



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

**Inter-relação entre MMP-9 e metalotioneína: um possível fator de
invasividade local no Adenoma Pleomórfico**

BELÉM-PA

2016

LARA CAROLINA D'ARAÚJO PINTO

**INTER-RELAÇÃO ENTRE MMP-9 E METALOTIONEÍNA: UM
POSSÍVEL FATOR DE INVASIVIDADE LOCAL NO ADENOMA
PLEOMÓRFICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

BELÉM-PA

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à **Mama** e ao **Papi** que são a minha fonte de inspiração; à minha **Vozinha Petita** que sempre será meu maior exemplo de amor; aos meus irmãos **Yuri**, **Louise** e **Antônio**, ao meu padrasto **Francisco**, à minha sobrinha **Thalia**, à minha **Avó Carmen**, às minhas madrinhas **Bebé** e **Amada**, ao meu namorado **Maurilio** e aos meus familiares por seu amor, apoio, incentivo e por serem os alicerces da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por guiar meus passos e tomar posse da minha vida nos momentos de dúvidas e incertezas, sempre iluminando meu caminho e me dando forças para avançar. À **Nossa Senhora de Nazaré** por sempre interceder por minhas causas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro** pela dedicação e solicitude dispensadas na orientação desse e de muitos outros trabalhos. Obrigada por ser um excelente orientador e um excepcional amigo. À **Prof^ª. Dra. Maria Sueli da Silva Kataoka** por seu constante apoio e sua imprescindível colaboração na elaboração dessa dissertação.

Aos amigos **João Aquime** e **Raíssa Mendonça** pelo companheirismo, por sempre me apoiarem e ajudarem mesmo à distância. Aos companheiros de mestrado com os quais pude compartilhar as alegrias e as aflições dessa jornada: **Malu, Artur, Walessa** e **Moema**. À família do **Laboratório de Cultivo Celular** pelo apoio cotidiano e pela alegria diária: **João, Raíssa, Eduardo, Geovanni, Amanda, Stelio, Thaianna, Malu, Caio, Adrianly, Carol, Aline** e **Joyce**.

“A sabedoria inspira a vida aos seus filhos, ela toma sob a sua proteção aqueles que a procuram; ela os precede no caminho da justiça”

(Eclesiástico 4,12)

SUMÁRIO

1	Capítulo 1: Inter-relação entre MMP-9 e metalotioneína: um possível fator de invasividade local no Adenoma Pleomórfico	7
1.1	Folha de rosto	7
1.2	Resumo	7
1.3	Introdução	8
1.4	Material e métodos	8
1.5	Resultados	9
1.6	Discussão	10
1.7	Referências	12
1.8	Legendas	15
1.9	Tabela	16
2	Capítulo 2: Pleomorphic adenoma: A possible local invasiveness due to a cross-talk among MMP-9 and metallothionein	17
2.1	Manuscript draft	17
2.2	Title page	19
2.3	Abstract	21
2.4	Introduction	22
2.5	Material and methods	22
2.6	Results	24
2.7	Discussion	24
2.8	Acknowledgements, compliance with ethical standards, ethical approval	27
2.9	References	28
2.10	Legends	30
2.11	Table	31
3	Figuras	32
3.1	Figura 1	32
3.2	Figura 2	33
3.3	Figura 3	34
3.4	Figura 4	35

Inter-relação entre MMP-9 e metalotioneína: um possível fator de invasividade local no Adenoma Pleomórfico

Lara Carolina D'Araújo Pinto^{†*}, Natacha Malu Miranda da Costa^{†*}, Walessa Brasil da Silva^{*}, André Luis Ribeiro Ribeiro^{**}, Maria Sueli da Silva Kataoka^{***}, Sérgio de Melo Alves-Junior^{***}, João de Jesus Viana Pinheiro^{***}

† Autores contribuíram igualmente para esse trabalho

* Discente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPA

** Mestre em Odontologia pela UFPA e doutorando no College of London

*** Doutor e docente da UFPA

Email: lara.krol@gmail.com; natacha_malu@hotmail.com; waleessabrazil@hotmail.com; ribeiroalr@hotmail.com; skataoka@ufpa.br; sergiomalves@gmail.com; radface@hotmail.com.

Resumo:

Introdução: O Adenoma Pleomórfico (AP) é a neoplasia mais prevalente nas glândulas salivares. O AP desperta grande interesse devido a sua alta frequência e a invasividade local. Proteínas como metaloproteinases da matriz-2 (MMP-2), -9 (MMP-9) e metalotioneína (MT) estão relacionadas com a invasividade local em alguns tumores, entretanto, não há estudos correlacionando a expressão das mesmas no AP.

Objetivos: Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de MMP-2, MMP-9 e de MT, assim como uma possível correlação entre essas proteínas, para melhor delineamento dos seus papéis no comportamento do AP e de planos de tratamento.

Material e métodos: A técnica da imunohistoquímica foi realizada em 20 amostras de AP e 7 amostras de glândulas salivares (GS) como grupo controle. A avaliação da imunomarcagem foi realizada pela quantificação da fração de área marcada, usando o software ImageJ.

Resultados: As amostras de AP apresentaram elevada imunoexpressão de MMP-2, MMP-9 e MT quando comparadas às amostras controle de GS. Ao correlacionarmos a expressão das proteínas, houve correlação das MMPs entre si e entre MT e MMP-9. **Conclusão:** Logo, sugere-se que MMP-2, MMP-9 e a MT podem participar nos mecanismos de invasividade do AP.

Relevância clínica: Sabe-se que o AP é um tumor de glândula salivar com elevadas taxas de recorrência, com alta expressão de MMP-2, MMP-9 e com correlação entre a expressão dessas MMPs entre si e entre MMP-9 e MT. Portanto, pode-se sugerir essas proteínas como moléculas alvo no tratamento dessa neoplasia, justificado por seu possível papel no comportamento clínico desse tumor.

Palavras-chave:

Metaloproteinase da matriz 2, Metaloproteinase da matriz 9, Metalotioneína, Neoplasias das Glândulas Salivares, Adenoma pleomorfo.

INTRODUÇÃO

O Adenoma Pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais prevalente em glândulas salivares. Biologicamente, apresenta baixo índice de proliferação celular, refletindo clinicamente em crescimento lento e assintomático, porém apresenta comportamento localmente invasivo [1]. Devido à sua alta frequência e sua invasividade local, o AP desperta grande interesse. Embora ainda não esteja estabelecido se as variabilidades histológicas do AP estão relacionadas ao seu comportamento invasivo e à sua taxa proliferativa, alguns estudos mostram que os tumores ricos em estroma apresentam crescimento celular significativamente maior em comparação a tumores pobres em matriz extracelular [2-7].

A degradação da matriz extracelular (MEC) é um processo essencial para a progressão tumoral e invasão dos tecidos adjacentes. Evidências sustentam a teoria de que proteinases extracelulares, tais como as metaloproteinases (MMPs), medeiam muitas das alterações no microambiente celular durante a progressão tumoral [8, 9]. Estas enzimas regulam uma variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização. Portanto, representam um dos principais mediadores na comunicação molecular entre o parênquima e o estroma tumoral.

Existem dois tipos de MMPs do grupo das gelatinases, as metaloproteinases -2 e -9 (MMP-2 e MMP-9), que são responsáveis pela proteólise do principal componente da MEC, o colágeno, em especial o tipo IV [10]. Estas degradam a membrana basal, criando um ambiente propício à invasão tumoral [11, 12]. Além disso, as MMPs são endopeptidases zinco-dependentes. Por outro lado, o zinco é um metal essencial para o funcionamento celular e sua regulação é feita pela metalotioneína (MT) [13].

A MT está presente intracelularmente, exercendo funções em muitos processos fisiológicos, e possivelmente está relacionada com a diferenciação das glândulas salivares humanas [14]. Embora a MT esteja expressa em células não neoplásicas, o aumento de sua expressão tem sido associado ao comportamento biológico de algumas neoplasias, como tumores salivares benignos e malignos, incluindo o AP [14-17]. Apesar disso, sua função ainda não foi completamente estabelecida nos tumores de glândulas salivares.

