimiotaxia revestidas com matrigel (A, micrografias). A contagem das células demonstrou que a taxa de invasão das células AME-HPV tratadas com EGF 100ng/mL é significativamente aumentada em comparação com o controle 0% de FBS (A, gráfico). A zimografia mostra bandas gelatinolítica correspondentes a MMP-2 e MMP-9 (B). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. Os asteriscos em A e B indicam dados significativos estatisticamente em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).





**Figura 8. Bloqueio do EGFR promove a redução da expressão de MMPs.** A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi diminuída nas amostras que tiveram o EGFR silenciado por siRNA (30 nM). A eficiência de transfecção do siRNA para o EGFR foi confirmada por Western blot, que mostra uma diminuição na expressão de EGFR (170 kDa). Observou-se também uma redução na expressão de uma proteína de 150kDa, que provavelmente corresponde a mutação do EGFR, EGFRvIII.  $\beta$ -actina foi utilizada como

## 2. VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS

**Journal of Oral Pathology & Medicine**

**Edited by: Erik Dabelsteen**

**Impact Factor: 2.055**

**Online ISSN: 1600-0714**

**In vitro study on the modulation of metalloproteinases matrix by epidermal growth factor (EGF) in cells derived from ameloblastoma**

**Running title: Modulation of MMPs mediated by EGF**

**Key words:** ameloblastoma; matrix metalloproteinases; growth factors.

**Marina Rolo Pinheiro da Rosa**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Aline Semblano Dias Carreira**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Jéssica de Almeida Lopes**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Raíssa Mendonça**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Lara Carolina D'Araújo Pinto**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**João Rafael Habib Souza Aquime**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPA, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Maria Sueli da Silva Kataoka**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPa, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil.

**Sérgio de Melo Alves Júnior**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPa, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, University Center of Pará-CESUPA, Belém, Pará, Brazil. Av. Governador José Malcher, 1963. Belém, PA, 66060-230, Brazil.

**João de Jesus Viana Pinheiro**

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará-UFPa, Belém, PA, Brazil. Rua dos Mundurucus, 4487. Belém, PA, 66073-000, Brazil. Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 Ed. Biomédicas 1, sala 302. São Paulo, SP, 05508-000, Brazil.

**Correspondence Author:**

Sérgio de Melo Alves Júnior

Address:

Universidade Federal do Pará

Faculdade de Odontologia

Instituto de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

Avenida Augusto Corrêa, 01. Belém PA, 66075-110 Brazil

Phone number: 55-91-92065207

Fax number: 55-91-32017563

E-mail: [sergiomalves@gmail.com](mailto:sergiomalves@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background:** Ameloblastoma (AME) is an odontogenic tumor with several histopathological patterns and is characterized by its local invasiveness and frequent recurrences. It presents a variety of inducing interactions between the odontogenic epithelium and the tumor stroma and, in face of this neoplastic microenvironment, highlights the extracellular matrix (ECM), which functions as a reservoir for various substances, such as growth factors. Among these growth factors, the epidermal growth factor (EGF) draws the attention. An increased expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR), activated by its ligand, can stimulate the synthesis of proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs), playing an important role in the processes of growth, proliferation and tumor invasiveness. To better understanding some mechanisms of the biological behavior of ameloblastoma, this study aimed to evaluate the effects of EGF in expression, migration, invasion and protease secretion in an immortalized cell line derived from human ameloblastoma (AME-HPV cells). **Results:** Immunofluorescence showed that MMP-2, MMP-9, EGF and EGFR were expressed *in vitro*. The wound healing, migration and invasion assays demonstrated that EGF stimulates cell migration and invasion. It was detected by zymography that cells exhibit an increase in MMP secretion when treated with various concentrations of EGF. Silencing of EGFR induced a decreased in MMP-2 and MMP-9 expression. **Conclusion:** These results suggest an interaction between MMPs and EGF, which may be influencing the ECM remodeling and the invasive behavior in ameloblastoma tumorigenesis.

## INTRODUCTION

Odontogenic tumors comprise a complex of histological lesions of various types and clinical behavior, which show different interactions between the inductive odontogenic epithelium and ectomesenchyme (1).

Ameloblastoma is an odontogenic tumor of ectodermal origin, which may arise from remnants of the dental lamina, the reduced enamel epithelium, the epithelial rests of Malassez or the basal cell layer of the surface epithelium and is characterized by proliferation of odontogenic epithelium without ectomesenchyma (2,3,4).

It is a benign tumor that grows slowly. Although it is characterized that way, ameloblastoma is a locally invasive tumor with high recurrence rate even after a radical surgical procedure (5-8).

Using the classification of odontogenic tumors of WHO (2005), studies have shown that the ameloblastoma is the most common odontogenic tumors, followed by the odontogenic keratocyst and the odontoma (9,10).

Tumor behavior has been recognized as the result of a series of events that occur between different cell types within the tumor and surrounding tissues, especially the stroma (11). The stroma of the tumor directly or indirectly influences the growth and proliferation of tumor cells. Most investigations in ameloblastoma aim to study the characteristics of epithelial component constituting the parenchyma of the tumor, while few studies have examined the functions of the stroma (12,13,14).

Some studies about squamous cell carcinoma and breast cancer have demonstrated the important role of stroma in tumorigenesis, events such as invasion, metastasis, tumor progression and the molecular mechanisms underlying (11,15 to 18). However, few studies have investigated the role of stroma in the progression of odontogenic tumors (19).

It is possible that the stromal tumor environment may present specialized cells that exhibit a phenotype between fibroblasts and smooth muscle cells called myofibroblasts. Contemporaneously, studies have shown that the interactions among myofibroblasts, matrix metalloproteinases (MMPs) and growth factors may influence tumor invasion and proliferation (20,21,22).

It was found that the remodeling of the extracellular matrix (ECM) is initiated by tumor cells, whereas stromal cells are responsible for organizing this process (17). Tumor cells activate stromal environment by secreting growth factors and proteases. Then begins the pro-secretion of migratory and invasive specific components of the ECM acting together with their respective receptors, by promoting the reduction in the expression of protease inhibitors. The imbalance between proteases and their inhibitors leads to the degradation of the ECM components (11).

The ECM molecules are regulated or modified by MMPs, a family of enzymes that modulate cell fate by promoting migration and release of growth factors bound to the ECM and activating molecular signaling pathways (23,24). MMPs may play a role in the development of aggressive tumors, since the invasiveness of malignant cells has been associated with overexpression of MMPs (25).

Both parenchyma and stromal of ameloblastoma express MMPs 1, 2 to 9. These enzymes can degrade the bone matrix and release mitogenic factors, which would increase the proliferation of the tumor. A interdependent mechanism involving the synthesis and activity of MMPs may contribute to the proliferation and invasiveness of the tumor (26). In addition, tumor cells and the stroma of the lesion also express inhibitors of matrix metalloproteinases (IMMs), and growth factors, suggesting that these molecules may act together to influence the biological behavior of the tumor (27).

It is known that the proliferative activity as well as the cellular ability to respond to numerous extracellular signals, depends on the activation of growth factor receptors and therefore many studies have devoted attention to them, trying to find ways to control the levels of these receptors and thus controlling cellular proliferation (28-31).

Among the several types of growth factors the epidermal growth factor (EGF) is highlighted (31). This growth factor has binding affinity for epidermal growth factor receptor (EGFR), inducing the production of mitogenic responses (28,32).

Therefore, in view of the importance of elucidating some of the mechanisms of the biological behavior of ameloblastoma, this study aims to evaluate the effects of expression, migration, invasion and protease activity induced by growth factor EGF in a cell line derived from human ameloblastoma.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethics Statement**

This study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Institute of Health Sciences, Federal University of Pará (CEP-ICS/UFGPA) (Protocol 131/10).

### **Cell Culture**

Surgical tissue fragments were obtained from an AME located in the jaw of a 44-year-old patient. Briefly, a sample of the tumor was dissected under a stereoscope (Nikon SMZ660 - Japan) and with the aid of scissors was reduced to small fragments known as explants. These explants were transferred to 25cm<sup>2</sup> culture flasks, pre-treated with poly-D-lysine (1mg/mL, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) containing DMEM-F12 medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco Invitrogen Co. CA, USA) supplemented with 20% FBS (Fetal Bovine Serum of

English, Gibco®), glutamine (2mM, Sigma®) solution of penicillin/streptomycin (100µg/mL, Gibco®), sodium bicarbonate (3mM, Sigma®), fungizone (2.5g/mL, Gibco®) and glucose (33mm, Merck SA, RJ, Brazil) and maintained in oven at 37°C and humidified containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells (AME-1) were then subcultured on the same medium and used for assays.

### **Immortalization of AME-1 cell line using transfection of HPV E6/E7**

AM-12 strain (strain containing the vector HPV E6/E7, were kindly provided by Dr. Denise Galloway) was cultivated in Petri dishes with DMEM-F12 medium (Gibco®) supplemented with 10% FBS (Gibco®) and incubated at 37°C humid atmosphere and 5% CO<sub>2</sub> for 48h until a confluence of approximately 40-50%. The medium containing retroviral particles was collected and then filtered using 22µm filter and dripped on the target cells (AME-1). Polybrene was added (3mg/mL) and target cells were incubated for 8h. To select cells that were transfected 400µg/mL G418 (Sigma®) was added to the medium during for 1 week. After selection with G418, transfected cells (AME-HPV) were cultured in DMEM containing 10% FBS. Later to confirm the cell immortalization were realized two different tests. It was first realized indirect immunofluorescence antibody against HPV E6/E7 and later the western blot against p-53 because this protein has affinity for fragment E6.

### **Immunofluorescence**

AME-HPV cells were grown on glass coverslips in 24-well plates for 48h. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde for 10min at room temperature. For tags with HPV E6/E7, fibronectin, vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, CK-14, CK-19, MMP-2 and MMP-9 cells were permeabilized with a solution of Triton X-100 (Sigma®) at 0.5% for 5 min and blocking was carried out with 10% goat serum in PBS/BSA 1% for 30min. Samples were incubated with anti-HPV E6/E7, mouse monoclonal antibody (1:100, Abcam, Cambridge, USA), anti-fibronectin rabbit polyclonal antibody (1:200, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA), anti-vimentin, mouse monoclonal antibody (1:100, Dako®), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin, mouse monoclonal antibody (1:100, Dako®), anti-CK-14, mouse monoclonal antibody (1:50, Millipore Inc, Bedford, MA, USA), anti-CK-19 mouse monoclonal antibody (1:50, DBS-Diagnostic Biosystems Inc., Pleasanton, CA, USA), anti-TIMP-1 mouse monoclonal antibody (1:100, Dako®), anti-TIMP-2 mouse monoclonal antibody (1:100, Dako®), anti-MMP-2 mouse monoclonal

antibody (1:100, Millipore®), anti-MMP-9 rabbit polyclonal antibody (1:100, Millipore®) diluted in PBS/1% BSA containing 10% goat serum. The secondary antibody Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) revealed the primary antibody. The samples were blocked with 10% goat serum and then incubated with anti-EGFR mouse monoclonal antibody (1:100, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) and anti-EGF mouse polyclonal antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted in PBS/BSA 1% containing 10% goat serum. The secondary antibody Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568 (Invitrogen®) revealed the primary antibody. Hoechst 33258 (1:1000, Sigma) was used for nuclear staining. Negative controls were performed by substituting the primary antibody for PBS/BSA 1%. Sample analysis and image acquisitions were performed using a fluorescence microscope (Axio Scope A1, Zeiss, SP, Brasil) equipped with a digital camera (AxioCam MRc, Zeiss®).

### **Monolayer wound assay**

The cell migration investigated AME-HPV in vitro by testing a wound monolayer. The cells were cultured in 24-well plates in the presence of DMEM-F12 with 10% FBS until they reached confluence of the monolayer. With a micropipette tip a discontinuity of this monolayer was held creating an area free of cells ("wound"). Monolayers with the "injured" were washed with DMEM-F12 medium without FBS for removal of cell debris and subsequently incubated with the polypeptide EGF (Sigma®) diluted in culture medium without FBS in different concentrations (10ng/ml; 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml). The positive control was performed with incubation of cells in medium containing 10% FBS and negative control in medium without FBS. The closure of "wounds" was observed at 0, 12, 24, 48 and 72h. Reference points were marked on the bottom of each well of the plate to locate the fields corresponding to areas free of cells, thus making the acquisition of images of the same area at different time intervals. The areas free of cells in the treated and control groups were calculated as percentage of cell-free area at 0h, arbitrarily labeled as 100%. Assays were performed in triplicate.

### **Migration assay**

To complement the results obtained with the wound healing monolayer migration was evaluated using chemotaxis chambers (Millipore®) with polyethylene membrane (PET, English Polyethylene Terephthalate) containing pore diameter of 8µm.



AME-HPV cells ( $25 \times 10^4$ ) were grown in DMEM free of FBS in the upper chamber. The lower chamber was filled with DMEM free of FBS containing polypeptide EGF (10ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml). Wells of the lower chamber filled with medium without FBS and with 0.5% FBS served as negative and positive controls, respectively. Cells were grown under these conditions for 24h in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The cells located on the upper membrane were removed with a cotton swab and the cells located on the underside of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet solution in methanol 0.2% to 20%. Images were acquired from seven fields for each experimental group, using a digital camera (AxioCam MRc, Zeiss®) which allowed the counting of cells that migrated. Assays were performed in triplicate.

### **Invasion assay**

The invasion assay was performed in chemotaxis chambers (Millipore ®) with PET membrane having a pore size of 8µm in diameter coated with matrigel. AME-HPV cells ( $3 \times 10^4$ ) were seeded in DMEM F12 free of FBS in the upper chamber. The lower chamber was filled with free DMEM-F12 containing polypeptide FSB EGF (10ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml). Wells of the lower chamber filled with medium without FBS and with 0.5% FBS served as negative and positive controls, respectively. Cells were grown under these conditions for 72h in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. The cells located on the upper membrane were removed with a cotton swab and the cells that invaded located on the underside of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet solution in methanol 0.2% to 20%. The acquisition of images from seven fields for each experimental group was performed using a digital camera (AxioCam MRc, Zeiss®) which allowed the counting of cells that invaded. Assays were performed in triplicate.

### **Protease activity of EGF-treated cells**

AME-HPV cells were grown in 6-well plates coated with increasing concentrations of EGF (10ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml) diluted in DMEM-F12 medium without FBS for 24h. This culture medium was removed and the cells were maintained in DMEM-F12 medium without FBS for 24h. The presence of MMPs in conditioned medium was measured by zymography technique. Conditioned media were collected, concentrated (Microcom 3000D, Millipore®) treated with protease inhibitors

(Sigma®) and resuspended in SDS-PAGE sample buffer. The amount of protein was estimated by BSA curve. The samples were separated on polyacrylamide gels containing 0.1% to 10% gelatin (Sigma®). After electrophoresis, the gels were washed in Buffer Renaturing 1x for 1h and incubated for 16-20h at 37°C in buffer gel revealing Zymogram Developing Buffer 1x (Biogen Idec Inc., Cambridge, MA, USA) for 18h. The gels were then stained with Coomassie Brilliant Blue 0.1% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and destained in a solution of 40% methanol and glacial acetic acid 10% in distilled water. After this step, active MMPs were identified in the gel as clear bands on a blue background lysis.

### **Small interfering RNA (siRNA)**

AME-HPV cells were transfected with RNAi for EGFR (SC-29301, Santa Cruz®) following the manufacturer's information. One day prior to transfection, cells AME-HPV were cultivated in DMEM-F12 without antibiotic and antimycotic solution containing 10% FSB. The cells were incubated with a complex formed by RNAi (20nM, 30nM and 40nM) transfection reagent (Lipofectamine 2000, Gibco ®) and transfection medium (Opti-MEM 1, Gibco ®) for 24h at 37°C. Scrambled RNAi sequence (Santa Cruz ®) was used as control. The transfection efficiency was confirmed by western blot.

### **Western Blot**

The cells were lysed in RIPA buffer (Sigma®) and protease inhibitor (Sigma®) was added before the samples were centrifuged (5000rpm for 15min at 4°C). The collected supernatants were quantified (BCA method - Thermo Fisher Scientific) and resuspended in sample buffer Laemmli containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 5% mercaptoethanol bromphenol blue and 0.01%. Equal amounts of cell lysates (25µg) were subjected to electrophoresis on gradient gels of 10% polyacrylamide. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL - Amersham Biosciences, USA) and blocking was performed with 5% skim milk for 30min at 4°C. After three washes in buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Amersham Biosciences, USA) the membrane was incubated with primary antibody. Primary antibodies were detected by secondary antibody (1:10000) and developed using a chemiluminescent substrate (ECL - Amersham®). Primary antibodies include using  $\beta$ -

actin (1:2000, Sigma®), p-53 (1:500, Leica Biosystems®), EGFR (1:1000, Spring Bioscience®), MMP-2 (1:1000, Millipore®) and MMP-9 (1:1000, Millipore®).

### **Statistical analysis**

The software used was GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Kruskal-Wallis test was used to assess differences between groups with three or more independent samples, continuous variable and abnormal distribution. The differences between three or more groups were estimated by analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni multiple comparisons. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Immortalization of AME-1 cells**

AME-1 cells were immortalized with the transfection of retroviral vectors HPV E6/E7. AME-1 cells expressed the HPV E6/E7 protein (Figure 1A), which was found as points in the core and around itself. Samples of AME-1 cell line were used as controls and showed no labeling for this protein (Figure 1B). In addition, western blot analysis confirmed the expression of p-53 AME-HPV cells, but not in AME-1 cells (Figure 1C).

### **AME-HPV cells express MMPs and growth factor**

AME-HPV cells expressed extracellular matrix protein and cytoskeleton such as fibronectin, vimentin,  $\alpha$ -actin (Figure 2A-C) and cytokeratin 14 and 19 intracellular punctate with markings (Figure 3D-E). It was also possible to verify the expression of TIMP-1, TIMP-2 (Figure 4F-G), both appearing as intracellular punctate markings as well as MMP-2 and MMP-9 (Figure 5H-I). EGF and EGFR (Figure 5J-K) were observed as points along the cell membrane. Furthermore, AME-HPV cells exhibited EGF and EGFR as dots colocalized on cell surface (Figure 5L). The negative controls showed no labeling (data not shown).

### **EGF increases migration of AME-HPV cells**

The epidermal growth factor, EGF, increased AME-HPV cell migration. The monolayer wound assay (Figure 6A) showed that AME-HPV cells treated with EGF

(100ng/ml and 50ng/mL) increased their migratory activity compared to cells cultured in serum-free medium.

After 24h, cell-free area was reduced to 61% in AME-HPV cells treated with 50ng/mL EGF, while reduced area, in cells treated with serum-free medium was 80% ( $p<0,05$ ). After 48h, only 39% of the wound area was free of cells in the EGF group and the negative control had a total of 65% cell-free area ( $p<0.0001$ ). After 72h, only 26% of the wound area was free of cells compared to the negative control, which showed 53% cell-free area ( $p<0.001$ ).

Furthermore, the cell-free area decreased to 39% ( $p<0.0001$ ) in cells treated with AME-HPV 100ng/ml EGF for 24h. After 48h of treatment, just 20% of the wound area was free of cells ( $p<0.0001$ ) and after 72h only 10% of the wound area was free of cells compared to the negative control, which showed 54% of cells free area ( $p<0.0001$ ). There was no statistically significant difference between the concentrations of 10 and 25ng/mL and the control group.

The migration assays were performed in chemotaxis chambers for 24h and confirmed the results obtained in wound monolayer tests. Increasing concentrations of EGF induced migration of AME-HPV cells compared to the control (DMEM without FBS) (Figure 6B).

### **EGF increases AME-HPV cells invasion and MMP secretion**

EGF also increased the activity of AME- HPV cell invasion and secretion of MMPs. The invasion assays in chemotaxis chamber coated with Matrigel showed that EGF (100ng/ml) significantly increased AME-HPV cell invasion (Figure 7A).

The process of tumor cell invasion involves the activity of MMPs. Thus, to assess the presence and activity of MMPs, conditioned media from AME-HPV cells, grown in different concentrations of EGF were submitted to zymography technique. AME-HPV cells treated with EGF showed gelatinolytic bands corresponding to molecular weights of MMPs  $2 \times 10^9$ .

In addition, there was a statistically significant difference between the concentration of 50ng/mL and conditioned medium without the offer of EGF in active forms of MMP-2 and MMP-9 ( $p<0.05$ ) (Figure 7B). To determine if these bands were MMPs zymograms conditioned medium from cells treated with EGF were incubated in the presence of a calcium chelator, the EDTA. The treatment resulted in loss of activity

of gelatinases demonstrating that bands were MMPs (not shown). All the experiments were performed in triplicate.

### **Knockdown of EGFR decreased MMP secretion in AME-HPV cells**

RNA interference (siRNA) was used to knockdown EGFR expression and better understand its role in AME-HPV cell line. EGFR knockdown in AME-HPV cells reduced MMPs secretion. The silencing efficiency of EGFR was confirmed by western blot. Cells were treated with different concentrations of RNAi and exhibited a decrease in EGFR expression compared to the control group (RNAi "scrambled"). There was no statistically significant difference among the different siRNA concentrations tested.

Since there was no difference in the EGFR gene silencing when using RNAi concentrations of 20nM, 30nM and 40nM, we decided to work only with 30nM RNAi concentration. Results showed bands of approximately 150kDa, which probably corresponds to EGFRvIII, a mutant EGFR which has its overexpression in malignant tumors. In addition, decreased expression of MMP was observed in the group treated with 30nM siRNA for EGFR, as shown by a reduced expression of inactive MMP-9 and MMP-2 active and inactive (Figure 8).

## **DISCUSSION**

AME between benign odontogenic tumors are the most common with high rates of recurrence and invasive. Little is known about the expression of growth factors in odontogenic tumors. In order to better understand the biological behavior of SMA, we used a cell line derived from this tumor (9,10).

The proliferative activity as well as the ability of cellular response to numerous extracellular signals, depends on the activation of growth factor receptors and these in turn have an important role in tumor progression (28-31).

Among the various growth factors, EGF is one of the most important (31). This growth factor has binding affinity for the receptor of epidermal growth factor receptor (EGFR), inducing the production of mitogenic responses (28,31).

EGF is present in human organs and has key roles in different processes, such as embryogenesis, development, expression of proto-oncogenes, angiogenesis immunosuppressive activity, differentiation and proliferation, both of normal and neoplastic cells. Some evidence suggests that the regulatory system cell stimulated by

EGF can develop an important role in carcinogenesis (33-37). The EGF released after degradation of the ECM can induce cell proliferation through an extracellular signaling pathway (ERK) (ERK) (38,39).

High levels of EGFR have been identified as a common component of many types of cancer (40). In this case, higher expression of this receptor, will be a strong signal for activation of other proteins through a cascade of phosphorylation, resulting in more aggressive and invasive growing cells (41). Increased expression of EGFR is probably a strong prognostic predictor in many tumors, and inhibition of its cellular actions can produce substantial therapeutic benefit (40).

To enable it to carry out the tests and check the inter-relationship between these growth factors and MMPs in a cell line derived from this tumor, AME-1, it was necessary to perform a procedure known as cell immortalization, since this tumor has slow growth and very fast enters senescence in cell cultures.

To prevent this aging process, AME-1 cells were transfected with retroviral HPV E6/E7. Wherein the transfection supernatant containing retroviral particles are introduced into these target cells, and the viral DNA genome and begins accessing the stable expression of E6 and E7 genes, which in turn activates telomerase responsible for cell proliferation and inhibit the process apoptosis (12,42,43).

In order to prove that AME-1 cells were transfected with HPV E6/E7 two different methods were used. Using immunofluorescence we observed the expression of fragment E7 in AME-HPV cell line. Western blot revealed expression of the protein p-53 in immortalized cells, whereas in non-transfected cells the p-53 expression was absent. The protein p-53 was used since it has an affinity with fragments E6/E7 of transfected cells with such retroviral vector.

It is known that the ameloblastoma originates in odontogenic epithelium and the literature shows that the stroma cells have an extensive interaction with the parenchyma, which justifies the importance of studying both cells from stroma and parenchyma present in that environment (44-47). These cells were characterized by expression of proteins identified to mesenchymal and epithelial origin.