Alguns estudos têm mostrado uma correlação positiva entre a expressão de MMPs e MT [18-20]. Embora pesquisas mostrem a presença de MMP-2, MMP-9 [7] e MT [15] no AP, não há estudos correlacionando a expressão dos mesmos nesta neoplasia. Mediante esses achados, pretende-se nesta investigação verificar a expressão de MMP-2, MMP-9 e MT, assim como, a correlação entre essas proteínas para melhor compreender seus papéis no comportamento do AP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Vinte (20) casos de AP foram recuperados dos arquivos do Departamento de Patologia oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará (Belém-PA, Brasil). Sete (7) casos de glândula salivar normal (GS) foram incluídos como controle. Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Parecer nº 358.227)

Imunohistoquímica

Foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, que foram montados em lâminas tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma Chemical Corp, St. Louis, MO, EUA). Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em sequência decrescente de etanol. As lâminas foram então imersas em solução de H₂O₂ a 3% e metanol, na proporção de 1:1, durante 20 minutos, para inibição da atividade da peroxidase endógena. Após esta etapa, a recuperação antigênica foi efetuada em tampão citrato (pH 6,0) em câmara Pascal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 segundos. Ligações inespecíficas dos anticorpos foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA, Sigma®) a 1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 hora. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-MMP-2 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany - diluição 1:50) anti-MMP-9 (Merck Millipore® – diluição 1:50) e anti-MT (clone E9, Dako® – diluição 1:100). Posteriormente, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o sistema de detecção EnVision Plus (Dako®). Diaminobenzidina (Dako®) foi utilizada como cromógeno e, em seguida, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer (Sigma®) e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA). A substituição dos anticorpos primários por soro não imune de coelho ou camundongo foi utilizada como controle negativo (dados não mostrados).

Avaliação das marcações imunohistoquímicas

Imagens de campo claro de pelo menos cinco áreas de cada amostra, aleatoriamente selecionadas, foram obtidas utilizando microscópio Axio Scope A1 equipado com uma câmera CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com objetiva de 40x.

Para quantificar a imunomarcação das proteínas utilizou-se o software de domínio público ImageJ (NIMH, NIH, Bethesda, MD, EUA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). As áreas coradas com diaminobenzidina foram segmentadas pelo plug-in “color deconvolution” (desenvolvido por Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>). Após a segmenta o das imagens, as áreas marcadas nas células de AP e GS foram avaliadas e expressas em porcentagem da área total. Diferenças entre as áreas marcadas no AP e na GS também foram analisadas.

Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças entre as áreas marcadas no AP e na GS foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney. O teste de correla o de Spearman foi realizado para revelar possíveis correla es entre a expressão de MMP-2, MMP-9 e MT nas amostras de AP.

RESULTADOS

As amostras de AP expressaram MMP-2, MMP-9 e MT

Todas as amostras de AP revelaram a expressão de MMP-2, MMP-9 e MT. A marca o de MMP-2 apresentou aspecto puntiforme e homog neo localizada predominantemente no citoplasma do epitélio

neoplásico, sobretudo nos lençóis celulares de células tumorais (Figura 1A). Foi observada marcação nas células mioepiteliais em torno das células ductais (Figura 1B) e áreas de metaplasia escamosa (Figura 1C). As células estromais expressaram MMP-2 ocasionalmente (Figura 1D). As células das áreas condroides apresentaram marcação nuclear (Figura 1E). As amostras de GS exibiram marcação fraca, predominantemente no estroma (Figura 1F).

Em relação à MMP-9, a marcação citoplasmática foi intensa e puntiforme nas células epiteliais (Figura 2A), mioepiteliais e ductais (Figura 2B). As células em torno de áreas de metaplasia escamosa apresentaram marcação fraca (Figura 2C). As células estromais expressaram MMP-9 ocasionalmente (Figura 2D). As células das áreas condroides não apresentaram marcação (Figura 2E). As amostras de GS exibiram marcação fraca, predominantemente no estroma (Figura 2F).

A MT revelou marcação citoplasmática granular nos lençóis celulares (Figura 3A) e intensa marcação nuclear nas células mioepiteliais (Figura 3B). Nas áreas ductiformes (Figura 3C) e nas áreas de metaplasia escamosa (Figura 3D), a marcação nuclear e citoplasmática das células mioepiteliais foi intensa. As células das áreas condroides apresentaram fraca expressão citoplasmática de MT (Figura 3E). As amostras de GS exibiram marcação nas células ductais e mioepiteliais (Figura 3F).

As amostras de AP apresentaram maior expressão de MMPs quando comparadas às de glândula salivar normal

A análise estatística revelou diferença significativa de imunexpressão das proteínas MMP-2 ($p < 0.05$) e MMP-9 ($p < 0.01$) no AP em comparação ao grupo controle (Figura 4A e 4B). No AP, as áreas marcadas com MMP-2 e MMP-9 foram significativamente maiores quando comparadas às de glândula salivar.

As amostras de AP apresentaram correlação entre a expressão de MMPs e MT

Em relação à MT, esta não apresentou diferença entre as áreas marcadas nas amostras de AP e GS ($p = 0.1583$). O teste de correlação de Spearman (Tabela 1) evidenciou uma correlação positiva entre MMP-9 e MT ($p = 0.0443$), assim como entre as MMPs.

DISCUSSÃO

O AP é um tumor benigno de crescimento lento, que pode apresentar um comportamento localmente invasivo [5]. A capacidade invasiva de um tumor requer, dentre outros fatores, a degradação da MEC, e desta maneira as células tumorais invadem o tecido normal subjacente [7, 19, 21]. As MMPs -2 e -9 são gelatinases que quando presentes em tumores têm como papel a degradação do colágeno IV, colágeno V, laminina, elastina e proteoglicanas na MEC e na membrana basal [8, 9, 19, 22-26]. Adicionalmente, a expressão dessas MMPs em tumores invasivos é elevada quando comparada a tumores não invasivos [26]. Nesse estudo, a expressão de MMP-2 e MMP-9 no AP foi elevada quando comparada ao tecido glandular normal, sugerindo que essas proteases podem estar envolvidas no processo de invasividade local desse tumor.

A análise imunohistoquímica da expressão da MMP-2 e MMP-9 nas amostras apresentou imunopositividade em sua maior parte no parênquima tumoral e reduzida imunexpressão no estroma. Na literatura tem sido claramente estabelecido que a baixa expressão de MMPs no estroma está diretamente relacionada ao comportamento das neoplasias benignas [27]. Por outro lado, a alta expressão de MMPs encontrada no parênquima tumoral do AP justifica a agressividade local desta neoplasia.

A imunomarcação nuclear foi detectada na MMP-2 e na MT. A MT é expressa no núcleo provavelmente devido à necessidade de doação de zinco para fatores de transcrição, como o p53 e outros [15]. A presença de MMP-2 no núcleo pode estar relacionada à remodelação estrutural do núcleo, à degradação de

proteínas nucleares, como fatores de transcrição, proteínas do processamento do RNA e ribonucleoproteínas, ou a outras funções ainda não determinadas [28].

As MMPs-2 e -9 têm sido relacionadas como promotoras da invasão celular em tumores oriundos de mama, colo do útero, próstata, cérebro e glândulas salivares, dentre outros [5, 23]. A MMP-2 é capaz de degradar fibronectina, laminina e colágeno do tipo VII e XI, além dos substratos que também são degradados por ambas MMPs descritos previamente [23-25]. Portanto, é nítido que há semelhança no mecanismo de ação das gelatinases, justificando, possivelmente a correlação positiva encontrada entre a expressão destas MMPs. Entretanto, embora essas MMPs apresentem ações semelhantes, suas contribuições para os processos biológicos ou patológicos podem ser ligeiramente distintas.

Nossos resultados, embora apresentem uma expressão significativamente maior de MMP-2 e -9 no AP quando comparadas à GS, mostraram que a expressão de MMP-9 nesse tumor foi maior que a expressão de MMP-2. Nagel et al. (2004) [6] encontraram resultados semelhantes, ao avaliar a imunexpressão das MMPs em tumores benignos, dentre eles o AP, e malignos de glândula salivar. Estes autores observaram que houve diferença significativa na expressão de MMP-2 em tumores malignos quando comparados aos benignos, enquanto que a expressão de MMP-9 se apresentou elevada em ambos os tipos de tumores, não apresentando diferença significativa [6].

Neste estudo, os achados revelaram correlação positiva entre MMP-9 e MT, bem como no estudo realizado por Kim et al (2011) [19], o qual afirma que a MT regula positivamente a MMP-9, através da ativação da via de sinalização de AP-1 e NF- κ B. Esses dois fatores de transcrição desempenham importante papel em diversas atividades celulares, como a morte, o crescimento e a migração celular, bem como regulam a transcrição de inúmeros genes e expressão de proteínas, como a MT e a MMP-9 [20, 29, 30]. Portanto, MT e MMP-9 compartilham os mesmos reguladores de expressão, AP-1 e NF- κ B, possivelmente por esta razão apresentaram correlação positiva neste estudo.

Outra possível hipótese para explicar a correlação positiva entre MMP-9 e MT encontrada neste estudo reside no fato das MMPs serem endopeptidases zinco-dependentes responsáveis pela degradação da MEC, através, principalmente, da proteólise do colágeno [10, 11], e o zinco, metal essencial para o metabolismo celular ser regulado pela MT [12]. Portanto, a MT pode ser a principal responsável pela regulação da atividade das MMPs, através do fornecimento de zinco para as mesmas [31, 32].

Segundo evidências reportadas no estudo de Viana et al. (2013) [15], a expressão de MT foi reduzida em GS comparada com o AP, provavelmente porque apenas células ductais apresentavam-se marcadas, enquanto que as células acinares não apresentaram marcação, e assim influenciaram o baixo índice de expressão de MT em GS [15]. Enquanto que, o resultado do presente estudo não revelou diferença significativa entre a marcação de MT no AP e em GS, provavelmente devido ao fato da MT estar presente constitutivamente na GS normal. Estudos confirmam que a MT é responsável por inúmeros processos fisiológicos, dentre eles a diferenciação das glândulas salivares humanas [14], estando expressa em células não neoplásicas [14-16]. Além disso, outros autores afirmam que tumores de GS e GS normal apresentam o mesmo padrão de imunomarcção nuclear intensa de células mioepiteliais, as quais circundam ductos intercalados [15], concordando com os achados imunohistoquímicos deste estudo.

Diante dos resultados obtidos, verificamos que o AP apresentou elevada imunexpressão de MMP-2, MMP-9 e também expressou MT. Ao correlacionarmos a expressão das proteínas, houve correlação positiva das MMPs entre si e da MT com a MMP-9. Logo, sugerimos que a MMP-2 e a MMP-9 participam ativamente dos mecanismos de invasividade do AP. A correlação positiva com a MMP-9 indica que a MT pode ter um papel importante no armazenamento e fornecimento de zinco para que esta endopeptidase possa exercer sua atividade proteolítica.

REFERÊNCIAS

1. Alves FA, Perez DE, Almeida OP, Lopes MA and Kowalski LP (2002) Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128:1400-3.
2. Kazanceva A, Groma V, Smane L, Kornevs E and Teibe U (2011) Proliferative potential in benign mixed salivary gland tumors and its value in primary and recurrent neoplasms. *Stomatologija* 13:35-41.
3. Brazao-Silva MT, Cardoso SV, de Faria PR, Dias FL, Lima RA, Eisenberg AL, Nascimento MF and Loyola AM (2013) Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a clinicopathological study of 49 cases and of metallothionein expression with regard to tumour behaviour. *Histopathology* 63:802-9. doi: 10.1111/his.12227
4. Velickovic LJ, Dimov I, Petrovic D, Stojnev S, Dacic S, Velickovic S and Stefanovic V (2013) Stromal reaction and prognosis in acinic cell carcinoma of the salivary gland. *Vojnosanit Pregl* 70:1155-8.
5. Falcão ASC, Kataoka MSS, Ribeiro NAB, Diniz JA Jr, Alves SM Jr, Ribeiro ALR, de Siqueira AS, da Silva AL, Ramos RTJ, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJV (2014) A Novel Cell Line Derived from Pleomorphic Adenoma Expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and Shows Numeric Chromosomal Anomalies. *PLoS One* 19;9(8) e105231 doi: 10.1371/journal.pone.0105231
6. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A and Hemmerlein B (2004) Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1,-2, and-3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 44:222-231.
7. Zhang X, Wang Y, Yamamoto G and Tachikawa T (2009) Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology* 55:250-260.
8. Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141:52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
9. Rodríguez D, Morrison CJ and Overall CM (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1803:39-54.
10. Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A and Cowled PA (2002) Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23:260-9. doi: 10.1053/ejvs.2002.1598
11. Nita M, Strzalka-Mrozik B, Grzybowski A, Mazurek U and Romaniuk W (2014) Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. *Med Sci Monit* 20:1003-16. doi: 10.12659/MSM.889887
12. Nascimento CF, de Siqueira AS, Pinheiro JJ, Freitas VM and Jaeger RG (2011) Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 317:2562-2572. doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.022
13. Xue M, McKelvey K, Shen K, Minhas N, March L, Park S-Y and Jackson CJ (2014) Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology (Oxford)* 53:2270-2279. Cherian MG, Jayasurya A and Bay BH (2003) Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 533:201-9.
14. Hecht D, Jung D, Prabhu VV, Munson PJ, Hoffman MP and Kleinman HK (2002) Metallothionein promotes laminin-1-induced acinar differentiation in vitro and reduces tumor growth in vivo. *Cancer Res* 62:5370-4.

15. Viana AdCM, Ribeiro DC, Florêncio TNG, Santos VT, Sousa AA and Aguiar MCF (2013) Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: A role in the control of apoptosis? *Acta Histochem* 115:564-568.
16. Alves SM, Cardoso SV, de Fatima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Vieira do Carmo MA and Ferreira Aguiar MC (2007) Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 43:252-6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.03.012
17. Ribeiro ALR, Alves JR SM, Marques YM FS , Pinheiro J JV , Pinto JR DS (2015) Expression of metallothionein in pleomorphic adenoma. *Internat J of Clinical Dentistry* 8:21-9
18. Tomita T (2000) Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms. *Mod Pathol* 13:389-95. doi: 10.1038/modpathol.3880064
19. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH and Jeong HG (2011) Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Lett* 585:421-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.030
20. Ryu HH, Jung S, Jung TY, Moon KS, Kim IY, Jeong YI, Jin SG, Pei J, Wen M and Jang WY (2012) Role of metallothionein 1E in the migration and invasion of human glioma cell lines. *Int J Oncol* 41:1305-13. doi: 10.3892/ijco.2012.1570
21. Xu X, Wang Y, Chen Z, Sternlicht MD, Hidalgo M and Steffensen B (2005) Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res* 65:130-136.
22. Egeblad M and Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161-74. doi: 10.1038/nrc745
23. Brehmer B, Biesterfeld S and Jakse G (2003) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and-9) and their inhibitors (TIMP-1 and-2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6:217-222.
24. Freitas VM, Vilas-Boas VF, Pimenta DC, Loureiro V, Juliano MA, Carvalho MR, Pinheiro JJ, Camargo AC, Moriscot AS, Hoffman MP and Jaeger RG (2007) SIKVAV, a laminin α 1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. *Am J Pathol* 171:124-138. DOI: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.051264>
25. Nascimento CF, de Siqueira AS, Pinheiro JJ, Freitas VM and Jaeger RG (2011) Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 317:2562-2572. doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.022
26. Piao S, Zhao S, Guo F, Xue J, Yao G, Wei Z, Huang Q, Sun Y and Zhang B (2012) Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:627-635.
27. Wernert N (1997) The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 430:433-43.
28. Sinha SK, Asotra K, Uzui H, Nagwani S, Mishra V and Rajavashisth TB (2014) Nuclear localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. *Am J Transl Res* 6:155.
29. Pan M-H, Chiou Y-S, Chen W-J, Wang J-M, Badmaev V and Ho C-T (2009) Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30:1234-1242.
30. Li W, Li H, Bocking AD and Challis JR (2010) Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway. *Biol Reprod* 83:481-487.
31. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A and Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.