The expression of cytokeratin 14 and 19, proteins present in the cytoskeleton of epithelial cells was analyzed by indirect immunofluorescence, suggesting the presence of odontogenic epithelial cells (48-51). The staining pattern revealed granular dispersed expression throughout the cytoplasm.

The expression of fibronectin, ECM proteins, vimentin and  $\alpha$ -smooth muscle actin, cytoskeletal proteins were analyzed by indirect immunofluorescence. There was a striking expression of these three proteins in cultured cells. The fibronectin staining presented as a diffuse filamentary network; vimentin fibrillar labeling was presented throughout the cytoplasm, extending from the core to the cell membrane, whereas the  $\alpha$ -smooth muscle actin exhibited a filament staining pattern throughout the cytoplasm of cell. Similar results regarding the immunofluorescence labeling pattern of stromal cells of ameloblastoma were not found in the literature, however positive staining for vimentin was seen in stromal cells from other tumors, such as in human carcinomas of the esophagus, lung and pancreas (52). The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin denotes the presence of myofibroblasts. Some studies have shown the presence of myofibroblastic cells in normal tissues and tumors, both benign and malignant, and possible correlations between the presence of myofibroblasts and the expression of MMPs, TIMPs and growth factors which have influence on the epithelial-mesenchymal capacity of tumor invasion and cell proliferation, in addition to functioning as a prognostic marker (21,53-55).

When using Immunofluorescence it was observed the expression of EGF and EGFR *in vitro*. Studies have demonstrated the presence of EGFR, particularly in tissues with a high proliferation activity (56,57). Siqueira et al. (27) in their studies with ameloblastoma also observed immunoreactivity for these growth factors in ameloblastoma.

Tumor invasion of the adjacent tissues occurs only when cells receive migration and growth signals. In this study we used two methods to visualize that cell migration assays "wound" and migration chambers bipartite using different concentrations of EGF. It was observed that there was an increase in AME-HPV cell migration. These results corroborate other studies where it was possible to increase these growth factors in other cell types such as breast carcinoma cells, squamous cell carcinoma and oral epithelial cells of the cornea (57,58).

Tumor progression only occurs at the expense of the degradation of the ECM (59). This degradation is caused by the presence of enzymes known as MMPs. MMPs belong to a family of zinc-dependent endopeptidases. There are numerous MMPs, but MMP-2 and -9 have an important role in the degradation of the ECM during the process of tumor invasion (60-63). In this study, using invasion assays, we found that AME-

HPV cells were able to lyse the reconstituted basement membrane, when stimulated by various concentrations of EGF.

Some studies have shown that growth factors regulate MMPs. Studies report that EGF stimulates the expression of MMP-9 and, in addition, activation of EGFR stimulates the expression of MMP-9 (59,64).

The interaction between EGF with MMP-2 and MMP-9 in ameloblastoma tumor is still uncertain, but in the present study the AME-HPV cells secreted metalloproteinases when they were exposed to different concentrations of these growth factors, as shown in zymography assay.

To better understand the interaction between MMPs and EGF it was performed the blocking of the EGFR by RNAi. As a result of the EGFR blocking, it was observed a decreased expression of MMP-2 and 9. The decreased expression of MMP-9 was also observed by Kang et al. (65) using RNAi to EGFR. High levels of EGFR have been identified as a common component of many types of tumors (40). In this case, EGFR higher expression will be a strong signal induction with the activation of a cascade of protein phosphorylation, resulting in growing cells with more aggressive and invasive characteristics (41). Increased expression of EGFR is probably a strong prognostic factor in many tumors, and inhibition of these cellular actions can produce substantial therapeutic benefit (40,66).

By blocking EGFR in AME-HPV cells it was also possible to find a decreased expression of another protein with a molecular weight corresponding to EGFRvIII. Recent studies have found that the squamous cell carcinoma of head and neck expresses a mutation of the EGFR, EGFRvIII (67,68). EGFRvIII is a 150kDa protein consisting of a deletion of the EGFR gene that is specific to cancers (69). Recent data suggest that expression of EGFRvIII enhances the ability of malignant cells to migrate and invade normal tissues, which are key events in tumor metastasis (70,71).

Based on the morphology analysis of protein expression observed in this study, it was found that both stromal and parenchyma cells are present in the AME-HPV cell line established in our laboratory and that they expressed MMPs -2 and -9, as well as EGF and EGFR. The results of this study show that EGF induces migration activity, protease activity and invasion in ameloblastoma cells and blocking the EGFR signaling pathway by decreasing the expression of MMPs in these same cells, suggesting that the inter-relationship between MMPs, EGF and EGFR is an important role in the development of tumorigenesis of this neoplasm.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

This investigations was performed at Federal University of Pará (Belém, Pará, Brazil), and at Institute of Biomedical Sciences, University of SãoPaulo (São Paulo, São Paulo, Brazil). This research was supported by Brazillian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 4815537/2010-4).

**CONFLICT OF INTERESTS STATEMENT**

None declared

**REFERENCES**

1. Neville, BW et al. *Patologia oral e maxilofacial*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009, 972p.
2. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer*. 1992 Dec 15;70(12):2988-94.
3. Hughes CA, Wilson WR, Olding M. Giant ameloblastoma: report of an extreme case and a description of its treatment. *Ear Nose Throat J*. 1999 Aug;78(8):568, 570-2, 574.
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours (WHO Classification of Tumours)*. Lyon: IARC Press, 2005.
5. Jones RH. Ameloblastoma revisited. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 1996 Apr;13:174-80.
6. Fernandes AM, Duarte EC, Pimenta FJ, Souza LN, Santos VR, Mesquita RA, de Aguiar MC. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. *J Oral Pathol Med*. 2005 Nov;34(10):583-7.
7. Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar;64(3):484-94.
8. Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol*. 2007 Dec;30(6):645-8.
9. Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):474-81.
10. Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM. Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. *Pathol Res Pract*. 2012 Apr 15;208(4):225-30.
11. Mueller, MM, Fusenig, NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):839-49.
12. Harada H, Mitsuyasu T, Nakamura N, Higuchi Y, Toyoshima K, Taniguchi A, Yasumoto S. Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1. *J Oral Pathol Med*. 1998 May;27(5):207-12.

13. Tao Q, Huang H. Establishment of immortalized ameloblastoma cell line TAM-1. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2002 May;37(3):167-9.
14. Tao Q, Lv B, Qiao B, Zheng CQ, Chen ZF. Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics. *Oral Oncol*. 2009 Dec;45(12):239-44.
15. Liotta, L. A. & Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*. 2001 May;411(6835):375-9.
16. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJ, Cukierman E. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol*. 2005 Aug;167(2):475-88.
17. Beacham B, Hill C, McDermott F, O'Brien M, Turner J. Therapy with women with metastatic breast cancer. *Australas Psychiatry*. 2005 Mar;13(1):50-3.
18. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392-401.
19. Ito Y, Abiko Y, Tanaka Y, Rahemtulla F, Kaku T. Immunohistochemical localization of large chondroitin sulfate proteoglycan in odontogenic tumor. *Med Electron Microsc*. 2002 Sep;35(3):173-7.
20. Declerck, YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer*. 2000 Jun;36(10):1258-68.
21. Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of myofibroblasts and expression of matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res*. 2009 Jun;15(2):231-40.
22. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Feb;21(1):21-6.
23. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol*. 1999 May;35(3):227-33.
24. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221-33.
25. Pereira AL, Veras SS, Silveira EJ, Seabra FR, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. The role of matrix extracellular proteins and metalloproteinases in head and neck carcinomas: an updated review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005 Jan-Feb;71(1):81-6.

26. Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology*. 2004 Jul;45(1):65-72.
27. Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology*. 2010 Jul;57(1):128-37.
28. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S16-22.
29. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*. 2002;7 Suppl 4:2-8.
30. Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer*. 2003 Jul;39(10):1348-54.
31. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):21-6.
32. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):31-53.
33. Stoscheck CM, King LE Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res*. 1986 Mar;46(3):1030-7.
34. Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 1992 Aug;21(7):314-7.
35. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):143-8.
36. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):2-13.
37. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):99-110.
38. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jun;31(6):637-43.
39. Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):30-5.
40. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S9-15.

41. Ethier SP. Signal transduction pathways: the molecular basis for targeted therapies. *Semin Radiat Oncol*. 2002 Jul;12(3 Suppl 2):3-10.
42. Demers GW, Halbert CL, Galloway DA. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology*. 1994 Jan;198(1):169-74.
43. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):324-34.
44. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):133-44.
45. Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):162-76.
46. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Sirera R, Camps C, Marinez I, Busund LT. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Jan;6(1):209-17.
47. Campbell I, Qiu W, Haviv I. Genetic changes in tumour microenvironments. *J Pathol*. 2011 Mar;223(4):450-8.
48. Ong'uti MN, Howells GL, Williams DM. An immunohistochemical study of keratin expression in ameloblastoma from a Kenyan population. *Oral Dis*. 1999 Apr;5(2):111-6.
49. Fukumashi K, Enokiya Y, Inoue T. Cytokeratins expression of constituting cells in ameloblastoma. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2002 Feb;43(1):13-21.
50. Crivelini MM, de Araújo VC, de Sousa SO, de Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis*. 2003 Jan;9(1):1-6.
51. Pal SK, Sakamoto K, Aragaki T, Akashi T, Yamaguchi A. The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Apr;115(4):523-31.
52. Kopantzev EP, Vayshlya NA, Kopantseva MR, Egorov VI, Pikunov M, Zinovyeva MV, et al. Cellular and molecular phenotypes of proliferating stromal cells from human carcinomas. *Br J Cancer*. 2010 May;102(10):1533-40.
53. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4443-52.

54. Kuroda N, Shimasaki N, Miyazaki E, Hamauzu T, Toi M, Hiroi M, Shuin T, Enzan H. The distribution of myofibroblasts and CD34-positive stromal cells in normal renal pelvis and ureter and their cancers. *Histol Histopathol.* 2006 Dec;21(12):1303-7.
55. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle.* 2006 Aug;5(15):1597-601.
56. Hopkins CR. Internalization of polypeptide growth factor receptors and the regulation of transcription. *Biochem Pharmacol.* 1994 Jan 13;47(1):151-4.
57. Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(12):4016-31.
58. Wang L, Deng SX, Lu L. Role of CTCF in EGF-induced migration of immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Feb 23;53(2):946-51.
59. Dilly M, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C. Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells. *Mol Reprod Dev.* 2010 Jul;77(7):622-9.
60. Soua AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2002;10(1):1-6.
61. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2003 Feb;32(2):114-20.
62. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct;16(5):558-64.
63. Naka T, Kuester D, Boltze C, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A. Expression of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2; cathepsin B; urokinase plasminogen activator; and plasminogen activator inhibitor, type I in skull base chordoma. *Hum Pathol.* 2008 Feb;39(2):217-23.
64. Rothhut B, Ghoneim C, Antonicelli F, Soula-Rothhut M. Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. *Biochimie.* 2007 May;89(5):613-24.
65. Kang CS, Pu PY, Li YH, Zhang ZY, Qiu MZ, Huang Q, et al. An in vitro study on the suppressive effect of glioma cell growth induced by plasmid-based small

interference RNA (siRNA) targeting human epidermal growth factor receptor. *J Neurooncol* 74(3):267-73, 2005.

66. Chen S, Liu X, Gong W, Yang H, Luo D, Zuo X, Li W, Wu P, Liu L, Xu Q, Ji A. Combination therapy with VEGFR2 and EGFR siRNA enhances the antitumor effect of cisplatin in non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep.* 2013 Jan;29(1):260-8.

67. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12(17):5064-73, 2006.

68. Keller J, Shroyer KR, Batajoo SK, Zhao HL, Dong LM, Hayman MJ, et al. Combination of phosphorylated and truncated EGFR correlates with higher tumor and nodal stage in head and neck cancer. *Cancer Invest* 28(10):1054-62, 2010.

69. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53(15):3579-84, 1993.

70. Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* 29(37):5135-45, 2010.

71. Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD, Schroeder MA, Sarkaria JN, White FM. Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Dec;11(12):1724-40.