32. Kerkela E and Saarialho-Kere U (2003) Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 12:109-25.

LEGENDAS

Fig. 1: Imunomarcção de MMP-2 no AP e na GS. Imunomarcção citoplasmática foi observada nas células neoplásicas (A). Marcação nas células mioepiteliais ductais (B) e em torno de áreas de metaplasia escamosa (C). Células ductais (D). Aparência condroide do tumor (E) Imunomarcção em GS localizada exclusivamente no estroma glandular (F). Escala 20µm.

Fig.2: Imunomarcção de MMP-9 no AP e na GS. (A) Imunomarcção intensa localizada no citoplasma celular (A). Marcação nas células mioepiteliais e ductais (B). Metaplasia escamosa (C). Marcação ocasional no estroma (D). Aspecto condroide do estroma tumoral (E). Imunomarcção em GS localizada exclusivamente no estroma glandular (F). Escala 20µm.

Fig 3: Imunomarcção da MT no AP e na GS. Imunomarcção citoplasmática (A) e nuclear (B) foi observada nas células neoplásicas. Intensa marcação das células mioepiteliais nos ductos (C) e nas áreas de metaplasia escamosa (D). Aspecto condroide do estroma tumoral (E). Imunomarcção em GS localizada no núcleo e no citoplasma das células ductais (seta). Escala 20µm.

Fig.4: Comparação da imunoexpressão de MMP-2, MMP-9 e MT entre AP e GS. Significância estatística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

TABELA

Tabela 1. Valor de p relacionado à imunomarcação de MMP-2, MMP-9 e MT, no AP utilizando o teste de Spearman.

Protein 1	Protein 2	Spearman r	p value
MMP-2	MT	0.2495	0.1534
MMP-9	MT	0.4541	0.0443*
MMP-9	MMP-2	0.4677	0.0376*

Abreviações: MMP, matriz metaloproteinase; MT, metalotioneína. Asterisco (*) indica correlação significativa.

Clinical Oral Investigations

Pleomorphic adenoma: A possible local invasiveness due to a cross-talk among MMP-9 and metallothionein

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CLOI-D-15-00719
Full Title:	Pleomorphic adenoma: A possible local invasiveness due to a cross-talk among MMP-9 and metallothionein
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	João de Jesus Viana Pinheiro, Ph.D Universidade Federal do Para Belém, Pará BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Para
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Lara Carolina D'Araújo Pinto, DDS/ Natacha Malu Miranda da Costa, DDS
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Lara Carolina D'Araújo Pinto, DDS Natacha Malu Miranda da Costa, DDS Walessa Brasil da Silva, DDS Anna Tereza O. Góes Siqueira Campos Lima, DDS, MSc André Luis Ribeiro Ribeiro, DDS, MSc Maria Sueli da Silva Kataoka, DDS, MSc, PhD Sérgio de Melo Alves Júnior, DDS, MSc, PhD João de Jesus Viana Pinheiro, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Objectives: Pleomorphic adenoma (PA) is the most common neoplasm of the salivary glands. The main characteristics of PA are its high frequency and local invasiveness. The metalloproteinase-2 (MMP-2), -9 (MMP-9) and metallothionein (MT) are strongly associated to numerous tumors local invasiveness, however there are no scientific reports about the correlation between their expression in PA. Therefore, the aim of this study was to investigate the expression of MMP-2, MMP-9, and MT, and verifying the possible correlation between their expression and the PA local invasiveness in order to draw new treatment plans and achieve satisfactory prognosis.</p> <p>Materials and methods: The immunohistochemistry was performed in 20 PA and 07 salivary gland samples (SG - control group). The immunostaining was evaluated by quantification of the stained area using ImageJ software.</p> <p>Results: The PA samples shows a high immunoexpression of MMP-2, -9 and MT compared to the control samples. The statistical analysis reveal a correlation among the MMPs, and between the MT and MMP-9 expressions.</p> <p>Conclusions: Therefore, it is inferred that the MMP-2, MMP-9, and MT may participate in the regulation mechanisms of PA local invasiveness.</p> <p>Clinical Relevance: Knowing that PA is a salivary gland tumor with significant rates of recurrence, high expression of MMP2, -9, and correlation of MMP2 and -9, MMP9 and MT can suggest this molecules a target in treatment of this neoplasm justified by their possible role in clinical behavior of this tumor.</p>

Suggested Reviewers:	<p>Fabrcio Bitu, DDS, MSc, PhD Associate professor, Universidade Federal do Ceará fbitu@hotmail.com Professor Fabricio Bitu is oral pathologist with extensive experience, having published important articles in the field.</p>
	<p>Ricardo Alves de Mesquita, DDS, MSc, PhD Associate professor, Universidade Federal de Minas Gerais ramesquita@ufmg.br Professor Ricardo Mesquita is oral pathologist with extensive experience, having published important articles in this field.</p>

Manuscript

Click here to download Manuscript: Pleomorphic adenoma A possible local invasiveness due to a cross-talk among MMP-9 and metal
Click here to view linked References

Pleomorphic adenoma: A possible local invasiveness due to a cross-talk among MMP-9 and metallothionein

Authors:

Lara Carolina D'Araújo Pinto[†]

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal
University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110,
Brazil. lara.krol@gmail.com

Natacha Malu Miranda da Costa[†]

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal
University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110,
Brazil. natacha_malu@hotmail.com

Walesa Brasil da Silva

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal
University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110,
Brazil. walexabrasil@hotmail.com

Anna Tereza O. Góes Siqueira Campos Lima

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal
University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110,
Brazil. annatcampos_odonto@yahoo.com.br

André Luis Ribeiro Ribeiro

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal
University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110,
Brazil. ribeiroalr@hotmail.com

Maria Sueli da Silva Kataoka

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110, Brazil. skataoka@ufpa.br

Sérgio de Melo Alves Júnior

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110, Brazil. sergiomalves@gmail.com

João de Jesus Viana Pinheiro

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. 01 Augusto Corrêa Ave, Belém, PA, 66075-110, Brazil. radface@hotmail.com

† Authors contributed equally to this work

Adress:

Universidade Federal do Pará

Instituto de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

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

Phone number: 55-91-32017563

Fax number: 55-91-32017563

E-mail: joaopinheiro@ufpa.br

Short running title:

Pleomorphic adenoma express MT and MMPs

Abstract:

Objectives: Pleomorphic adenoma (PA) is the most common neoplasm of the salivary glands. The main characteristics of PA are its high frequency and local invasiveness. The metalloproteinase-2 (MMP-2), -9 (MMP-9) and metallothionein (MT) are strongly associated to numerous tumors local invasiveness, however there are no scientific reports about the correlation between their expression in PA. Therefore, the aim of this study was to investigate the expression of MMP-2, MMP-9, and MT, and verifying the possible correlation between their expression and the PA local invasiveness in order to draw new treatment plans and achieve satisfactory prognosis.

Materials and methods: The immunohistochemistry was performed in 20 PA and 07 salivary gland samples (SG – control group). The immunostaining was evaluated by quantification of the stained area using ImageJ software.

Results: The PA samples shows a high immunoexpression of MMP-2, -9 and MT compared to the control samples. The statistical analysis reveal a correlation among the MMPs, and between the MT and MMP-9 expressions.

Conclusions: Therefore, it is inferred that the MMP-2, MMP-9, and MT may participate in the regulation mechanisms of PA local invasiveness.

Clinical Relevance: Knowing that PA is a salivary gland tumor with significant rates of recurrence, high expression of MMP2, -9, and correlation of MMP2 and -9, MMP9 and MT can suggest this molecules a target in treatment of this neoplasm justified by their possible role in clinical behavior of this tumor.

Keywords:

Matrix Metalloproteinase 2, Matrix Metalloproteinase 9, Metallothionein, Salivary Gland Neoplasms, Pleomorphic adenoma.

INTRODUCTION

Pleomorphic adenoma (PA) is the most common benign neoplasm affecting the salivary glands. Biologically, it presents a neoplasm with low cell proliferation, which is clinically reflected in the slow growth and generally do not show symptoms, despite displaying a local invasiveness behavior [1]. PA has been extensively studied because of its high frequency and local invasiveness. Although it has not been established whether the histological variability of PA is related to its local invasiveness behavior and proliferation rate, several studies have demonstrated that stroma-rich tumors display significantly higher cell growth, than tumors that lack the extracellular matrix [2-7].

Degradation of the extracellular matrix (ECM) is an essential process for tumor progression and invasion of the adjacent tissues. A number of studies support the theory that extracellular proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), regulate many of the alterations occurring in the cellular microenvironment during cancer progression [8, 9]. These enzymes regulate a variety of physiological processes and signaling events. Therefore, they are one of the major mediators of the molecular communication between the tumor stroma and parenchyma.

Two types of MMPs (which belong to the gelatinases group), metalloproteinase -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9), are responsible for the proteolysis of the major components of ECM, such as collagen (particularly type IV) [10]. These proteins degrade the basal membrane, and provide a favorable environment for tumor invasion [11, 12]. These MMPs are zinc-dependent endopeptidases. As zinc is an essential metal for protein function, its regulation is mediated by metallothionein (MT) [13].

Metallothionein is expressed intracellularly and displays various functionalities related to different physiological processes, such as possibly acting in the differentiation of human salivary glands [14]. Although MT is detected in non-neoplastic cells, an increased expression has been associated with the biological behavior of some tumors, such as benign and malignant salivary tumors, including PA [14-17]. However, its function in the salivary gland tumors has not yet been fully established.

Several studies have shown a positive correlation between the expression of MMPs and MT [18-20]. Although a number of studies have demonstrated the presence of MMP-2, MMP-9 [7], and MT [15] in PA, there are no studies correlating their expression to this tumor. With this background, our study attempts to verify the expression of MMP-2, MMP-9, and MT in PA, and the correlation that exists among these proteins, in order to better understand their roles in PA development.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Twenty PA samples were collected from the archives of the Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, University Center of Pará (Belém, PA, Brazil). Seven healthy salivary gland (SG) samples were included in this study as controls. The Human

1 Research Ethics Committee of the Institute of Health Sciences, Federal University of
2 Pará approved this study (Process number: 358.227).
3

4 **Immunohistochemistry**

5 Three micrometer thick histological sections of all samples were prepared and
6 mounted on slides treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma Chemical Corp.,
7 St. Louis, MO, USA). The sections were de-paraffinized in xylene, and hydrated in a
8 descending series of ethanol. The slides were then immersed in a solution of 3% H₂O₂
9 and methanol (1: 1) for 20 minutes in order to inhibit the endogenous peroxidase
10 activity. Following this step, the antigen was retrieved using citrate buffer (pH 6.0) in a
11 Pascal chamber (Dako, Carpinteria, CA, USA) for 30 seconds. All non-specific
12 antibody bindings were blocked by 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical
13 Corp.) in phosphate buffered saline (PBS) for 1 hour. The slides were incubated with an
14 anti-MMP-2 primary antibody (1:50; Merck Millipore, Darmstadt, Germany), anti-
15 MMP-9 (1:50; Merck Millipore), and anti-MT (1:100; clone E9; Dako) for 1 hour at
16 room temperature. Subsequently, the sections were incubated for 30 minutes with the
17 EnVision Plus (Dako) detection system. Diaminobenzidine (Dako) was used as a
18 chromogen. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma
19 Chemical Corp.) and mounted with the Permount mounting medium (Fisher Scientific,
20 Fair Lawn, NJ, USA).
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Evaluation of the immunohistochemical stainings**

30 Bright field images of at least five randomly selected areas were obtained for
31 each sample using the 40X objective of the Axio Scope A1 microscope, equipped with a
32 CCD AxioCam HRc camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).
33
34

35 The protein immunostaining was quantified using the public domain software
36 ImageJ (NIMH, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The areas stained
37 with diaminobenzidine were segmented using the “color deconvolution” plug-in
38 developed by Gabriel Landini
39 (<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>). Following the
40 segmentation of the images, the different areas of the stained PA and SG cells were
41 assessed, and expressed as a percentage of the total area. The differences between the
42 stained areas in PA and SG cells were also analyzed.
43
44
45
46

47 **Statistical Analysis**

48 The data were analyzed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad
49 Software, Inc., San Diego, CA, USA). The differences between the stained areas in the
50 PA and SG samples were evaluated by the Mann-Whitney test. The Spearman's
51 correlation test was conducted to determine the possible correlations between MMP-2,
52 MMP-9, and MT expression in the PA samples.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

PA samples expressed MMP-2, MMP-9, and MT.

The expression of MMP-2, MMP-9, and MT it was detected in all PA samples. The MMP-2 staining displayed a punctate and homogeneous appearance predominantly in cytoplasm of neoplast epithelium, especially in the solid sheets of neoplastic cells (Figure 1A). Was observed staining in mioepithelial cells around of ductal cells (Figure 1B) and squamous metaplasia areas (Figure1C). Stromal cells showed occasional MMP-2 staining (Figure 1D). Cells of chondroid areas showed nuclear stain (Figure 1E). Salivary gland tissue showed a weak stain, predominantly in stroma (Figure 1F).

MMP-9 staining was intense in the cytoplasm of epithelial (Figure 2A), mioepithelial and ductal cells (Figure 2B). The cells around squamous metaplasia areas showed a weak stain (Figure 2C). Tumor stromal cells showed occasional MMP-9 staining (Figure 2D). Cells of chondroid area do not showed stain (Figure 2E). Salivary gland tissue showed a weak stain, predominantly in stroma (Figure 2F).

MT showed a granular citoplasmatic in the solid sheets (Figure 3A) and intense nuclear staining in mioepithelial cells (Figure 3B). Mioepithelial cells staining was very strong in the ductiforms areas stained cytoplasm and nuclei (Figure 3C) and squamous metaplasia area (Figure 3D). Cells of chondroid area showed weak stain of MT in cytoplasm (Figure 2E). Salivary gland tissue showed a stain in ductal and mioepithelial cells (Figure 2F).

PA samples displayed higher MMP expression compared to normal SG samples

Statistical analyses revealed a significant difference in the immuno-expression of MMP-2 ($p < 0.05$) and MMP-9 ($p < 0.01$) proteins in PA, when compared to that in the control group (Figures 4A and 4B). The PA samples showed a significantly higher number of areas stained with MMP-2 and MMP-9, compared to that observed in the salivary glands.

PA samples displayed a correlation between the expression of MMPs and MT

The PA and SG samples displayed no differences between the areas stained for MT ($p = 0.1583$). The Spearman's correlation test (Table 1) revealed a positive correlation between MMP-9 and MT ($p = 0.0443$), and among the different MMPs ($p = 0.0376$).

DISCUSSION

PA is a slow-growing benign tumor that presents a locally-invasive behavior [5]. The invasive capacity of a tumor requires, among other factors, the degradation of ECM, which allows the tumor cells to invade the underlying normal tissue [7, 19, 21]. MMPs -2 and -9 are gelatinases that degrade the collagen IV, collagen V, laminin, elastin, and proteoglycans present in the ECM and basal membrane of tumors [8, 9, 19, 22-26]. In addition, higher expression of MMPs has been observed in invasive tumors than in the non-invasive tumors [26]. In this study, the PA samples displayed an

1 increased expression of MMP-2 and MMP-9 compared to the normal glandular tissue.
2 This suggests that these proteases may be involved in the process of PA local
3 invasiveness.

4 The MMP-2 and -9 immunostaining analysis reveal immunopositivity in the
5 tumor parenchyma and a reduced immunoexpression in the stroma in all samples.
6 Scientific research established that the low expression of MMP in the stroma is
7 associated to the behavior of benign neoplasms [27]. While the high MMP expression
8 observed in the tumor parenchyma of the PA samples indicates the local aggressiveness
9 of this tumor.