## FIGURE LEGEND

**Figure 1. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunofluorescence showed that cells transfected ameloblastoma (AME-HPV) HPV E6/E7 gene expressed in a punctiform around and on-nucleus (A), while untransfected cells (AME-1) did not express this gene (B). Western blot confirmed the expression of p-53 cells AME-HPV but not AME-1 cells (C).

**Figure 2. Photomicrographs of immunofluorescence of the lineage AME-HPV.** Crops immunostained against proteins of the extracellular matrix and the cytoskeleton. Anti-fibronectin (A), anti-vimentin (B), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (C). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.

**Figure 3. Photomicrographs of immunofluorescence AME-HPV strain derived from ameloblastoma.** Crops indirectly immunostained against cytoskeletal proteins. anti-cytokeratin 14 (D) and anti-Cytokeratin 19 (E). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.

**Figure 4. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunostained crops against inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and matrix metalloproteinases (MMPs). Anti-TIMP-1 (F), anti-TIMP-2 (G), anti-MMP-2 (H) and anti-MMP-9 (I). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.

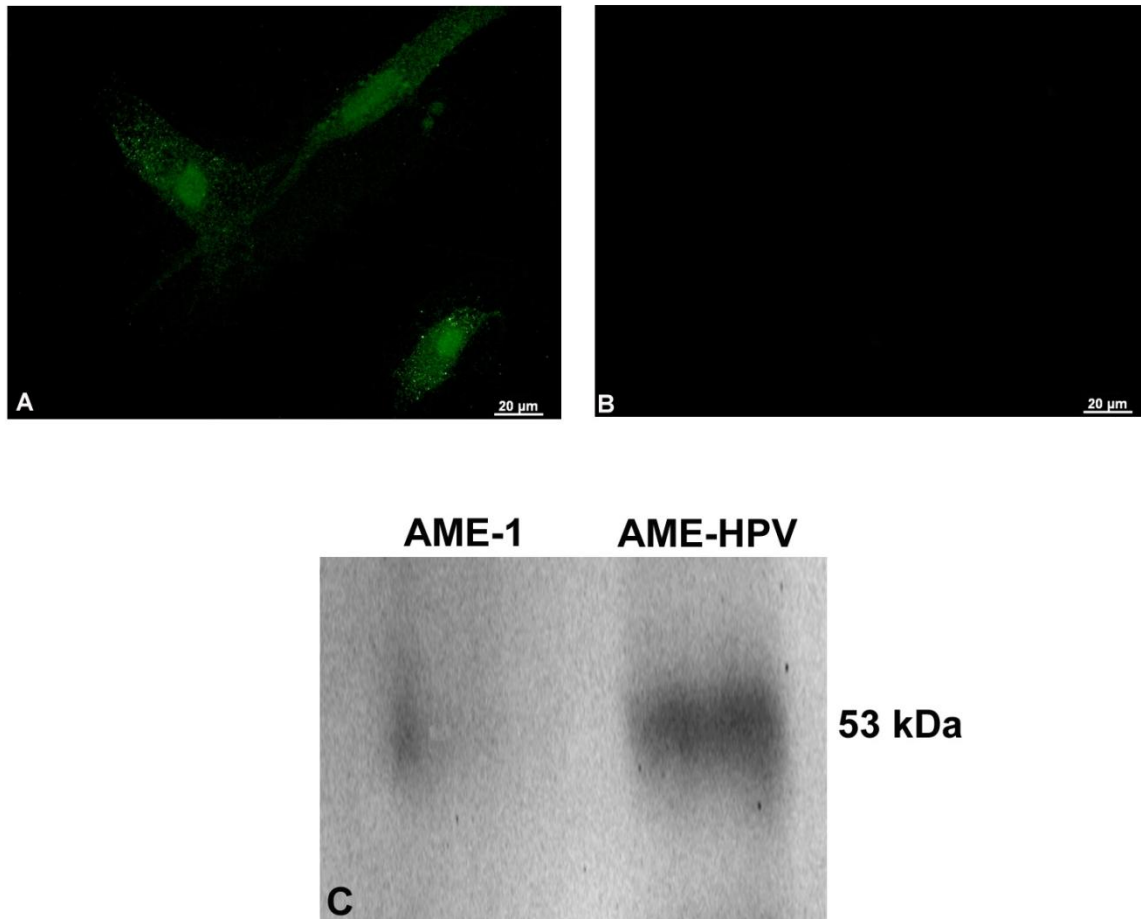
**Figure 5. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunostained crops against EGF (J), EGFR (K) and the overlay of EGF and EGFR showing the colocalization of protein (L). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.

**Figure 6. EGF induces cell migration in AME-HPV.** In wound AME-HPV cells treated with EGF (50ng/mL; 100ng/ml) showed an increased migratory activity compared to cells cultured in serum-free medium (A and B micrographs). Lines define the initial wound area. Cells growing beyond lines are considered to be wound closure. Measurement of cell-free area showed that EGF stimulated cell migration rate AME-HPV (A, graph). The migration was also evaluated using chemotaxis chambers (B, micrographs). A cell count showed that increasing concentrations of EGF-induced migration of cells AME-HPV compared to the negative control (serum-free DMEM - B graph).

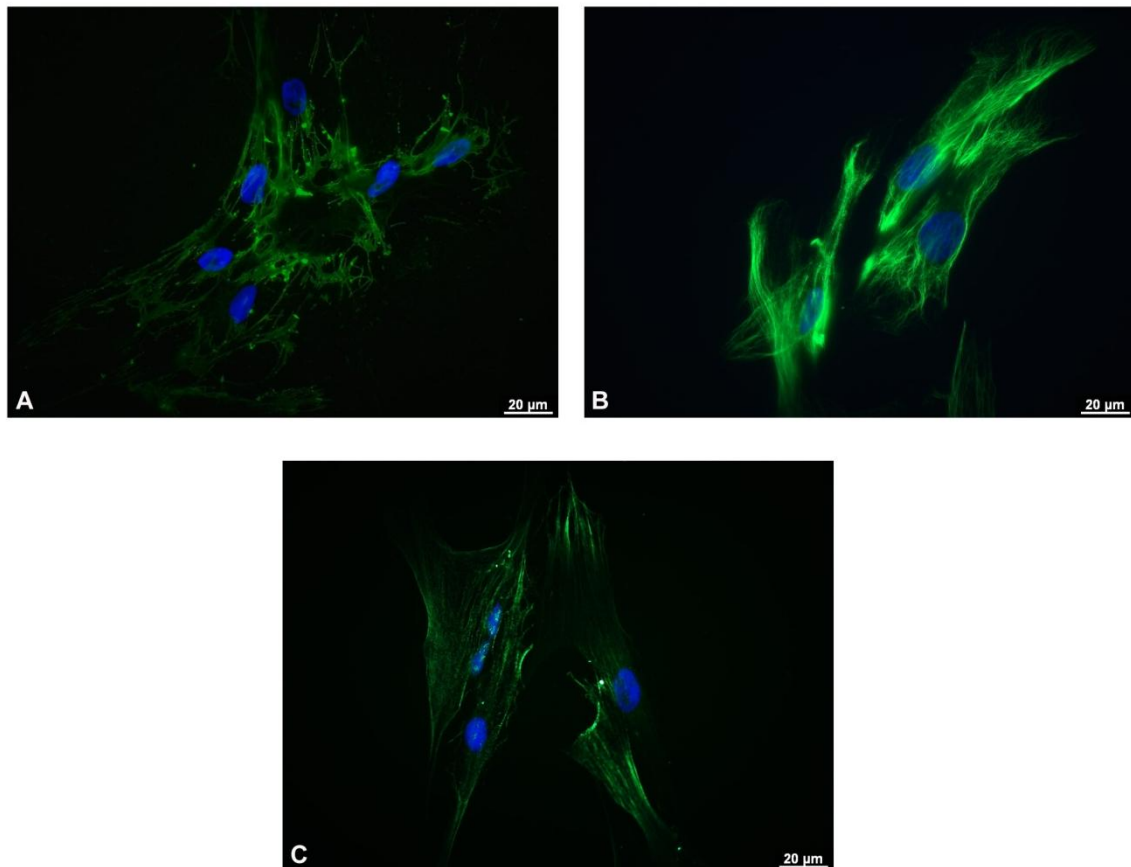
**Figure 7. EGF stimulates invasion and protease activity in cells AME-HPV.** The invasion assays were performed in chamber chemotaxis coated with matrigel (A, micrographs). The cell counts demonstrated that the rate of cell invasion AME- HPV treated 100ng/ml EGF is significantly increased compared with control 0% FBS (A, graph). Gelatinase zymography show bands corresponding to MMP-2 and MMP-9 (B). Results represent mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. The asterisks in A and B indicate significant data as compared to the control ( $p < 0.05$ ).

**Figure 8. Knockdown of EGFR promotes a decrease in MMPs expression.** The expression of MMP-2 and MMP-9 was reduced in samples that have silenced by EGFR siRNA (30nM). The transfection efficiency of siRNA for EGFR was confirmed by western blot, which shows a decreased expression of EGFR (170kDa). We also observed a reduction in the expression of a protein of 150KDa, which probably corresponds to EGFR mutation, EGFRvIII.  $\beta$ -actin was used as loading control.

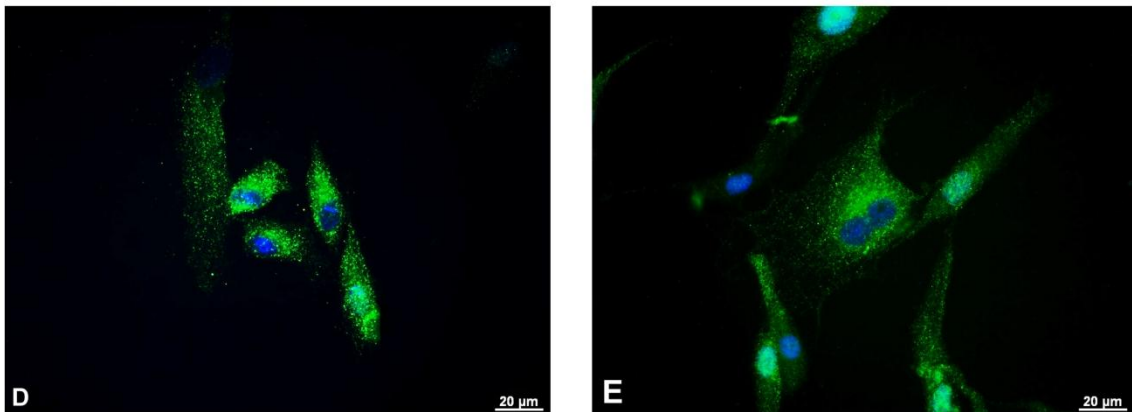




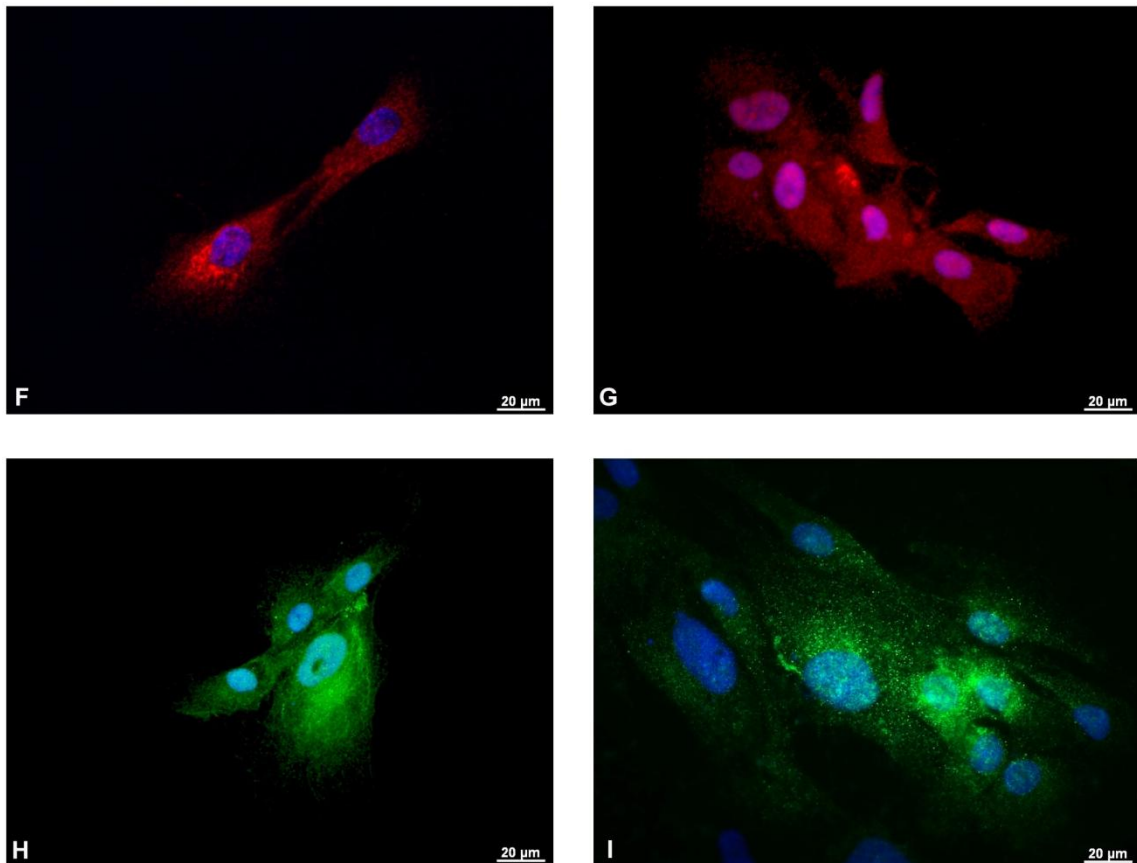
**Figure 1. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunofluorescence showed that cells transfected ameloblastoma (AME-HPV) HPV E6/E7 gene expressed in a punctiform around and on-nucleus (A), while untransfected cells (AME-1) did not express this gene (B). Western blot confirmed the expression of p-53 cells AME-HPV but not AME-1 cells (C).



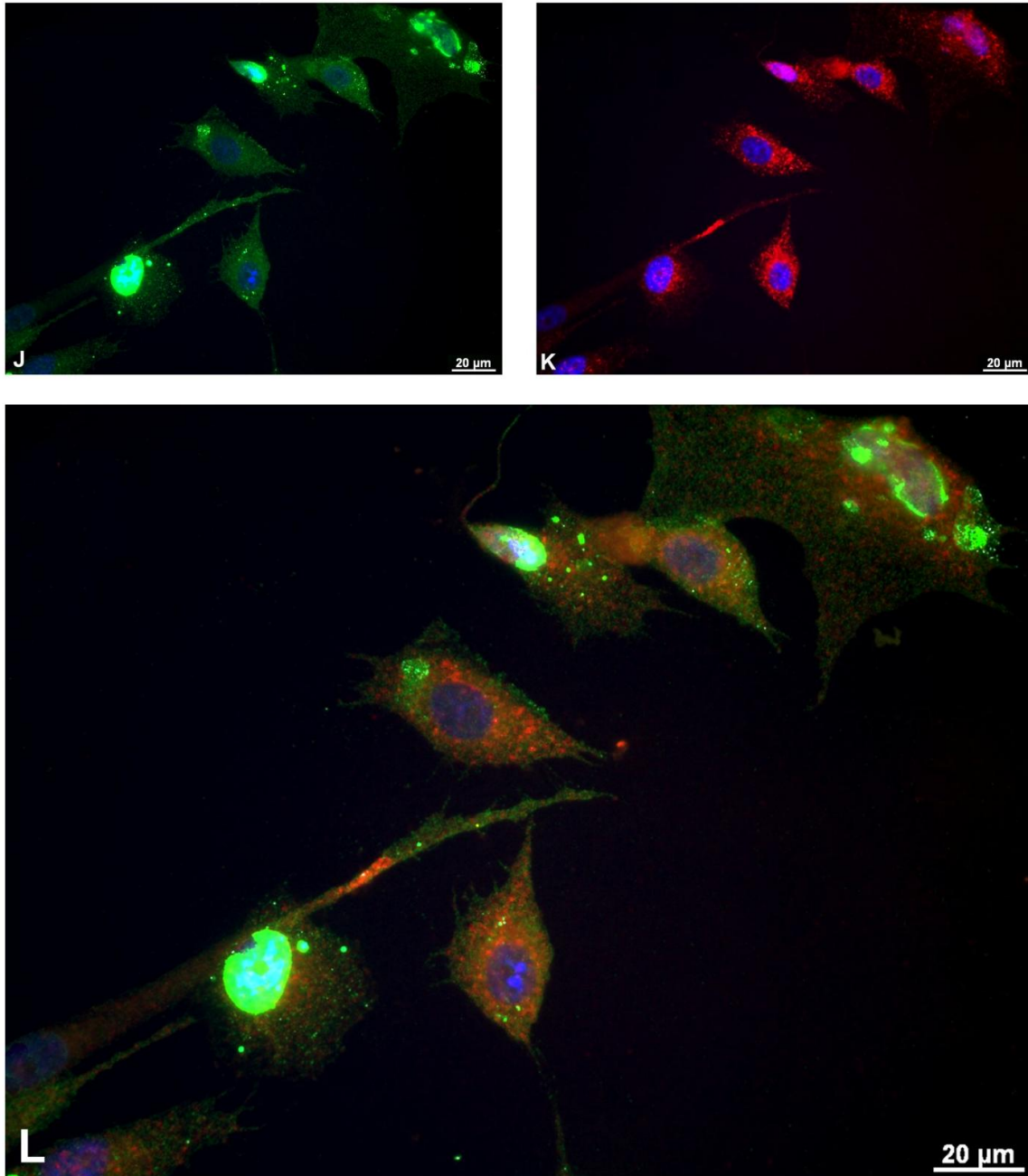
**Figure 2.** Photomicrographs of immunofluorescence of the lineage AME-HPV. Crops immunostained against proteins of the extracellular matrix and the cytoskeleton. Anti-fibronectin (A), anti-vimentin (B), anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (C). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.



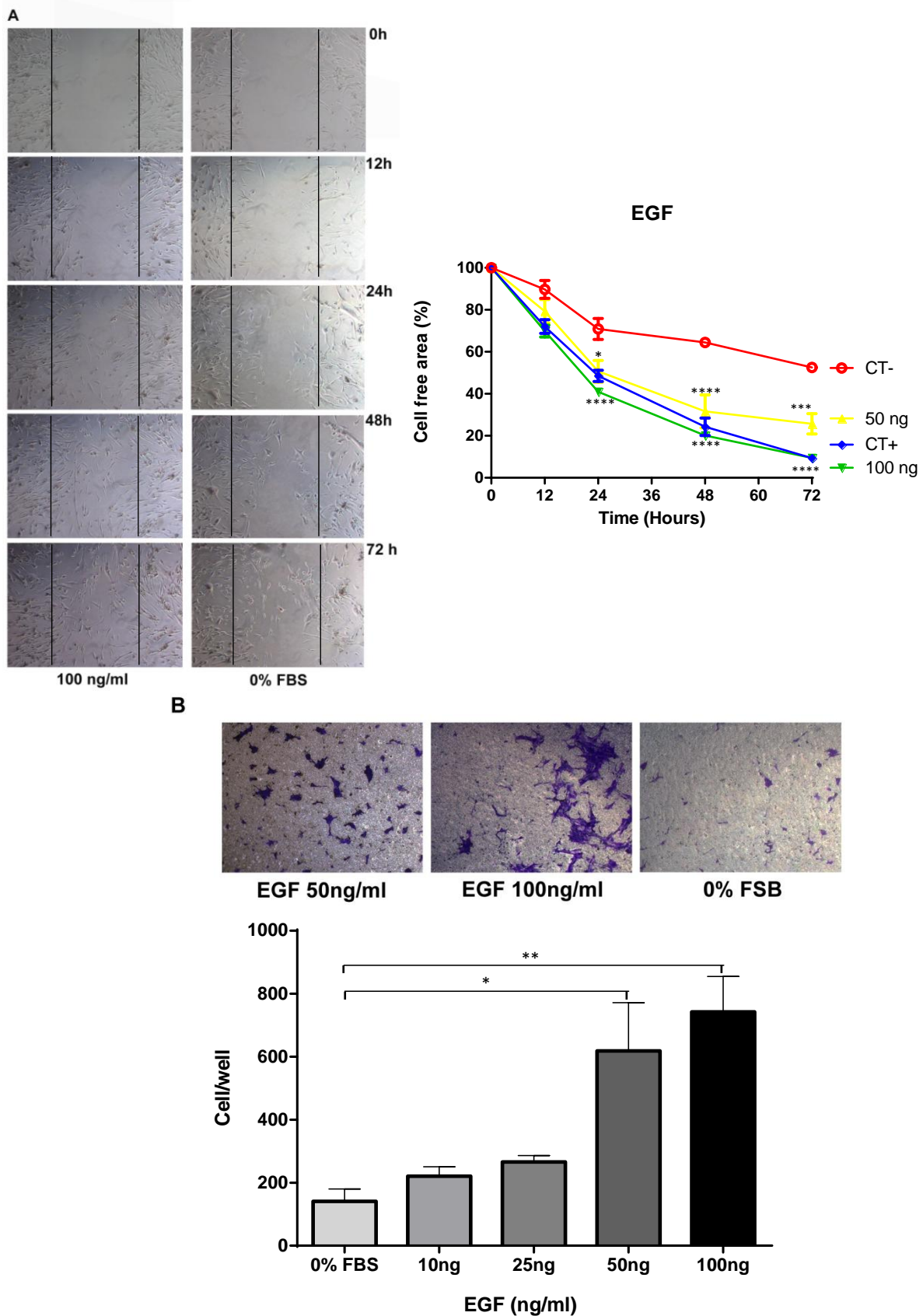
**Figure 3. Photomicrographs of immunofluorescence of the lineage AME-HPV.** Crops indirectly immunostained against cytoskeletal proteins. anti-cytokeratin 14 (D) and anti-Cytokeratin 19 (E). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.



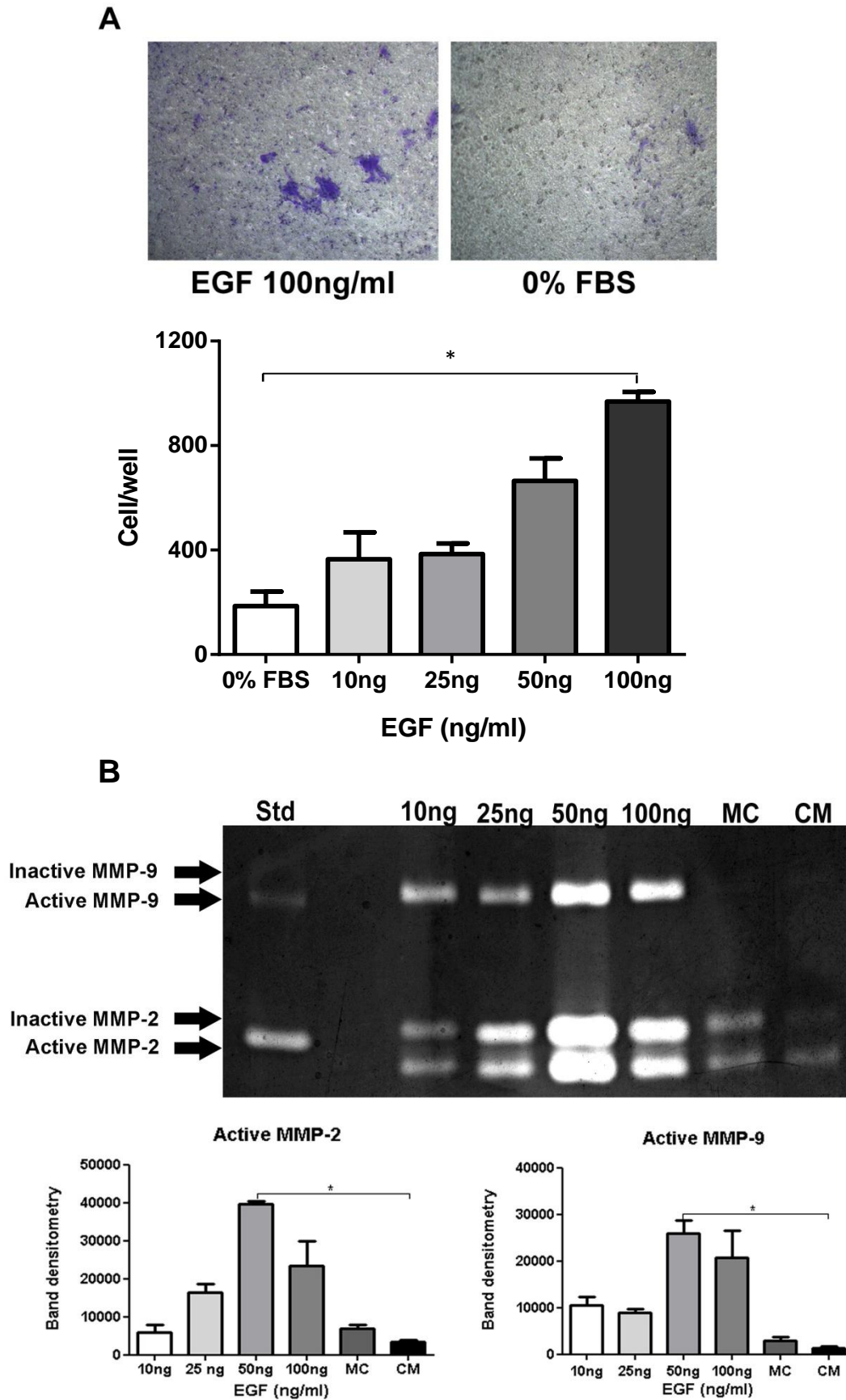
**Figure 4. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunostained crops against inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and matrix metalloproteinases (MMPs). Anti-TIMP-1 (F), anti-TIMP-2 (G), anti-MMP-2 (H) and anti-MMP-9 (I). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.



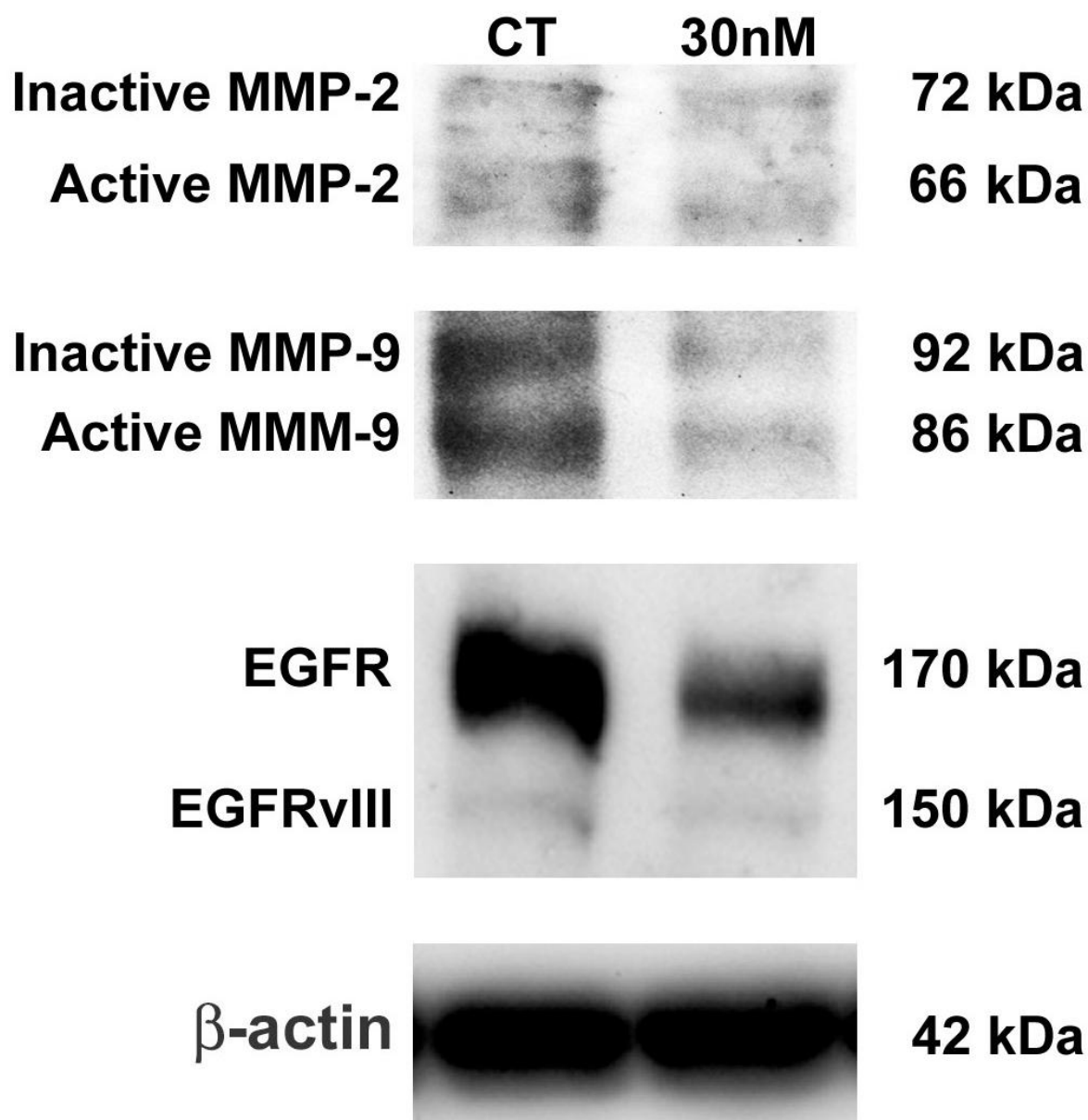
**Figure 5. Photomicrographs of immunofluorescence lineage AME-HPV.** Immunostained crops against EGF (J), EGFR (K) and the overlay of EGF and EGFR showing the colocalization of protein (L). The cell nuclei were labeled with Hoechst 33258.



**Figure 6. EGF induces cell migration in AME-HPV.** In wound assays, AME-HPV cells treated with EGF (50ng/mL; 100ng/ml) showed an increased migratory activity compared to cells cultured in serum-free medium (A, micrography). Lines define the initial wound area. Cells growing beyond lines are considered to be wound closure. Measurement of cell-free area showed that EGF stimulated cell migration rate AME-HPV (B, graph). The migration was also evaluated using chemotaxis chambers (A, micrographs). The cell count shows that increasing concentrations of EGF induced migration of cells AME-HPV compared to the negative control (serum-free DMEM - B graph).



**Figure 7. EGF stimulates invasion and protease activity in cells AME-HPV.** The invasion assays were performed in chamber chemotaxis coated with matrigel (A, micrographs). The cell counts demonstrated that the rate of cell invasion AME-treated HPV 100ng/ml EGF is significantly increased compared with control 0% FBS (A, graph). Gelatinase zymography show bands corresponding to MMP-2 and MMP-9 (B). Results represent mean  $\pm$  standard error of three independent experiments. The asterisks in A and B indicate significant data as compared to the control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 8. Knockdown of EGFR promotes a decrease in MMPs expression.** The expression of MMP-2 and MMP-9 was reduced in samples that have silenced by EGFR siRNA (30nM). The transfection efficiency of siRNA for EGFR was confirmed by Western blot, which shows a decreased expression of EGFR (170kDa). We also observed a reduction in the expression of a protein of 150kDa, which probably corresponds to EGFR mutation, EGFRvIII.  $\beta$ -actin was used as loading control.

### 3. METODOLOGIA DETALHADA DO ARTIGO

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA), CAAE nº 0091.0.073.000-10, sob o protocolo nº131/10 e aprovado na reunião do dia 19/11/2010, conforme a carta provisória 158/10 CEP-ICS UFPA que consta no parecer em anexo (ANEXO 1).

#### 3.2 AMOSTRA DO ESTUDO

Este estudo utilizou uma linhagem celular derivada de ameloblastoma humano (células AME-1) do projeto de pesquisa intitulado “Isolamento e caracterização de células derivadas de ameloblastoma. Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz por fatores de crescimento”, o qual foi aprovado pelo CEP-ICS/UFPA sob o protocolo nº131/10 (ANEXO 1).

#### 3.3 CULTIVO CELULAR

O cultivo primário foi estabelecido a partir de explantes (pequenos fragmentos de tecido). A amostra do tumor foi dissecada sob estereoscópio (Nikon SMZ660, Japan), e com auxílio de tesoura foi reduzida a pequenos fragmentos. Esses explantes foram transferidos para frascos, tratados previamente com poly-D-lisina (1mg/mL, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), contendo meio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12), suplementado com 20% de FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*, Gibco®), glutamina (2mM, Sigma®), solução de penicilina/estreptomicina (100µg/mL, Gibco®), bicarbonato de sódio (3mM, Sigma®), fungizona (2,5µg/mL, Gibco®) e glicose (33mM, Merck AS, RJ, Brasil) e suavemente foram transferidos para frascos de cultivo. Esses cultivos foram mantidos em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h da semeadura foi realizada a troca do meio. O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha), sendo o meio de cultivo trocado a cada 3 ou 4 dias, de acordo com o metabolismo celular, até que o cultivo atingisse a confluência.



Para obtenção dos subcultivos o meio de cultura foi removido e a monocamada celular lavada com PBS (pH 7,2). As células foram dissociadas em solução de tripsina a 0,25% (Gibco®) com 1mM de EDTA (Gibco®), durante 3min. A tripsina foi inativada com meio DMEM-F12 completo, e as células em suspensão transferidas para um tubo e centrifugadas (3000rpm durante 3min). O sobrenadante foi descartado, meio DMEM-F12 completo foi acrescentado e as células suavemente dissociadas foram distribuídas em frascos. Os cultivos celulares foram mantidos em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após sucessivos subcultivos e estabelecimento da linhagem celular, denominada AME-1, foram realizados os procedimentos para congelamento das células. O meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com PBS. As células foram dissociadas em solução de tripsina a 0,25% com 1mM de EDTA, durante 3min, a 37°C. A tripsina foi inativada com meio DMEM-F12 completo, e as células em suspensão transferidas para um tubo e centrifugadas (3000rpm durante 3min). Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensado em meio de congelamento (80% de meio DMEM-F12 (Gibco®), 10% de FBS (Gibco®) e 10% de DMSO (Amresco, Solon, Ohio, USA) e distribuídos em criotubos, que foram estocados em nitrogênio líquido.

Todas as etapas deste trabalho que envolveram a manipulação das células tumorais foram realizadas em capela de fluxo laminar tipo II, seguindo todos os procedimentos de biossegurança exigidos pela legislação vigente de acordo com a CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).

#### 3.4 TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS AME-1 COM VETOR RETROVIRAL HPV E6/E7

Para a imortalização da linhagem celular as células AME-1 foram submetidas ao processo de transfecção com o vetor viral HPV E6/E7. Para isso, a linhagem AM-12 (linhagem que contém o vetor HPV E6/E7) foi cultivada em placa de Petri, com meio DMEM-F12 (Gibco®) suplementado com 10% de FBS (Gibco®), e incubada em estufa a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando a linhagem atingiu a confluência de aproximadamente 40-50% o meio foi aspirado e substituído por meio de cultura fresco, possibilitando a concentração de partículas retrovirais.

Após 48h, o sobrenadante das células AM-12 foi utilizado para infectar a linhagem AME-1. Para isso, o sobrenadante das células AM-12 foi aspirado e filtrado utilizando filtro de 22 $\mu$ m e gotejado sobre as células AME-1 na presença de 3mg/mL de Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma®), o qual impede que vetores retrovirais se agreguem e dificultem a infecção dessas células.

Após 8h de contato com o sobrenadante da linhagem AM-12, o meio foi substituído por meio de cultura fresco. Após 48h de infecção, as células foram selecionadas com 400 $\mu$ g/mL de Geneticina (G418, Gibco®) por 1 semana, tempo no qual somente as células infectadas sobrevivem. Essa seleção foi realizada até a constatação de morte de todas as células da placa controle, onde foram utilizadas células AME-1 sem o vetor retroviral. Após a seleção com G418, as células infectadas denominadas agora AME-HPV, foram mantidas em meio fresco para permitir o crescimento dessas células. Posteriormente para confirmação da imortalização celular foram realizados dois ensaios diferentes. Primeiramente foi realizado a imunofluorescência indireta contra o anticorpo HPV E6/E7, o western blot contra p-53, pois essa proteína tem afinidade pelo fragmento E6.

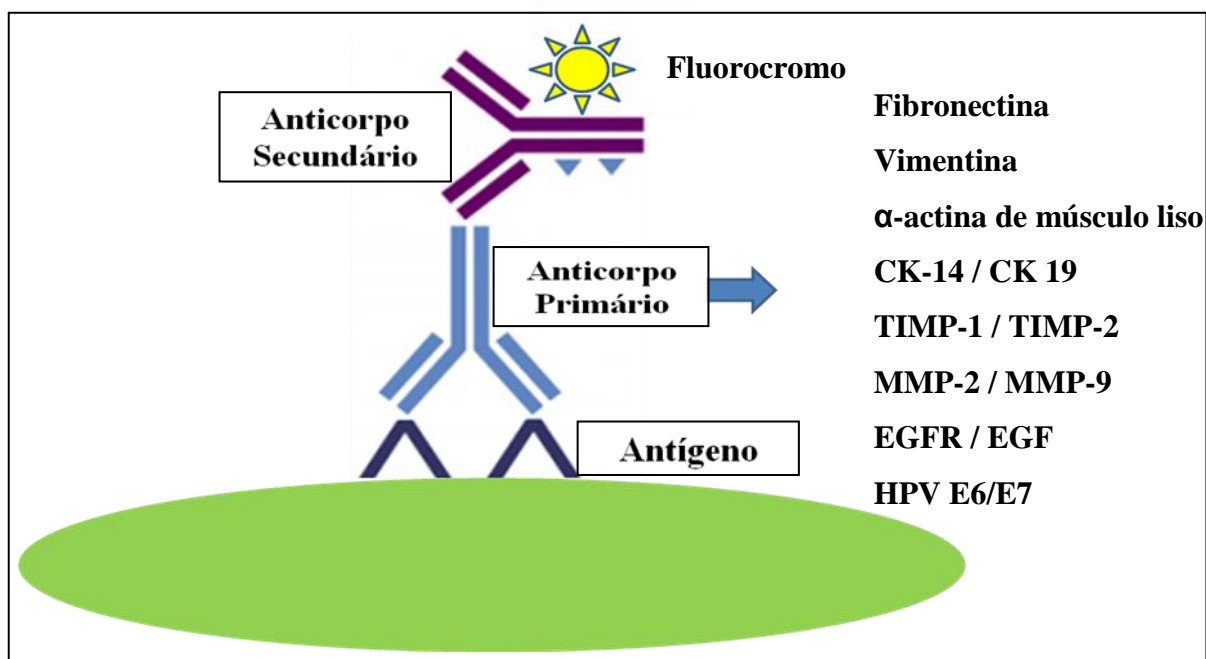
### 3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços e submetidas ao protocolo de imunofluorescência indireta para detectar a presença de anticorpos específicos. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas em paraformaldeído a 2% por 10min em temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas lavagens com PBS e permeabilização da membrana com solução de Triton X-100 (Sigma®) a 0,5% durante 5min. Posteriormente, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com 10% de soro de cabra em PBS/BSA a 1% (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) por 30min e então as células foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS/BSA a 1% e 10% de soro de cabra, durante 12 a 18h em câmara úmida a 4°C.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- Anti-Fibronectina, policlonal feito em coelho (1:200, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA);
- Anti-Vimentina, monoclonal feito em camundongo (1:100, Dako®);
- Anti- $\alpha$  actina de músculo liso, monoclonal mouse (1:100, Dako®);

- Anti-CK-14, monoclonal feito em camundongo (1:50, Millipore Inc, Bedford, MA, USA)
- Anti-CK 19, monoclonal feito em camundongo (1:50, DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA);
- Anti- TIMP-1, monoclonais feitos em camundongo (1:100, Dako®);
- Anti- TIMP-2, monoclonais feitos em camundongo (1:100, Dako®);
- Anti-MMP-2, monoclonal feito em camundongo (1:100, Millipore®)
- Anti-MMP-9, policlonal feito em coelho (1:100 Millipore®)
- Anti-EGFR, monoclonal feito em camundongo (1:100, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)
- Anti-EGF, policlonal feito em camundongo (1:100, Santa Cruz Biotechnology®)
- Anti-HPV E6/E7, monoclonal feito em camundongo (1:100, Abcam®).



**Figura 1** – Esquema do ensaio de imunofluorescência indireta.

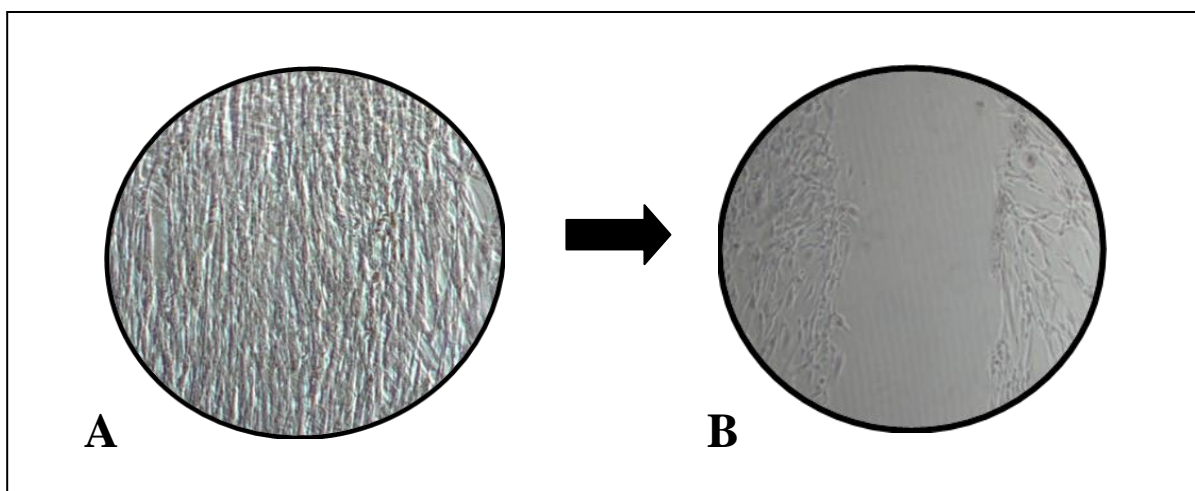
A revelação dos anticorpos primários foi realizada por meio dos anticorpos secundários conjugados ao fluorocromo Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 568 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) diluídos 1:1000 em PBS/BSA a 1% por 1h em temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse período, foram realizadas lavagens com PBS/BSA a 1% e Tween 20 (Amersham Biosciences, USA) a 0,5% para remover o excesso de marcação do anticorpo secundário. Os núcleos celulares foram marcados

com Hoechst 33258 (Sigma®). Por fim as lamínulas foram lavadas em água destilada, montadas com Prolong (Gibco®) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Scope A1, Zeiss), equipado com uma câmera fotográfica digital (AxioCam MRc, Zeiss).

Os controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por PBS/BSA a 1%.

### 3.6 ENSAIO DE “FERIDA” EM MONOCAMADA

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, na presença de meio DMEM-F12 com 10% de FBS, até alcançarem a confluência de monocamada. Com auxílio de ponteira de pipeta foi realizada uma descontinuidade desta monocamada criando uma área livre de células, “ferida” (Figura2).



**Figura 2** – Ensaio de ferida em monocamada. Confluência de monocamada da linhagem AME-HPV (A). Descontinuidade da monocamada, ferida (B).

As monocamadas com feridas foram lavadas com meio DMEM-F12 sem FBS para a remoção dos debris celulares e posteriormente incubadas com o polipeptídeo EGF (Sigma®) diluído em meio de cultivo sem FBS em diferentes concentrações (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL). O controle positivo foi realizado com incubação das células em meio contendo 10% de FBS e o controle negativo em meio sem FBS.

Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada poço da placa para localizar os campos correspondentes às áreas livres de células, dessa forma permitiu a aquisição de imagens de uma mesma área em diferentes intervalos de tempo, utilizando

máquina digital (AxioCam MRc, Zeiss®) acoplada ao microscópio invertido de contraste de fase (Axiovert 25C, Zeiss®).

O fechamento das feridas foi observado em 0, 12, 24, 48 e 72h. As áreas livres de células nos grupos tratados e controles foram calculados utilizando-se o software de domínio público ImageJ, desenvolvido por Wayne Rasband (NIMH, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

A taxa de migração foi avaliada como porcentagem da área livre de células em 0h, arbitrariamente marcada como 100%. Assim, o decréscimo percentual da área da ferida caracterizou o índice de migração celular. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM SISTEMA TRANSWELL

Para complementar os resultados obtidos no ensaio de ferida em monocamada, a migração foi avaliada utilizando sistema transwell (Millipore®), com membrana PET (do inglês *Polyethylene Terephthalate*) contendo poros de 8µm de diâmetro (Figura 3).



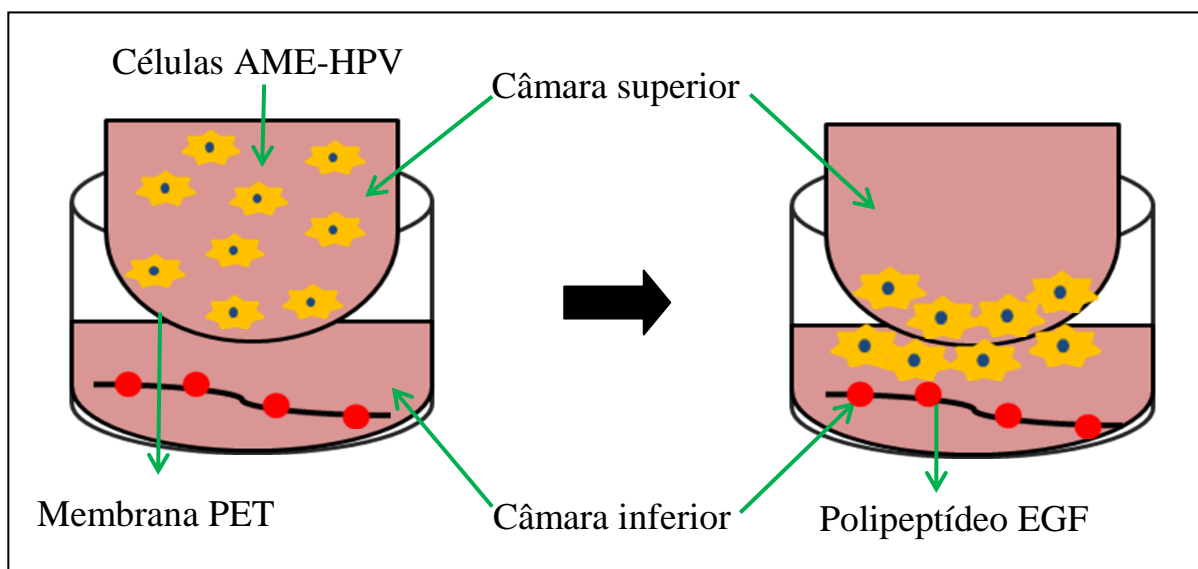
**Figura 3** – Sistema transwell de câmaras bipartites

As câmaras foram colocadas em placas de 24 poços e nestas foram adicionadas 100µL de meio sem FBS. As células foram removidas dos frascos de cultivo com solução de tripsina a 0,25% com 1mM de EDTA (Gibco®) durante 2min em temperatura ambiente. A tripsina foi inativada com meio DMEM-F12 completo, e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas (3000rpm durante 3min). Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso

em 1mL de meio sem FBS. As células foram contadas e  $25 \times 10^4$  células/mL foram semeadas em cada câmara. A placa de 24 poços foi incubada por 4h em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , para que ocorresse a adesão inicial das células.

Em seguida o polipeptídeo EGF foi diluído em meio sem soro em diferentes concentrações (10 ng/mL; 25 ng/mL; 50 ng/mL; 100ng/mL) e colocado nos poços da câmara inferior. Poços da câmara inferior preenchidos com meio sem FBS ou contendo 0,5% de FBS serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. A placa foi incubada por 24h em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após esse período de incubação, as células localizadas na face superior da membrana correspondem aquelas que não migraram e então foram delicadamente removidas com auxílio de um cotonete, restando assim somente aquelas que atravessaram os poros da membrana sendo então localizadas na face inferior da mesma. Essas células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em metanol a 20% (Figura 4).



**Figura 4** – Esquema de ensaio de migração utilizando o sistema de câmara bipartites do tipo transwell

A aquisição de imagens de sete campos para cada grupo experimental, utilizando câmera digital (Axiocam MRc, Zeiss®) que permitiu a contagem das células que migraram. Os ensaios foram realizados em triplicata.

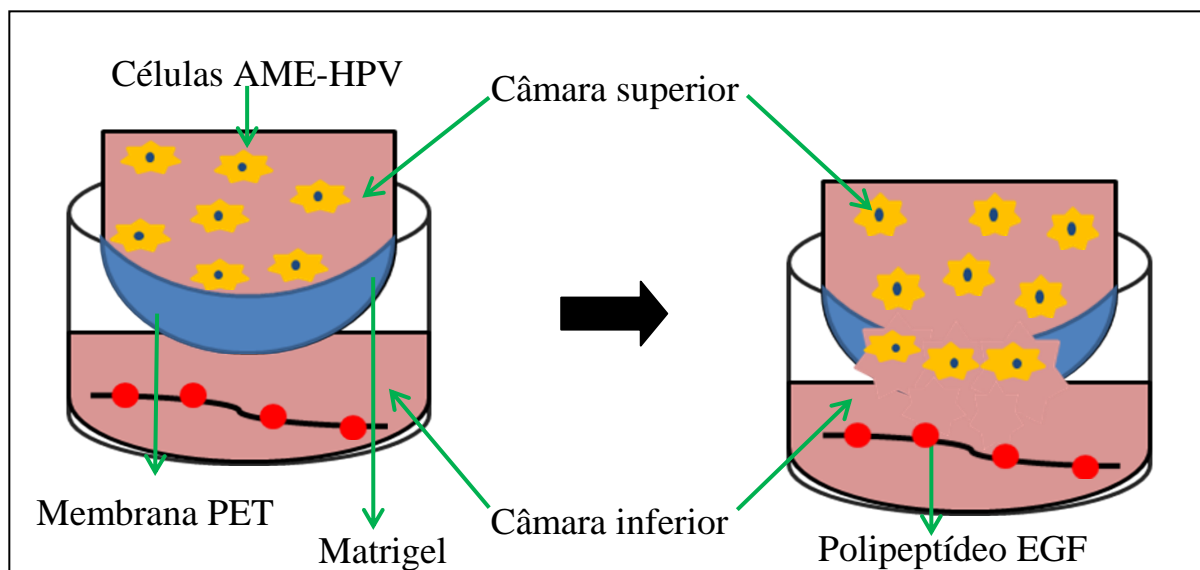
### 3.8 ENSAIO DE INVASÃO EM SISTEMA TRANSWELL

Para avaliar se o fator de crescimento EGF (Sigma®) induz fenótipo invasivo nas células AME-HPV foi empregado o mesmo sistema transwell (Millipore®), porém com a membrana do sistema coberta com matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

As câmaras foram colocadas em placa de 24 poços e nestas foram adicionadas 5µl de matrigel. A placa foi incubada por 30min em estufa a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram removidas dos frascos de cultivo com uma solução de tripsina a 0,25% com 1mM de EDTA (Gibco®), centrifugadas e o precipitado células foi ressuspensão em 1mL de meio sem FBS. As células foram contadas e 3x10<sup>5</sup> células/mL foram semeadas na parte superior de cada câmara sobre a membrana coberta por matrigel. A placa de 24 poços foi incubada por 4h em estufa a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, para que ocorresse a adesão inicial das células.

Em seguida o polipeptídeo EGF foi diluído em meio sem soro em diferentes concentrações (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL) e colocado nos poços da câmara inferior. Poços da câmara inferior preenchidos com meio sem FBS ou contendo 10% de FBS serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. A placa foi incubada por 72h em estufa a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, para que ocorresse a digestão do matrigel e invasão das células da câmara superior para a inferior.

Após esse período de incubação, as células localizadas na face superior da membrana correspondem aquelas que não invadiram e então foram delicadamente removidas com auxílio de um cotonete, restando assim somente aquelas que digeriram o matrigel e atravessaram os poros da membrana sendo então localizadas na face inferior da mesma. Essas células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em metanol a 20% (Figura 5).



**Figura 5** – Esquema de ensaio de invasão utilizando o sistema de câmara bipartite do tipo transwell

A aquisição de imagens de sete campos para cada grupo experimental, utilizando câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss®) que permitiu a contagem das células que migraram. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.9 ZIMOGRAFIA

O processo de digestão do matrigel no ensaio de invasão pode ser mediado por enzimas como MMPs. As células AME-HPV foram cultivadas em placas de 6 poços cobertas com concentrações crescentes de EGF (10ng/mL; 25ng/mL; 50ng/mL; 100ng/mL) diluídas em meio DMEM-F12 sem FBS durante 24h. Como controle as células foram cultivadas na ausência do fator de crescimento. Após 24h, as células foram lavadas com PBS e tiveram seu meio de cultivo substituído por meio DMEM-F12 sem FBS, sendo assim mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 24h.

Os meios condicionados das células tratadas com EGF foram coletados e centrifugados (12000rpm por 10min, a 4°C). O sobrenadante foi coletado em microconcentradores (Microcom 3000D, Millipore®) e centrifugado (10000rpm por 5min, a 4°C). Posteriormente, o sobrenadante foi concentrado e dialisado em PBS. As amostras foram homogeneizadas em uma solução contendo inibidores de proteases (Sigma®) e a quantificação de proteínas foi feita através do método BCA (Pierce Inc., Rockford, IL, USA).



Na sequência, as amostras de meio condicionado foram ressuspensas em tampão de amostra sem agente redutor e carregadas em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de gelatina. Foram carregados também 5µg de FBS como controle interno. A corrida eletroforética foi realizada em duas etapas: 90V para o gel “stacking” e 100V para o gel de corrida e a cuba foi mantida refrigerada para evitar que as proteínas se desnaturassem com o aquecimento.

Após eletroforese, o gel foi lavado 4 vezes em solução Renaturing Buffer 1x por 1h para remoção de SDS (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) e renaturação das proteínas. O gel foi incubado em estufa a 37°C em solução tampão revelador de gel Zymogram Developing Buffer 1x (Biogen Idec Inc., Cambridge, MA, USA) por 18h.

Os géis foram então corados com Comassie Brilliant Blue a 0,1% (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) e descorados em solução de metanol a 40% e ácido acético glacial a 10% em água destilada. Após essa etapa, as MMPs ativas foram identificadas no gel como bandas claras de lise em fundo azul.

As bandas de degradação enzimática obtidas na zimografia foram comparadas por densitometria do gel, utilizando-se o programa de domínio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os dados densitométricos obtidos foram normalizados e expressos como porcentagem da densitometria das bandas de FBS (controle interno). Os experimentos de zimografia foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

Controles negativos foram realizados para confirmar se bandas de lise eram resultado da ação de MMPs. Dois outros géis, contendo as mesmas amostras descritas anteriormente, foram incubados com tampão revelador contendo 0,5mM de EDTA (quelante de cálcio). Os quelantes inibem a ação das MMPs e, conseqüentemente, bloqueiam a formação das bandas de lise descritas.

### 3.10 RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA)

Para uma melhor compreensão do papel do EGFR nas atividades biológicas mediadas por EGF foram realizados ensaios utilizando células silenciadas com RNA de interferência (siRNA) para este receptor (SC-29301, Santa Cruz®).

Com este propósito, células desse estudo foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 50% de confluência. A seguir, meio de transfecção (Optimen, Gibco®), reagente de transfecção (Lipofectamina 2000, Gibco®) e siRNA para EGFR, em

diferentes concentrações (20nM, 30nM e 40nM), foram misturados e incubados a temperatura ambiente por 30min, de acordo com as instruções do fabricante. Como controle, outro grupo de células foi transfectado com as mesmas concentrações de siRNA de sequência “scrambled” (SC-37007), composição de propriedade da Santa Cruz®, que não induz degradação de qualquer mensagem celular.

Após o período de incubação, células transfectadas com siRNA para EGFR e “scrambled” (controle) foram colhidas das placas e submetidas à técnica de western blot, para observar se o tratamento com siRNA diminuiu a expressão desse receptor.

### 3.11 WESTERN BLOT

As células imortalizadas e as transfectadas com siRNA para EGFR foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 50% de confluência. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (Sigma®) por 5min no gelo.

Com auxílio de uma espátula, as células foram removidas da placa e a amostra foi recolhida em eppendorfs. Foi adicionado inibidor de protease (Sigma®) em cada eppendorf e as amostras foram centrifugadas (5000rpm durante 15min, a 4°C). O sobrenadante foi recolhido para outro eppendorf e a quantificação de proteínas foi realizada através do método BSA.

As amostras foram carregadas em gel SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) a 15% juntamente com tampão de amostra (dodecil sulfato de sódio a 3%, 150mM Tris (pH 6,8), mercaptoetanol a 15%, glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,01%). A corrida eletroforética foi realizada em 2 etapas: 90V para o gel “stacking” e 120V para o gel de corrida. Como padrão de peso molecular foi utilizado 4µL do Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) juntamente com 4µL de tampão de amostra.

Após eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – Amersham Biosciences, USA). Espumas, membrana e papéis absorventes foram embebidos em tampão de transferência e então montados no cassete na seguinte ordem: uma espuma, 2 pedaços de papel, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose, 2 pedaços de papel e uma espuma. As bolhas de ar foram retiradas, o cassete fechado e colocado na cuba de

eletroforese com tampão de transferência. A transferência foi realizada por 1h a 100V e a cuba foi mantida refrigerada devido a alta voltagem aplicada.

Na sequência, a membrana foi corada com 0,1% Ponceau por alguns minutos para verificar a presença de proteínas. Após lavagem com TTBS (do inglês *Tris Tween Buffered Saline*) para descorar a membrana, esta foi incubada por 30min com 5% de leite em pó desnatado diluído em TTBS. A solução foi descartada e permaneceu incubando durante a noite com o anticorpo primário diluído em TTBS a 4°C, sob agitação constante (Quadro 1).

**Quadro 1.** Anticorpos primários utilizados com respectivas diluições.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-p-53, monoclonal feito em coelho	1:500	Leica Biosystems
Anti-EGFR, monoclonal feito em coelho	1:1000	Spring Bioscience®

Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS por 5min e o anticorpo secundário diluído em TTBS foi incubado por no máximo 1h, em temperatura ambiente e agitação constante. Transcorrido esse tempo, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS durante 15min. Para a revelação, foi utilizado o kit Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare Life Sciences, EUA), o qual emite quimioluminescência permitindo que a reação seja analisada em filmes radiográficos.

Para avaliar se após o silenciamento do EGFR as células AME-HPV tiveram a expressão de MMPs reduzida, as membranas foram “stripped” com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) e submetidas à nova marcação com anticorpos para MMPs (Quadro 2).

**Quadro 2.** Anticorpos primários utilizados com respectivas diluições.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-MMP-2, policlonal feito em coelho	1:1000	Millipore®
Anti-MMP-9, policlonal feito em coelho	1:1000	Millipore®

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar diferenças entre três ou mais grupos com amostras

independentes, variável contínua e distribuição anormal. Diferenças entre três ou mais grupos foi estimada através de análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

**ANEXO 1 – PARECER COMITÊ DE ÉTICA**

Universidade Federal do Pará

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Carta Provisória: 158/10 CEP-ICS/UFPA

Belém, 19 de novembro de 2010.

Profº. Dr. Sérgio de Melo Alves Jr.

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa " **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE AMELOBLASTOMA. ESTUDO IN VITRO DA MODULAÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ POR FATORES DE CRESCIMENTO**" de CAAE 0091.0.073.000-10 e parecer nº 131/10 - CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 13 de Outubro de 2010.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 30 de outubro de 2012, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.  
Coordenador do CEP-ICS/UFPA