10 A nuclear immunostaining of MMP-2 and MT were detected. The MT is
11 expressed in the nucleus probably due to the need for zinc-donor activity to
12 transcription factors, such as p53 and others [15]. The presence of MMP-2 in the
13 nucleus could involve nuclear structural remodeling, degradation of nuclear proteins,
14 such as transcription factors and RNA processing proteins and ribonucleoproteins, or
15 other undetermined functions [28].

16 MMPs-2 and -9 promotes the cell invasiveness of breast, cervix, prostate, brain,
17 and salivary gland-derived tumors, among others [5, 23]. MMP-2 can degrade
18 fibronectin, laminin and collagen types VII and XI, in addition to the substrates
19 degraded by MMP-9 [23-25]. Therefore, gelatinases follow a similar mechanism of
20 action, which could possibly explain the observed positive correlation between the
21 expression of these MMPs. However, although these MMPs have similar functions,
22 their contribution to the biological or pathological processes may be slightly different.

23 The PA samples displayed a significantly higher expression of MMP-2 and -9
24 compared to the SG samples. In addition, the results also demonstrated that the
25 expression of MMP-9 was considerably higher than that of MMP-2 in the PA samples.
26 Nagel et al. (2004) [6] obtained similar results upon evaluating the immune expression
27 of MMPs in benign tumors (including PA) and malignant salivary gland tumors. They
28 observed a significant difference in the expression of MMP-2 in malignant tumors
29 compared to that seen in benign tumors. On the other hand, the MMP-9 expression was
30 high in both types of tumors, with no significant difference [6].

31 The findings also revealed a positive correlation between MMP-9 and MT, as
32 well as in the study by Kim et al. (2011) [19], which states that the MT positively
33 modulates MMP-9 through the activation of the AP-1 and NF- κ B signaling pathways.
34 These are two transcription factors that play important roles in a variety of cellular
35 activities, such as cell death, growth and migration, and that regulate the transcription of
36 numerous genes and the expression of many proteins, such as MT and MMP-9 [20, 29,
37 30]. Therefore, MT and MMP-9 share the same expression regulators (AP-1 and NF-
38 κ B); this could be the possible reason for the positive correlation observed in this study.

39 Another possible hypothesis for the positive correlation between MMP-9 and
40 MT is related to zinc interaction with these proteins. The MMPs are zinc-dependent
41 endopeptidases [10, 11], as well as MT regulates zinc activity [12]. Therefore, MT may
42 be responsible for the regulation of MMP activity, by providing zinc to these proteins
43 [31, 32].

1 The study of Viana et al. (2013) [15], SG samples shows lower MT expression
2 compared to PA cells, probably because only the ductal cells were stained, while the
3 acinar cells were not stained, which influenced the very low expression of MT in the SG
4 samples [15]. However, in this study the statistical results displayed no significant
5 differences between the PA and SG samples MT staining. The MT is responsible for
6 many physiological processes, such as the differentiation of the human salivary glands
7 [14], and is expressed in non-neoplastic cells [14-16], probably because of the
8 constitutive expression of MT in healthy SG cells. In addition, other studies indicate
9 that SG tumors and healthy SG display the same pattern of intense nuclear
10 immunostaining in the myo-epithelial cells surrounding the intercalated ducts [15],
11 which corroborates the immunohistochemical findings of this study.
12
13
14

15 Therefore, the PA samples revealed a high immunoexpression of MMP-2 and
16 MMP-9 and a lower immunoexpression of the MT, the statistical analysis revealed a
17 positive correlation among the MMPs, and between MT and MMP-9. Therefore, we
18 theorize that MMP-2 and MMP-9 participate actively in the local invasiveness of PA.
19 MT displays a positive correlation with the endopeptidase MMP-9, which indicates the
20 important role played by MT in the storage and supply of zinc, allowing MMP-9 to
21 exert its proteolytic activity.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors truly thank the Cell Culture Laboratory, Dentistry Post Graduation Program, Federal University of Pará for the analysis and processing of histological diagnosis data reported in this article.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS:

Conflict of Interest:

Author **Lara Carolina D'Araújo Pinto** declares that she has no conflict of interest.

Author **Natacha Malu Miranda da Costa** declares that she has no conflict of interest.

Author **Walessa Brasil da Silva** declares that she has no conflict of interest.

Author **Anna T. O. G. S. Campos Lima** declares that she has no conflict of interest.

Author **André Luis Ribeiro Ribeiro** declares that he has no conflict of interest.

Author **Maria Sueli da Silva Kataoka** declares that she has no conflict of interest.

Author **Sérgio de Melo Alves Júnior** declares that he has no conflict of interest.

Author **João de Jesus Viana Pinheiro** declares that he has no conflict of interest.

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

REFERENCES

13. Alves FA, Perez DE, Almeida OP, Lopes MA and Kowalski LP (2002) Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128:1400-3.
14. Kazanceva A, Groma V, Smane L, Kornevs E and Teibe U (2011) Proliferative potential in benign mixed salivary gland tumors and its value in primary and recurrent neoplasms. *Stomatologija* 13:35-41.
15. Brazao-Silva MT, Cardoso SV, de Faria PR, Dias FL, Lima RA, Eisenberg AL, Nascimento MF and Loyola AM (2013) Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a clinicopathological study of 49 cases and of metallothionein expression with regard to tumour behaviour. *Histopathology* 63:802-9. doi: 10.1111/his.12227
16. Velickovic LJ, Dimov I, Petrovic D, Stojnev S, Dacic S, Velickovic S and Stefanovic V (2013) Stromal reaction and prognosis in acinic cell carcinoma of the salivary gland. *Vojnosanit Pregl* 70:1155-8.
17. Falcão ASC, Kataoka MSS, Ribeiro NAB, Diniz JA Jr, Alves SM Jr, Ribeiro ALR, de Siqueira AS, da Silva AL, Ramos RTJ, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJV (2014) A Novel Cell Line Derived from Pleomorphic Adenoma Expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and Shows Numeric Chromosomal Anomalies. *PLoS One* 19;9(8) e105231 doi: 10.1371/journal.pone.0105231
18. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A and Hemmerlein B (2004) Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1,-2, and-3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology* 44:222-231.
19. Zhang X, Wang Y, Yamamoto G and Tachikawa T (2009) Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology* 55:250-260.
20. Kessenbrock K, Plaks V and Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141:52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
21. Rodríguez D, Morrison CJ and Overall CM (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1803:39-54.
22. Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A and Cowled PA (2002) Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23:260-9. doi: 10.1053/ejvs.2002.1598
23. Nita M, Strzalka-Mrozik B, Grzybowski A, Mazurek U and Romaniuk W (2014) Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. *Med Sci Monit* 20:1003-16. doi: 10.12659/MSM.889887
24. Xue M, McKelvey K, Shen K, Minhas N, March L, Park S-Y and Jackson CJ (2014) Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology (Oxford)* 53:2270-2279.

- 1 25. Cherian MG, Jayasurya A and Bay BH (2003) Metallothioneins in human tumors
2 and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 533:201-9.
- 3 26. Hecht D, Jung D, Prabhu VV, Munson PJ, Hoffman MP and Kleinman HK (2002)
4 Metallothionein promotes laminin-1-induced acinar differentiation in vitro and
5 reduces tumor growth in vivo. *Cancer Res* 62:5370-4.
- 6 27. Viana AdCM, Ribeiro DC, Florêncio TNG, Santos VT, Sousa AA and Aguiar MCF
7 (2013) Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic
8 adenoma of minor salivary glands: A role in the control of apoptosis? *Acta*
9 *Histochem* 115:564-568.
- 10 28. Alves SM, Cardoso SV, de Fatima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Vieira
11 do Carmo MA and Ferreira Aguiar MC (2007) Metallothionein immunostaining in
12 adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 43:252-6. doi:
13 10.1016/j.oraloncology.2006.03.012
- 14 29. Ribeiro ALR, Alves JR SM, Marques YM FS , Pinheiro J JV , Pinto JR DS (2015)
15 Expression of metallothionein in pleomorphic adenoma. *Internat J of Clinical*
16 *Dentistry* 8:21-9
- 17 30. Tomita T (2000) Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms. *Mod Pathol*
18 13:389-95. doi: 10.1038/modpathol.3880064
- 19 31. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH and Jeong HG (2011)
20 Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix
21 metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Lett* 585:421-8. doi:
22 10.1016/j.febslet.2010.12.030
- 23 32. Ryu HH, Jung S, Jung TY, Moon KS, Kim IY, Jeong YI, Jin SG, Pei J, Wen M and
24 Jang WY (2012) Role of metallothionein 1E in the migration and invasion of human
25 glioma cell lines. *Int J Oncol* 41:1305-13. doi: 10.3892/ijo.2012.1570
- 26 33. Xu X, Wang Y, Chen Z, Sternlicht MD, Hidalgo M and Steffensen B (2005) Matrix
27 metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res*
28 65:130-136.
- 29 34. Egeblad M and Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in
30 cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161-74. doi: 10.1038/nrc745
- 31 35. Brehmer B, Biesterfeld S and Jakse G (2003) Expression of matrix
32 metalloproteinases (MMP-2 and-9) and their inhibitors (TIMP-1 and-2) in prostate
33 cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6:217-222.
- 34 36. Freitas VM, Vilas-Boas VF, Pimenta DC, Loureiro V, Juliano MA, Carvalho MR,
35 Pinheiro JJ, Camargo AC, Moriscot AS, Hoffman MP and Jaeger RG (2007)
36 SIKVAV, a laminin α 1-derived peptide, interacts with integrins and increases
37 protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line
38 through the ERK 1/2 signaling pathway. *Am J Pathol* 171:124-138. DOI:
39 <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.051264>
- 40 26. Nascimento CF, de Siqueira AS, Pinheiro JJ, Freitas VM and Jaeger RG (2011)
41 Laminin-111 derived peptides AG73 and C16 regulate invadopodia activity of a
42 human adenoid cystic carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 317:2562-2572.
43 doi:10.1016/j.yexcr.2011.08.022
- 44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
33. Piao S, Zhao S, Guo F, Xue J, Yao G, Wei Z, Huang Q, Sun Y and Zhang B (2012) Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:627-635.
 34. Wernert N (1997) The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 430:433-43.
 35. Sinha SK, Asotra K, Uzui H, Nagwani S, Mishra V and Rajavashisth TB (2014) Nuclear localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. *Am J Transl Res* 6:155.
 36. Pan M-H, Chiou Y-S, Chen W-J, Wang J-M, Badmaev V and Ho C-T (2009) Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30:1234-1242.
 37. Li W, Li H, Bocking AD and Challis JR (2010) Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway. *Biol Reprod* 83:481-487.
 38. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A and Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-250.
 39. Kerkela E and Saarialho-Kere U (2003) Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 12:109-25.

LEGENDS

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 1: MMP-2 immunolabeling in the PA and SG. Cytoplasm staining was observed in neoplastic cells (A). Mioepithelial cells staining in ductform (B) and around squamous metaplastic area (C). Ductal cells (D). Chondroid appearance of the tumor (E). Immunostaining in the SG is located exclusively in the glandular stroma (F). Scale 20 μ m.

Fig.2: MMP-9 immunolabeling in the PA and SG. (A) Intense immunostaining was observed in the cell cytoplasm (A). Mioepithelial and ductal cells staining (B). Squamous metaplastic (C). Occasionally staining in the stroma (D). Chondroid appearance of the tumor stroma (E). Immunostaining in the SG samples was located exclusively in the glandular stroma (F). Scale 20 μ m.

Fig 3: MT immunolabeling in the PA and SG. Cytoplasm (A) and nuclear (B) staining was observed in neoplastic cells. Intense mioepithelial cell staining in ductforms (C) and squamous metaplastic (D) areas. Chondroid appearance in the tumor stroma (E). The nucleus and cytoplasm of the duct cells of the SG samples were immunostained (F). Scale 20 μ m.

Fig.4: Comparison of MMP-2, MMP-9 and MT immunoexpression between PA and SG. Significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

TABLE**Table 1.** P-value related to the MMP-2, MMP-9, and MT immunostaining in PA, obtained using Spearman's correlation test.

Protein 1	Protein 2	Spearman r	p value
MMP-2	MT	0.2495	0.1534
MMP-9	MT	0.4541	0.0443*
MMP-9	MMP-2	0.4677	0.0376*

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; MT, metallothionein.
Asterisk (*) indicates a significant correlation.

FIGURAS

Figura 1

MMP-2

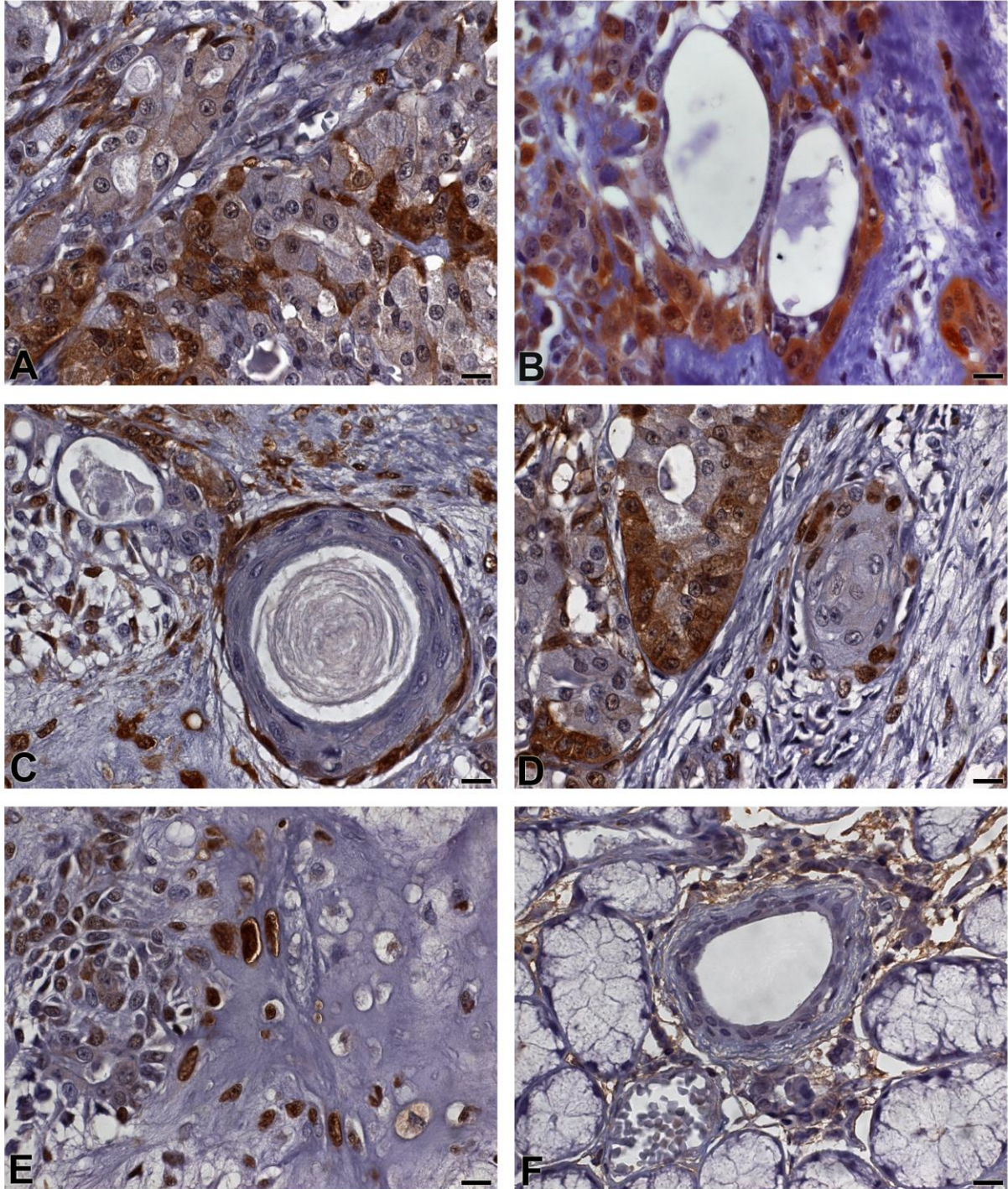


Figure 1

Figura 2:

MMP-9

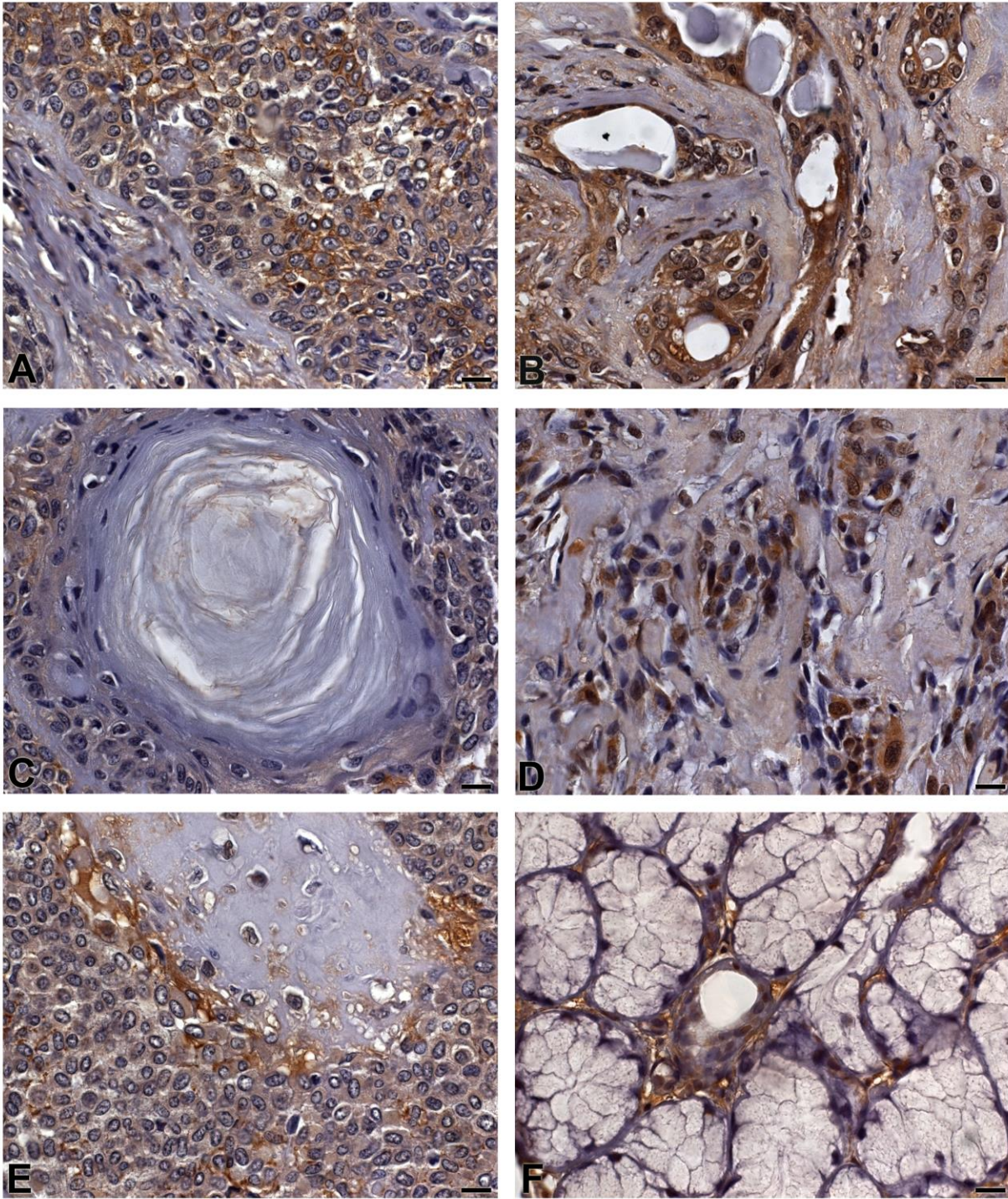


Figure 2

Figura 3:

MT

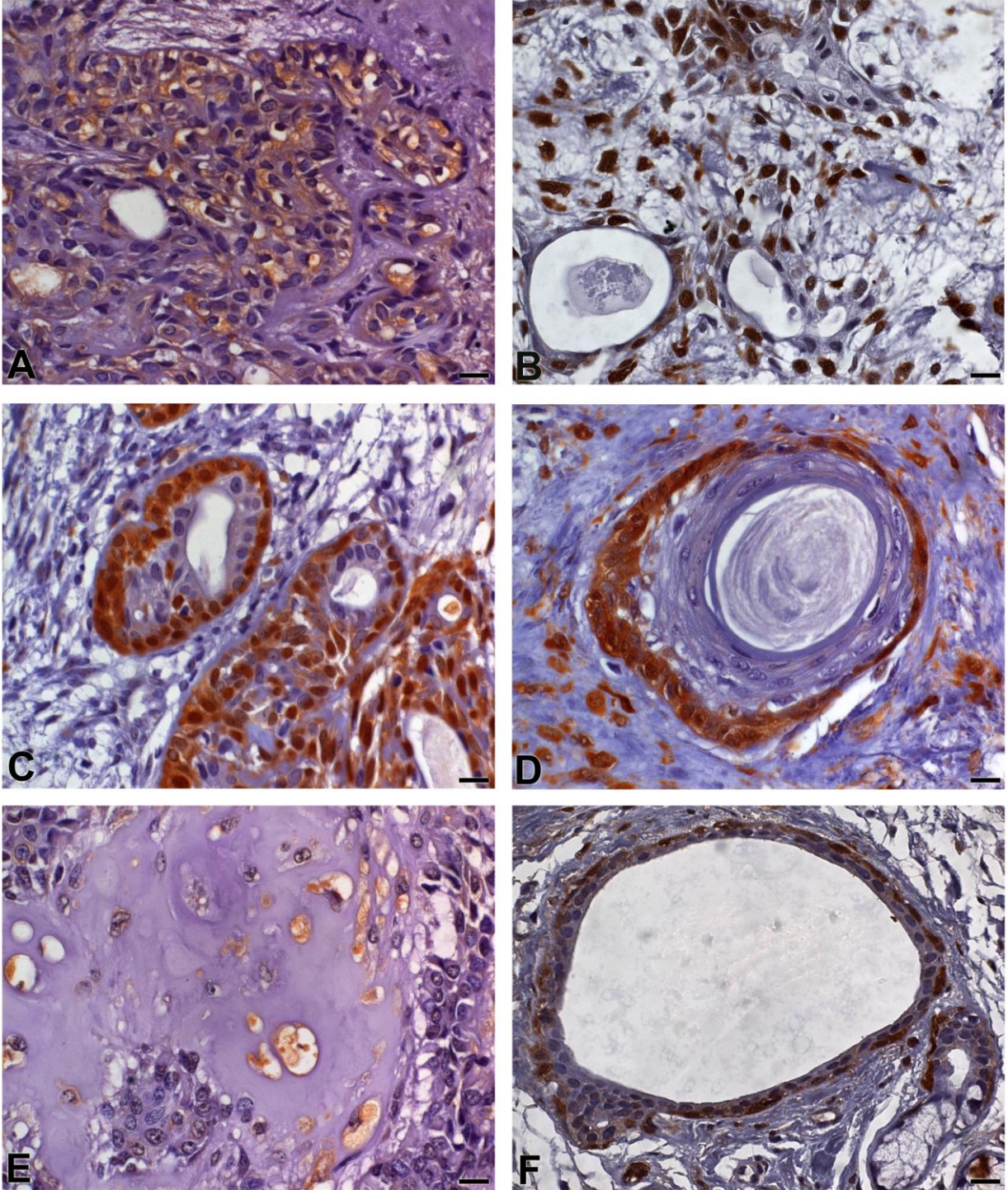


Figure 3

Figura 4:

