ALUANA MARIA DA COSTA DAL VECHIO

**EXPRESSÃO DA VIMENTINA EM CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE
LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA**

São Paulo
2008

Aluana Maria da Costa Dal Vechio

**Expressão da vimentina em cultivo tridimensional de linhagens
celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade de São
Paulo, para obter o título de Mestre, pelo
programa de Pós Graduação em Odontologia

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Mantesso

São Paulo
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vechio AMCD. Expressão da vimentina em cultivo tridimensional de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.
São Paulo, .../.../....

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a): _____

Titulação: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

À **Deus**, e aos bons **espíritos de Luz**, pela Força e pelos Conselhos,

E à vocês, que fazem parte de mim:

Ao meu irmão querido, o **Fran**, que sempre foi meu companheiro, meu cúmplice, meu ídolo, meu orgulho, enfim, você será meu eterno amigo.

Aos meus pais, **Dalva** e **Francisco**, que em todos os momentos fizeram o possível e o impossível para que os meus sonhos se tornassem realidade.

Ao meu namorado **André** por esses 6 anos de dedicação, companherismo, carinho e muita (muita!) paciência.

À minha querida avó **Maria** (*in memorian*) pela educação e pela ajuda nos primeiros passos rumo a vida.

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. **Andrea Mantesso** por ter acreditado em mim desde a iniciação e pela oportunidade concedida em ser novamente sua orientada no mestrado. Agradeço pela confiança depositada nesses últimos dois anos que proporcionaram-me um grande crescimento profissional. Espero que a nossa caminhada continue no doutorado.

Ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Júnior** por ter aberto o mundo da pesquisa e por ter acreditado em mim. Décio, você foi mais que um mestre, foi um grande amigo, que alegrou e me pregou inúmeros sustos durante esses dois anos.

À minha grande amiga **Fernanda Giudice**, não tenho palavras para agradecer por tudo o que você fez por mim. Com sua meiguice e tranquilidade, você me fez ter esperança e permitiu que meu sonho se realizasse. Se hoje tenho uma tese terminada, devo muito à você. Trabalhar com a Fer foi muito prazeroso e divertido. Ah, se o laboratório de cultura e as “pps” falassem.....(risos).

Agradecimentos

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal **Marília, Suzana, Marina, Karém e Fábio**, meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável.

À todos aqueles que de alguma forma me ajudaram com o Musashi, em especial à **Flávia Caló**, à **Paty Adachi** e ao **Helder**.

À todos os colegas do curso de pós graduação: **Camila Rodini, Kati e Isadora, Thaís, Márcia, Tati Libório, Juliana, Tuti (Arthur), Alexandra, Alexandre, Vanessa, Márcio, Fabiana, Cristiane, Camila Fragata, Tessa, Brunno, Fernanda Yamamoto, Flávia Pontes, Curry, Kívia, Renata Acay, Roberto, Marina, Yonara, Serginho, Nathalie, Paulo SS, Paulo Brás e Luciana**. Muito obrigada!

Ao pessoal da cultura **Fernanda Giudice, Aline, Fátima, Felipe e Paulo** por todo o aprendizado, o constante apoio, o companheirismo e a agradável e divertida convivência.

Coracin, conselheiro, um verdadeiro amigo.

Às sempre simpáticas funcionárias da disciplina: **Zilda, Néia, Bia, Elisa, Débora, Nair e Edna** (*in memorian*), por nunca terem negado ajuda.

Aos meus amigos da graduação: **Alcimara, Angélica, Deisy, Hércio, Karina, Renatinha, Renata W, Tathy e Thiago**, pelos bons e maus momentos que passamos e pelo apoio dado quando escolhi fazer a pós graduação na patologia... amigos, quanta saudades.

***“São os pequenos acontecimentos
diários que tornam a vida espetacular”.***
William Shakespeare

Vechio AMCD. Expressão da vimentina em cultivo tridimensional de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

R E S U M O

O carcinoma epidermóide representa mais de 90% das neoplasias malignas de cabeça e de pescoço, apresentando taxas elevadas de morbi-mortalidade. Proteínas relacionadas à invasão e proliferação celular estão em evidência devido ao seu envolvimento na carcinogênese, a exemplo da vimentina, encontrada em células de origem mesodérmica. Sua presença em células epiteliais neoplásicas contribui na transição epitélio mesenquimal e está associada à tumorigênese, à invasão celular e à metástase. O propósito deste estudo foi analisar através de métodos qualitativos (imunofluorescência e imunoistoquímica) e quantitativos (Western Blot) a expressão da vimentina em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e de pescoço (CECP) e em uma linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat) submetidas ao cultivo tridimensional em Matrigel®. O grupo controle foi representado pelas mesmas linhagens cultivadas na ausência de Matrigel®. A Vimentina apresentou marcação citoplasmática em algumas células das linhagens estudadas, exceto na HaCat, com evidente diminuição da sua expressão quando submetida ao cultivo com Matrigel®. Esses resultados foram confirmados por Western Blot. A expressão da Vimentina em diferentes linhagens de CECP pode variar dependendo da linhagem analisada, da reação de suas células

aos componentes da matriz extracelular e da técnica utilizada para avaliação da expressão da proteína.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide, vimentina, cultivo tridimensional

Vechio AMCD. Vimentin expression in tridimensional cultive cells lines derived of oral squamous carcinoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents more than 90% of all head and neck malignancies, causing more deaths than any other oral disease. Proteins related to cancer growth, invasion and metastasis are in evidence due to their involvement in carcinogens, such as vimentin. This protein is observed in mesenchymal cells, however, it is considered a common finding in cervix, breast and bladder tumours. Thus its presencence in epithelial neoplastic cells contributes to epithelial-mesenchymal transition associated with tumorigenesis and tumor progression. The aim of this study was to analyse through Western Blot, Immunohistochemistry and Immunofluorescence methods, the expression of Vimentin in three different HNSCC cell lines and HaCat cell line (immortalized keratinocytes) submitted to a 3D assay into Matrigel®. The control group was represented by the same cell lines, without any treatment. Results showed that Vimentin had citoplasmatic staining in some cell of lines studied, except for HaCat cells, with evident decrease in its expression when submitted to cultivate into Matrigel®. These findings were confirmed by Western Blot. Taking these results together, we conclude that in squamous cell carcinoma, the Vimentin is related to the process of tumour invasion and metastasis. This fact was showed by the reduction of its expression after treatment with Matrigel®. Therefore, the expression of Vimentin in different cell lines of HNSCC may vary according to the stimulus and,

fundamentally, the localization of the tumor and the individual characteristics of neoplastic cells.

Keywords: squamous cell carcinoma, vimentin, tridimensional culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1- Linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31 coradas pela hematoxilina-eosina (HE).	62
Figura 5.2- Reação de imunoistoquímica para o anticorpo vimentina nas linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31.....	63
Figura 5.3- Reação de imunofluorescência para o anticorpo vimentina nas linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31.....	64
Figura 5.4- Representação gráfica dos valores da quantificação da proteína vimentina pelo Western Blot	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária (INCA, 2008).....	22
Tabela 2.2- Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos de câncer, por Estado (INCA, 2008).....	23
Tabela 4.1- Origem das linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e sua classificação segundo o critério TNM (Cardinali et al., 1995).....	45
Tabela 4.2- Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm).....	54
Tabela 5.1 – Resultados da reação de imunoistoquímica para os ensaios realizados na presença e ausência de Matrigel®.....	61
Tabela 5.2 – Resultados da reação de imunofluorescência para os ensaios realizados na presença e ausência de Matrigel®.....	61

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Carcinoma Epidermóide.....	20
2.1.1 epidemiologia.....	20
2.1.1.1 incidência	20
2.1.1.2 fatores etiológicos	23
2.2 Carcinogênese.....	24
2.3 Heterogenicidade tumoral	28
2.4 Invasão e metástase	29
2.5 Vimentina	32
2.5.1 citoesqueleto e filamentos intermediários.....	32
2.5.2 vimentina – estrutura, funções e participação na carcinogênese.....	34
2.6 Matriz extracelular	38
2.6.1 modelo tridimensional e Matrigel®.....	40
3 PROPOSIÇÃO.....	44
4 MATERIAL E MÉTODO	45

4.1 Cultivo celular	45
4.2 Plaqueamento das linhagens celulares em membrana basal reconstituída (Matrigel®) e fixação do material	46
4.3 Análise histológica e imunoistoquímica	48
4.4 Plaqueamento das linhagens celulares sobre membrana basal reconstituída (Matrigel®) e análise da imunofluorescência	50
4.5 Western-blotting (Burnette, 1981)	51
4.5.1 extração protéica de células cultivadas em Matrigel®	52
4.5.2 extração protéica de células cultivadas na ausência do Matrigel®	53
4.5.3 western blot propriamente dito	53
5 RESULTADOS	56
5.1 Linhagem Hacat	56
5.2 Linhagem HN6	57
5.3 Linhagem HN30	58
5.4 Linhagem HN31	60
5.5 Western Blotting	61
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

ANEXO A - Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa	86
---	----

1 INTRODUÇÃO

De todos os tipos de câncer de boca, o carcinoma epidermóide é o mais freqüente, representando 95% de todas as neoplasias malignas dessa região. Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 350.000 novos casos de carcinoma epidermóide de boca em todo o mundo e em média metade destes pacientes morre num período de 5 anos. Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais, acarretando diretamente na queda da qualidade de vida. Apenas 34% dos casos são diagnosticados a tempo de propiciar alguma terapia ou cura para o paciente.

Assim, muitos esforços têm sido empregados na descoberta de proteínas que funcionem como alvos terapêuticos, e no melhor entendimento das vias de sinalização moleculares funcionantes durante a inicialização e progressão tumoral.

Sabe-se que a progressão neoplásica é marcada por alterações genéticas que controlam a interação entre as células e matriz extracelular e os programas de sinalização capazes de estimular ou reprimir a proliferação celular.

As alterações acima citadas influenciam a morfologia e o comportamento das células neoplásicas, principalmente aquelas localizadas na frente de invasão tumoral. Essas células perdem adesão e sensibilidade à apoptose, sendo capazes de degradar a matriz extracelular e ganhar potencial de migração, tornando-se mais invasivas. Essas alterações morfológicas definem o que se chama de transição epitélio-mesenquimal e são resultado direto da supressão da expressão de genes epiteliais e aquisição da expressão de genes mesenquimais.

A vimentina é um filamento intermediário presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual. É responsável pela ancoragem do núcleo e posicionamento de suas organelas no citoplasma.

Sabe-se que em situações especiais a vimentina, um marcador do tecido mesenquimal, passa a se expressar em células neoplásicas de origem epitelial quando estas perdem sua orientação tridimensional.

A expressão de vimentina por células epiteliais neoplásicas em cultura é acompanhada pela perda de moléculas de adesão e está associada a invasividade de carcinomas de mama, de bexiga e cervicais.

A matriz extracelular é uma estrutura importante no controle do comportamento celular, influenciando o desenvolvimento, migração, proliferação, morfologia e função das células, além de criar ancoragem para diversos outros componentes. Sabe-se que células transformadas apresentam interações anormais com seu ambiente.

Apesar do modelo de cultura celular bidimensional *in vitro* fornecer um conveniente e rápido significado de análises bioquímicas, ele não mostra as propriedades encontradas no microambiente tecidual *in vivo*, mostrando-se um limitado modelo para estudos das funções específicas dos tecidos e sinais estruturais.

Desta maneira, os modelos tridimensionais de cultura celular permitem estudos dos processos biológicos em um cenário que simula o ambiente *in vivo* e, portanto, fornecem um maior contexto fisiológico. Logo, os modelos tridimensionais

podem facilitar o entendimento de sinais que regulam a função normal dos tecidos e como esses sinais podem ser interrompidos nas patologias, por exemplo.

O Matrigel® é uma substância composta por moléculas da matriz extracelular e mimetiza biologicamente o ambiente da matriz extracelular, estimulando a diferenciação de células normais.

Considerando que para haver a invasão neoplásica é necessário a degradação dos componentes da matriz extracelular na frente de invasão e que essas células mostram alterações fenotípicas que podem estar relacionadas à expressão da vimentina, o objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão dessa proteína em ambiente tridimensional utilizando como base a membrana basal reconstituída (Matrigel®).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide

2.1.1 epidemiologia

O termo câncer de cabeça e pescoço é baseado na localização anatômica, usado para se referir as neoplasias malignas que acometem o trato aero-digestivo superior. Aproximadamente 40% desses tumores ocorrem em boca, 25% acometem a laringe e 15% afetam a faringe. Esses são seguidos por outros tumores de menor incidência, como o de tireóide (DOBROSSY, 2005).

2.1.1.1 incidência

De todos os tipos de câncer de boca, o carcinoma epidermóide é o mais freqüente, representando 95% de todas as neoplasias malignas dessa região (SCULLY; BAGAN, 2007). Até 2015, estima-se que 84 milhões de pessoas podem morrer de câncer e, para 2020, 16,5 milhões de novos casos devem ser diagnosticados, sendo que dois terços deles ocorrerão nas nações em desenvolvimento (OMS, 2006).

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, representando 13% de todas as mortes. Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Já em 2006, o câncer matou mais indivíduos que a AIDS, a malária e a tuberculose juntas. Cerca de 11 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano (OMS, 2006).

Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 350.000 novos casos de carcinoma epidermóide de boca em todo o mundo (STURGIS; WEI; SPITZ, 2004) e em média metade destes pacientes morre em um período de 5 anos. Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais, acarretando diretamente em queda da qualidade de vida (SINDRANSKY, 1995). Apenas 34% dos casos são diagnosticados a tempo de propiciar alguma terapia ou cura para o paciente (CHEN et al., 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e 2009, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer/ano, sendo que 14.160 casos acometerão a cavidade oral. Para este período, são esperados 231.860 casos novos/ano para o sexo masculino e 234.870 casos novos/ano para o sexo feminino, sendo que na cavidade oral, são previstos 10.380 novos casos/ano para homens e 3.780 casos/ano para mulheres (INCA, 2008).

Tabela 2.1- Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária (INCA, 2008)

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

Segundo o INCA, aproximadamente um terço desses novos casos devem ocorrer no Estado de São Paulo (4.510 acometimentos), no ano de 2008.

Tabela 2.2- Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos de câncer, por Estado (INCA, 2008)

Estados	Leucemias	Cavidade Oral	Pele Melanoma	Outras Localizações	Subtotal	Pele não melanoma	Todas as Neoplasias
Acre	20	20	20	80	420	280	700
Alagoas	110	110	20	890	2.530	990	3.520
Amapá	30	20	20	170	580	160	740
Amazonas	120	70	20	1.370	3.440	910	4.350
Bahia	410	760	100	3.580	12.990	5.460	18.450
Ceará	360	450	110	2.530	10.410	5.760	16.170
Distrito Federal	120	150	60	1.990	4.690	930	5.620
Espírito Santo	190	330	110	2.170	6.740	2.070	8.810
Goiás	270	330	100	2.500	8.100	3.510	11.610
Maranhão	180	70	20	1.300	3.660	1.170	4.830
Mato Grosso	130	120	40	1.360	3.800	1.470	5.270
Mato Grosso do Sul	130	150	50	1.410	4.430	1.580	6.010
Minas Gerais	960	1.140	390	14.810	35.920	8.500	44.420
Pará	240	200	30	1.470	5.230	1.850	7.080
Paraíba	150	190	30	800	3.120	1.940	5.060
Paraná	630	1.020	570	9.200	25.950	7.140	33.090
Pernambuco	350	510	100	3.520	12.250	5.790	18.040
Piauí	100	90	20	370	2.290	1.810	4.100
Rio de Janeiro	960	2.030	480	13.890	43.550	11.300	54.850
Rio Grande do Norte	170	190	30	570	3.200	2.390	5.590
Rio Grande do Sul	810	1.050	870	15.020	38.830	9.100	47.930
Rondônia	50	40	20	580	1.550	730	2.280
Roraima	20	20	20	180	460	50	510
Santa Catarina	380	430	510	3.050	11.860	6.700	18.560
São Paulo	2.530	4.510	2.140	33.740	101.840	32.140	133.980
Sergipe	70	130	20	630	2.270	930	3.200
Tocantins	50	30	20	700	1.610	350	1.960
Brasil	9.540	14.160	5.920	117.880	351.720	115.010	466.730

O câncer oral afeta duas vezes mais homens que mulheres, sendo que 95% dos casos ocorrem depois dos 40 anos de idade. Entretanto, nas últimas décadas, observou-se um aumento no número de casos em pacientes mais jovens (DOBROSSY, 2005).

2.1.1.2 fatores etiológicos

Em relação aos fatores etiológicos, o fumo exerce um papel de destaque na carcinogênese bucal, especialmente quando sua ação é potencializada pelo álcool. De acordo com Franco et al. (1989), o risco de câncer para fumantes de cigarro é 6,3 vezes mais elevado do que para os indivíduos não fumantes. Grahans (1977) afirmou que para alguns etilistas que ingeriam mais de 6 doses diárias de uísque ou de outras bebidas de elevado teor alcoólico, o risco para desenvolvimento de câncer era 10 vezes maior em relação a indivíduos que não bebiam.

Vale ressaltar que os fatores de risco para os carcinomas bucais e a aparência clínica das lesões pré-malignas são dados prognósticos pobres para avaliar o risco em desenvolver o câncer. Portanto, marcadores moleculares, que possam ser usados para a avaliação do risco de desenvolvimento desta neoplasia, são necessários (PEDRERO et al., 2005).

2.2 Carcinogênese

O câncer é considerado um crescimento incontrolável do tecido em um paciente suscetível. Somada à suscetibilidade genética do indivíduo, conhecidos fatores de risco, como por exemplo o tabaco, o álcool, a radiação ionizante, poluentes ambientais medicamentos, agentes infecciosos e alimentos são descritos na literatura (PONDER, 2001). A exposição do epitélio a esses carcinógenos acaba por desencadear uma série de mutações genéticas consecutivas, com a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais. O câncer é resultado do acúmulo dessas mutações, as quais são transmitidas às gerações celulares

subseqüentes, até o momento em que a célula torna-se funcionalmente independente do epitélio adjacente (COLUCCI et al., 1997).

Estima-se que para o carcinoma bucal as células devam experimentar de 6-10 mutações antes de tornarem-se malignas, podendo ser necessários anos de exposição aos carcinógenos para ocorrer uma combinação de mutações apropriada que culminará na transformação maligna. Desta forma, a evolução de uma célula normal para uma célula maligna define um período de tempo caracterizado como estágio pré-maligno, uma fase precoce do processo de carcinogênese, em que pode ter ocorrido qualquer mudança fenotípica decorrente das alterações moleculares (WRIGHT, 1998).

Neste sentido, há trabalhos sendo desenvolvidos buscando identificar as alterações moleculares que ditam o desenvolvimento do câncer, independente do reconhecimento de alterações morfológicas (CRUZ et al., 1998).

Nos carcinomas epidermóides orais e no seu epitélio de origem, o epitélio oral, são esperados três tipos celulares: 1) células troncos que tipicamente dividem-se de forma não freqüente, mas conservam uma grande capacidade de renovação e são capazes de gerar diversas populações fenotípica de células tumorais; 2) células amplificadas que possuem uma capacidade limitada de proliferação, porém podem amplificar a população de células maduras dividindo-se várias vezes e 3) células diferenciadas (TUDOR et al., 2004).

A camada basal é tida como a localização anatômica de células específicas tronco/progenitoras do tecido epitelial. A célula tronco do epitélio estratificado tem sido descrita como o maior alvo celular para o câncer, e quando mutada pode, a longo prazo, causar o desenvolvimento do carcinoma epidermóide (CHU; WEISS, 2002).

Portanto, uma característica definida das células tronco adultas é sua imensa capacidade de renovação, o que nas células neoplásicas significa a imortalidade (COSTOYA et al., 2004). Enquanto as células diferenciadas tendem a ter vida curta, as células tronco persistem durante toda a vida do organismo. Por exemplo, a vida curta das células diferenciadas da pele e do sangue são produzidas por um pequeno pool de células tronco de longa vida (ORKIN, 2000).

A longevidade das células tronco faz com que as células susceptíveis acumulem danos genéticos durante a renovação celular e podem ser consideradas alvo para a transformação carcinogênica (CLARKE et al., 2003).

A imortalização ou passos da transformação maligna podem ocorrer durante a amplificação ou diferenciação das células tronco/progenitoras, e isso pode explicar o porque muitos tumores de mama adquirem característica de diferenciação (CLARKE et al., 2003). As células tronco podem ser responsáveis pela recorrência local ou distante anos após ao tratamento do tumor primário (DONTU et al., 2003).

Segundo observações clínicas, geralmente os tumores respondem a quimioterapia, mas freqüentemente recorrem. Isso sugere que células tronco residuais permanecem após a terapia e são responsáveis pela recorrência do tumor (PRINCE et al., 2007).

As células tronco somáticas adquirem mutações que são consideradas de alto risco tanto para a progressão tumoral, como para a provável transformação maligna que pode ser aumentada pelas mutações em genes que afetam o padrão da divisão das células tronco, resultando na expansão da população alterada (COSTEA et al., 2006).

Um modelo genético para a progressão tumoral foi proposto para o carcinoma epidermóide oral (CALIFANO et al., 1996). De acordo com esse modelo,

o desenvolvimento dos carcinomas orais leva meses ou anos para ocorrer. Como o epitélio oral tem uma taxa de renovação de 14-24 dias (SQUIER; KREMER, 2001), a maioria das células epiteliais não sobrevivem tempo suficiente para acumular as mudanças genéticas necessárias para o desenvolvimento tumoral (BRAAKHUIS; LEEMANS; BRAKENHOFF, 2004). Desta forma, as células tronco presentes no epitélio normal são as únicas células duradouras e capazes de acumular o número de alterações genéticas suficientes para o desenvolvimento da neoplasia (HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005).

Tanto as células tronco normais como as tumorigênicas apresentam significativo potencial proliferativo e habilidade para gerar novos tecidos. Entretanto, acredita-se que as células tronco tumorigênicas perdem o mecanismo regulatório do crescimento normal o qual limita a proliferação das células tronco normais (REYA et al., 2001).

Alguns autores acreditam que as células tronco tumorigênicas estão aumentadas na população de células tronco normais adultas. Um estudo realizado mostrou que o crescimento e comportamento dos cânceres são determinados por uma pequena sub-população de células tronco malignas (HAMBURGER; SALMON, 1977). Além disso, essas células tumorigênicas podem ter um importante papel na heterogenicidade do tumor, na invasão metastática e na recorrência após o tratamento por acumular múltiplas mutações (REYA et al., 2001).

2.3 Heterogenicidade tumoral

A heterogenicidade dos carcinomas epidermóides têm sido demonstrada por análises histológica, fenotípica e cariotípica (TREMMELE et al., 2003). A heterogenicidade foi principalmente atribuída ao processo de expansão clonal na qual vários clones são continuamente gerados devido às mudanças genéticas (TABOR et al., 2001). Sabe-se que nem todas as células desse clone têm uma habilidade de proliferação e de formar novos tumores. Desta forma, pode-se hipotetizar que a maioria das células do câncer tem uma limitada habilidade para se dividir e somente um pequeno grupo de células distintas fenotipicamente, as células tronco cancerígenas, tem a capacidade de renovar e formar novos tumores (REYA et al., 2001).

Há observações que tumores epiteliais, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, contêm heterogenicidade celular, o que permite concluir que nem todas as células cancerígenas dos tumores sólidos possuem uma igual habilidade para direcionar a formação tumoral (PARDAL; CLARKE; MORRISON, 2003). Desta forma, pode-se sugerir que células tronco cancerígenas direcionam a tumorigênese, assim como aumentam a população de células diferenciadas que constituem a massa tumoral mas não possuem o potencial tumoral.

Para comprovar essa teoria, há estudos mostrando que uma pequena população de células de carcinoma de mama tem sido capaz de formar um novo tumor (AL-HAJJ et al., 2003; DONTU et al., 2003). Utilizando o cultivo celular, alguns autores têm mostrado que um pequeno grupo de células tronco malignas

são clonadas *in vitro* e iniciam tumores *in vivo*, além de substituir células no tumor que não possuem essa propriedade (SINGH et al., 2004).

Prince et al. (2007) demonstraram que os carcinomas epidermóides contêm uma população distinta de células cancerígenas com uma habilidade exclusiva de produzir tumores em ratos e recriar o tumor heterogêneo original.

Locke et al. (2005) mostraram que mesmo linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide produzem *in vitro* padrões clonais similares àqueles produzidos pelas células tronco e pelas células amplificadas do epitélio normal.

2.4 Invasão e metástase

Para que ocorra a progressão tumoral, as células malignas devem adquirir alterações que independam do sinal inibitório presente na matriz extracelular. Entretanto, as células cancerígenas são capazes de desenvolver a formação de novas interações positivas e dinâmicas com o estroma através da evolução da neoplasia. Muitas dessas alterações entre as células tumorais e o tecido do hospedeiro representam uma violação da fronteira normal do tecido que fisiologicamente previne a mistura de células de diferentes tecidos. Como uma consequência da presença de células tumorais, há uma modificação no microambiente do hospedeiro levando a uma falha estrutural e funcional, que são passos da tumorigênese e metástase (MILLIMAGGI et al., 2006; TARIN; THOMSON; NEWGREEN, 2005).

É imperativo salientar que a progressão tumoral é marcada por alterações genéticas que controlam a interação entre as células e matriz extracelular, e também controlam os programas de sinalização capazes de estimular ou reprimir a proliferação celular (CROWE et al., 2002; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Muitas vezes essas alterações estão refletidas na morfologia e no comportamento das células neoplásicas, principalmente naquelas localizadas na frente de invasão tumoral (ACKLAND et al., 2003).

As células da frente de invasão separam-se da massa tumoral, são funcionalmente independentes e apresentam uma perda de sensibilidade à apoptose, conferindo a essas células uma maior agressividade. A perda da adesão associada à capacidade de degradação da matriz extracelular e ganho de potencial de migração são passos importantes para que ocorra a invasão tecidual (CHRISTOFORI, 2006; KUDO et al., 2004) e em alguns casos de carcinomas, essas alterações ocasionam modificações morfológicas que são refletidas na aquisição de um fenótipo fusiforme. Essas alterações morfológicas delimitam o que se chama de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e são resultado direto da supressão da expressão de genes epiteliais e da aquisição da expressão de genes mesenquimais (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996; JOO; LEE; KANG, 2003; JOTHY et al., 2003).

Além da transição epitélio-mesenquimal fazer parte da progressão tumoral, fisiologicamente também se observa tal transição como no desenvolvimento embrionário, na inflamação crônica e na fibrose (BALKWILL, 2004; KALLURI; NEISON, 2003; NAWSHAD; LAGAMBA; HAY, 2004).

No desenvolvimento, a TEM é requerida para movimentos morfogênicos como por exemplo para a formação da endoderme e da gastrulação, assim como

durante a formação de órgãos e tecidos (crista neural, coração, sistema músculo-esquelético, estruturas crânio-faciais e sistema nervoso periférico) (THIERY, 2002).

No contexto da carcinogênese, a transição epitélio-mesenquimal tem sido estudada como o aumento da intensidade destes processos nos modelos de cultura de células epiteliais e modelos em ratos (EGER; MIKULITS, 2005; GOTZMANN et al., 2004; THIERY, 2003). Vários genes que induzem a TEM são ativados nos modelos tumorais e há a formação de uma complexa cascata de eventos (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005).

A capacidade da célula neoplásica migrar e invadir permite sua mudança de posição no interior dos tecidos. Desta forma, as células conseguem atingir os vasos sanguíneos ou linfáticos, disseminam para dentro da circulação e então, crescem em órgãos distantes (KUDO et al., 2004).

No entanto, em estudos de amostras cirúrgicas, patologistas não identificaram células tumorais com morfologia mesenquimal vistas nos estudos de transição epitélio-mesenquimal realizados em cultura de células. Observaram apenas alterações compatíveis com esse processo de transição (GAVERT et al., 2005; TARIN; THOMPSON; NEWGREEN, 2005). Devido a essas características relatadas, a fase da invasão tumoral é frequentemente estudada em cultura de células cancerígenas em conjunto com reações de imunoistoquímica das amostras de células tumorais (GAVERT; BEN-ZE'EV, 2008).

2.5 Vimentina

2.5.1 citoesqueleto e filamentos intermediários

O Citoesqueleto das células eucariontes é composto por complexos protéicos fibrilares, formados pela polimerização de proteínas globulares. Sua principal função é coordenar a distribuição de organelas na célula e orientar sua forma. Além destas funções citadas, o citoesqueleto é também responsável pela sustentação, resistência da célula, alterações de forma e da distribuição de organelas desencadeadas por interações entre a célula-matriz extracelular e entre células diferentes (HERMANN et al., 2003).

O Citoesqueleto é formado por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos ou a associação entre eles. Essa complexa rede citoplasmática pode ligar-se à membrana plasmática e às membranas de outras organelas através de interações com certas proteínas associadas. É uma estrutura dinâmica, que se altera através de variações entre as taxas de polimerização e despolimerização (HERMANN; AEBI, 2004).

Inicialmente, o termo filamento intermediário foi criado para nomear a classe de filamentos descobertos em cultura de células derivadas do músculo esquelético de embrião de galinha através da microscopia eletrônica. Esses filamentos de 7-11 nm de diâmetro apresentaram diâmetro intermediário entre os filamentos de actina (5-6 nm) e de miosina (20-25 nm) (HERMANN et al., 1996).

Atualmente, os filamentos intermediários se encontram agrupados em 6 subclasses distintas. A classe I é representada pelo grupo de queratinas ácidas e a classe II pelas queratinas básicas, ambas encontradas em células epiteliais. A classe III é formada pelos filamentos de vimentina (células mesenquimais), desmina (células musculares), GFAP - proteína glial fibrilar ácida (glia e astrócitos) e periferina (neurônios do sistema nervoso periférico). A classe IV, é expressa em neurônios do sistema nervoso central e inclui os neurofilamentos e α -internexina. Já as classes V e VI são formadas pela laminina e nestina, respectivamente (HERMANN; AEBI, 2000, 2004).

Vale ressaltar que mais de uma classe de filamentos intermediários podem ser encontradas na mesma célula e o mesmo filamento pode conter mais de um tipo de subunidade protéica. Estas variações se tornam evidentes quando a composição de um determinado filamento intermediário é examinada em diferentes tipos celulares ou em diferentes estágios de diferenciação de um tipo celular, o que poderia acrescentar à definição de filamentos intermediários o fato da expressão e a função dos mesmos serem reguladas pelo estágio de desenvolvimento da célula (MACHADO; FIGUEIREDO, 1996).

Os filamentos intermediários são complexas cadeias prevalentemente localizadas na região perinuclear, circundando e posicionando o núcleo. Continuamente a essa rede perinuclear, há uma extensão radial desses filamentos por todo o citoplasma que pode gerar associações com a superfície celular, concentrando-se nas áreas contendo desmossomos, hemi-desmossomos e outras estruturas envolvidas na adesão celular (KLYMKOWSKY, 1995).

Estruturalmente, os filamentos intermediários possuem, em comum, um domínio tripartido com domínios amino não helicoidal (cabeça) e terminal carboxil

(cauda), ladeando a região central α -helicoidal de aproximadamente 310 aminoácidos (OMARY et al., 2006; STEINERT; PARRY, 1985). Uma característica do domínio central, a qual acredita-se ser importante para a formação de grandes estruturas pelos filamentos intermediários, é a presença disseminada de regiões de α -hélice com sequência de sete aminoácidos que se repetem (FLIEGNER; CHING; LIEM, 1990).

No entanto, é sabido que somente os domínios amino não helicoidal e terminal carboxil (regiões da cabeça e cauda, respectivamente) podem ser fosforilados e a sua desfosforilação tem papel na regulação da organização estrutural e função dos filamentos intermediários no comportamento das células e tecidos específicos (HELFAND; CHANG; GOLDMAN, 2004). Portanto, a fosforilação é a chave regulatória da dinâmica dos filamentos intermediários, modulando a organização da rede de filamentos e a distribuição subcelular das proteínas desses filamentos (OMARY et al., 2006).

2.5.2 vimentina – estrutura, funções e participação na carcinogênese

Entre a grande família de proteínas do filamento intermediário, a vimentina é o principal membro.

O filamento de vimentina é formado pela união de dois homodímeros pelo domínio central, dando origem a dímeros. Os dímeros podem se associar e formar tetrâmeros que se reúnem em protofilamentos gerando, então, os filamentos de vimentina (HERMANN; AEBI, 2004).

A vimentina é um filamento intermediário (10 nm de diâmetro) de 52-58 Kd, presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual (IVASKA et al., 2007; LAZARIDES, 1980). Além disso, essa proteína possui um alto grau de homologia entre as espécies, desde peixes e *Xenopus* até humanos, sugerindo algum papel importante no processo fisiológico evolutivo devido a sua conservação entre as espécies (SCHAFFELD et al., 2001).

Segundo a definição de Lazarides (1982), os filamentos intermediários compreendem uma complexa classe de proteínas que possuem regiões de homologia na sequência de aminoácidos, bem como extensas áreas de divergências entre os mesmos. A existência de áreas estruturalmente homólogas poderiam também permitir a copolimerização de duas ou mais subunidades, como é o caso da vimentina e desmina, vimentina e GFAP e vimentina e várias citoqueratinas.

A maior parte das células de origem mesenquimal ou não mesenquimal, e, também, células mantidas em cultura possuem filamentos de vimentina, que podem ser diferenciados imuno e bioquimicamente das outras classes de filamentos intermediários (FRANKE et al., 1978).

A proteína vimentina tem mostrado participação em um grande número de funções críticas, freqüentemente relatada na organização de proteínas envolvidas na adesão celular, na migração, na sinalização celular, na ancoragem do núcleo das células e no posicionamento de suas organelas no citoplasma, sendo portanto, uma molécula integradora mecânica do citoplasma celular. Muitas de suas funções têm sido descobertas através de estudos dirigidos para a regulação da vimentina

associados a sua fosforilação. No entanto, suas funções ainda são desconhecidas (HENDERSON; WEBER, 1980; IVASKA et al., 2007; LAZARIDES, 1980).

A fosforilação da vimentina tem papel na regulação da união e desunião destes filamentos. Quando ocorre a sua fosforilação no domínio da cabeça pelas proteínas quinase A e C, pode se ter, *in vitro*, um bloqueio das subunidades de fosforilação e a desunião pré-existente desses filamentos suportam a idéia que a fosforilação de certos sítios específicos no domínio da cabeça sejam capazes de induzir a desunião dos filamentos intermediários (ERIKSSON et al., 2004).

Vários dos identificados sítios de fosforilação são controlados por diferentes isoformas das proteínas quinases. Essas quinases estão intimamente ligadas à regulação da adesão celular mediada pela integrina e pelo tráfego endo-exocítico de receptores que facilitam a motilidade celular (PARSONS et al., 2002; WOODS et al., 2004).

Chou, Ngai e Goldman (1991) observaram *in vivo* que durante o processo de mitose, ocorria o desligamento dos filamentos de vimentina e este era acompanhado pela hiperfosforilação da subunidade da serina 55 no domínio terminal.

Estudos realizados em ratos knockout para a vimentina revelaram que a perda desta proteína gera, por exemplo, alterações morfológicas em células da glia, prejudica a cicatrização de feridas devido a defeitos na capacidade dos fibroblatos migrarem, causa distúrbios dos leucócitos nos nódulos linfáticos e perda da integridade no endotélio vascular. Portanto, esses resultados obtidos evidenciam as características de uma molécula integradora e organizadora da sinalização e da adesão celular desempenhado pela vimentina (COLUCCI-GUYON et al., 1999; ECKES et al., 2000; NIEMIEN et al., 2006).

Esse filamento identifica o tecido mesenquimal e esta especificidade encontrada nas células normais, como acontece com os demais filamentos intermediários, é mantida, na maioria das vezes após a transformação neoplásica (ANDERTHON, 1981; ERLANDSON, 1984; OSBORN; WEBER, 1983; RAMAEKERS et al., 1983).

Sabe-se, entretanto, que em situações especiais a vimentina passa a ser exibida por células não mesenquimais. Assim é que muitas células malignas e não malignas de origem não mesenquimal, adquirem a expressão da vimentina quando perdem sua orientação tridimensional (ARAÚJO et al., 1993; CASTILHO, 2003; JANDA et al., 2002).

Carcinomas epidermóides passam a expressar a vimentina nas células mais indiferenciadas das áreas de invasão e esse processo ocorre sempre acompanhado da perda de marcadores epiteliais, como as caderinas-E, ZO-1 e desmoplaquinas. Portanto, a vimentina é um marcador para a transição epitélio-mesenquimal em carcinomas epidermóides (CASTILHO, 2003; SOMMERS et al., 1989; TAKI et al., 2003). Alguns estudos sugerem que a expressão da vimentina pode ser detectada mesmo antes das células tumorais exibirem a morfologia mesenquimal (ARAÚJO et al., 1993; PRAHLAD et al., 1998).

A expressão de vimentina por células epiteliais neoplásicas em cultura está associada a invasividade de carcinomas de mama, de bexiga e cervicais sendo, também, acompanhada da perda da caderina-E e de outras moléculas de adesão (GILLES et al., 1999; SAVAGNER et al., 1994; SOMMERS et al., 1989; THOMPSON et al., 1992). O gene promotor da vimentina é alvo da via beta-catenina/TCF e está implicado na regulação da migração epitelial e invasão de células neoplásicas em carcinomas de mama (MORIN, 1999).

As células epiteliais polarizadas de tumores derivados de glândula e de carcinoma epidermóide têm mostrado a expressão da vimentina *in vivo* e sua expressão foi correlacionada com o pobre prognóstico (ISLAM et al., 2000). Além disso, *in vivo*, houve uma diminuição da expressão desta proteína nos casos de carcinoma bem e moderadamente diferenciados (MANDAL et al., 2008).

Ghosh et al. (2002) realizaram o ensaio de câmara de invasão e imunofluorescência em células derivadas de queratinócitos gengivais pré-malignos e de carcinoma epidermóide oral. Com esse estudo, os autores puderam concluir que a aberrante expressão da vimentina está ligada à alteração na morfologia e no comportamento da célula, uma vez que foi observado aumento da expressão desta proteína nas células neoplásicas e naquelas que atravessaram o Matrigel®.

Portanto, a elucidação do mecanismo de “cross-talk” entre os filamentos intermediários e vias de sinalização intracelular pode contribuir para o melhor entendimento do desenvolvimento, invasão e metástase tumoral.

2.6 Matriz extracelular

A membrana basal é uma camada de 50-100 nm constituída por um complexo de proteínas especializado encontrado na região basolateral de todas as células de monocamada do corpo. Essa estrutura pode ser identificada via microscopia eletrônica de transmissão (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007).

A matriz extracelular é constituída por colágeno tipo IV (KEFALIDES, 1973), glicoproteína, laminina (CHUNG et al., 1979), entactina (CARLIN et al., 1981),

nidogênio (TIMPL et al., 1983) e heparan sulfato (KANWAR; FARQUHAR, 1979). Os polímeros de colágeno e laminina formam uma rede em que o nidogênio e a entactina agem como pontes entre essas moléculas criando ancoragem para diversos outros componentes (YURCHENCO; O'REAR, 1994). Assim sendo, a matriz extracelular é uma estrutura importante no controle do comportamento celular influenciando o desenvolvimento, migração, proliferação, morfologia e função das células (ALBERTS et al., 1994; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007).

As pesquisas realizadas no passado focavam o estudo dos componentes epiteliais e mesenquimais individualmente, ignorando o importante papel das interações epitélio-mesenquimais na carcinogênese. No entanto, nos últimos anos, começou-se a estudar a interação entre os componentes supracitados e o microambiente de interface hospedeiro-tumor que contribui para o desenvolvimento das células neoplásicas (RADISKY; BISSEL, 2004).

A interação da superfície celular com a matriz extracelular (MEC) apresenta uma ampla série de conseqüências para uma variedade de processos patobiológicos. Desta maneira, a matriz extracelular possui papel crítico no estabelecimento de fenótipos diferenciados em vários tecidos. As evidências mais fortes dessa atividade vieram de observações de células transformadas que apresentavam interações anormais com seu ambiente. Através da correlação da interação célula-matriz extracelular foi possível restaurar a função diferenciada normal das células tumorais apesar de suas anormalidades fenotípicas (BOUDREAU; BISSEL, 1998).

O carcinoma é formado por células epiteliais coesivas, ligadas pela caderina-E baseado na junção célula-célula e são inicialmente separadas de um estroma pela membrana basal, uma especializada estrutura da matriz extracelular, que

fornece corretas informações para as funções celulares. Portanto, o ganho de acesso para o interior do comportamento estromal é resultado do vencimento das células cancerígenas as forças físicas fornecidas tanto pela adesão célula-célula como pela barreira da membrana basal (GUARINO, 2007).

2.6.1 modelo tridimensional e Matrigel®

Culturas orgânicas têm sido realizadas, mas o limitado número de células disponíveis para estudos estruturais e morfo-funcionais dificulta a análise das células em sua matriz extracelular nativa. Para tentar solucionar esse problema, iniciou-se a procura por um modelo de cultura alternativo (BATTISTELLI et al., 2005).

Estudos de cultura celular são frequentemente realizados num substrato sintético como vidro (lamínulas de vidro) e plástico (placas e garrafas para cultura) que forçam a célula ajustarem-se ao plano artificial e a superfície rígida fornecida por esses materiais. Apesar deste modelo de cultura celular bidimensional *in vitro* fornecer um conveniente e rápido resultado para análises bioquímicas, ele não mostra as propriedades encontradas no microambiente tecidual *in vivo*. Portanto, os modelos bidimensionais possuem uso limitado para estudos de funções específicas e sinais estruturais dos tecidos (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Estudos indicam que muitas dessas funções específicas, tais como motilidade de fibroblastos, progressão tumoral do melanoma e a polarização e a diferenciação das células epiteliais podem ser mimetizados em micro-ambientes

tridimensionais, sendo essa situação fisiológica melhor que a superfície bidimensional (ABBOTT, 2003; GRIFFITH; SWARTZ, 2006; NELSON; BISSEL, 2005; RAINES, 2000).

Desta maneira, os modelos tridimensionais de cultura celular permitem estudos em cenários que lembram o ambiente *in vivo* e, portanto, podem facilitar o entendimento de sinais que regulam a função normal dos tecidos e como esses sinais podem ser alterados nas patologias (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Kitamura (2004) observou que as células cultivadas em mono-camada apresentavam características morfo-funcionais completamente diferentes das células originais, havendo a necessidade do estabelecimento de um modelo tridimensional para restaurar respostas fisiológicas de condrócitos diferenciados.

Shaw, Wrobel e Brugge (2004) mostraram em seu estudo que o sistema de cultura tridimensional fornece modelos úteis para o entendimento de como os genes do câncer desfazem as interações biológicas de células individuais com seus arredores. Dessa forma, esse sistema de cultivo celular tem se tornado uma valiosa ferramenta para o entendimento da iniciação e progressão tumoral, incluindo os fenótipos adquiridos na fase de invasão da membrana basal.

Como a pele e a mucosa oral são compostas por epitélio pavimentoso estratificado, o modelo de cultura tridimensional já foi descrito como adequado para a investigação da influência de fármacos na morfologia, na função e na diferenciação dos queratinócitos *in vitro* (LEE et al., 2005). Outros estudos também mostraram respostas diferentes a agentes quimioterápicos em cultura celular quando técnicas de cultivo bi e tridimensional são comparadas (DURAND; OLIVE, 2001; WEAVER et al., 2002).

Logo, a cultura em ambiente tridimensional não só recapitula a estrutura e função epitelial normal, mas também pode permitir maiores detalhes do entendimento da disfunção tecidual nas patologias, além de oferecer um mecanismo mais realista para um modelo de intervenção terapêutica.

Vários substratos têm sido utilizados no cultivo celular tridimensional *in vitro*, como por exemplo colágeno tipo I, Matrigel®, alginato, ácido hialurônico, gelatina e hidrogéis baseados em acrilato, na tentativa de melhorar a estimulação mecânica e química das células (GOTTWALD et al., 2007; LING et al., 2007; TOH, et al., 2007).

O Matrigel® é uma substância composta por moléculas da matriz extracelular obtida de extrato preparado a partir da membrana basal do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Seus maiores componentes incluem a laminina, o colágeno tipo IV, o heparam sulfato, a entactina e o nidogênio. Essa matriz reconstituída se apresenta na forma de gel que é biologicamente ativa e estimula o crescimento e a diferenciação celular (KLEINMAN et al., 1985).

O crescimento no Matrigel® tem sido usado para estudar a habilidade de formação de colônias em células transformadas e para identificar o fenótipo invasivo das novas células tumorais (DOLO et al., 1994), uma vez que as células epiteliais cultivadas sobre esse substrato respondem de maneira similar às interações encontradas no tecido de origem para apropriadas proteínas da matriz (SODUNKEA et al., 2007).

As células de carcinoma de próstata e células derivadas de metástase em osso foram capazes de organizar estrutura tridimensional no Matrigel®, assim como formar grandes colônias ramificadas, estruturas ductais e grupos de células proliferativas (MILLIMAGGI et al., 2006).

Resultados semelhantes foram obtidos quando se cultivou células epiteliais imortalizadas de mama no interior do matrigel. As células sofreram um programa morfogênético que culminou na formação de estruturas semelhantes a ácinos, lembrando a arquitetura do epitélio normal (MUTHUSWAMY et al., 2001).

Considerando que a membrana basal é capaz de influenciar a diferenciação e o comportamento celular, inclusive alterando o fenótipo das células, e que para haver a invasão neoplásica é necessário a degradação dos componentes dessa matriz na frente de invasão, faz-se necessário estudar seu contato com células neoplásicas dando ênfase nas proteínas responsáveis pela sua degradação.

3 PROPOSIÇÃO

Com vista no acima exposto, o objetivo do presente estudo é analisar qualitativamente e quantitativamente a expressão da vimentina em linhagens celulares provenientes de carcinoma epidermóide de boca, cultivadas em arranjo tridimensional sobre Matrigel®.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o número 134/05 (Anexo A).

4.1 Cultivo Celular

Para realização desse estudo foram utilizadas 3 linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço humanas: uma linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de boca (HN30), uma linhagem de carcinoma epidermóide metastática (HN31) e uma linhagem de carcinoma epidermóide que apresenta aumento constitutivo de EGFR (HN6). As linhagens HN30 e HN31 apresentam níveis normais de EGFR. Como controle, foi utilizada uma linhagem de queratinócitos com mutação induzida no gene p53 (Hacat).

A origem e o estágio do tumor segundo o critério TNM podem ser visualizados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Origem das linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e sua classificação segundo o critério TNM (CARDINALI et al., 1995)

	HN6	HN30	HN31
ORIGEM	Base de língua	Faringe*	Linfonodo *
ESTÁGIO CLÍNICO	T3N2bM0	T3N0M0	T3N0M0

*Indica par de linhagens celulares oriundas do mesmo paciente

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 2 minutos e transferidas para frascos de cultivo. As quatro linhagens foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica – antimicótica (Sigma). As células foram mantidas em frascos a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Toda a manipulação ocorreu em capela de fluxo laminar. O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase, e o meio de cultura foi trocado em média a cada 48 horas de acordo com o metabolismo celular.

Após atingirem a sub confluência, as células foram subcultivadas dando origem a uma nova passagem. De cada passagem, uma amostra das células crioprotegida com 5-10% de di-metil sulfoxido (DM 50 – Sigma) foi congelada e mantida em recipientes contendo nitrogênio líquido.

4.2 Plaqueamento das linhagens celulares em membrana basal reconstituída (Matrigel®) e fixação do material

A preparação do Matrigel® (Collaborative Research Inc., Waltham, MA, USA) visou o crescimento de células em ambiente tridimensional e permitiu a interação desse substrato com toda a membrana citoplasmática.

O Matrigel® foi descongelado “overnight” em refrigerador a 4°C, para evitar sua geleificação prematura. Toda a manipulação do Matrigel® ocorreu à

temperatura de 4°C. As pipetas utilizadas em sua preparação, bem como as placas contendo as lamínulas, foram previamente resfriadas a 4°C, conforme instruções do fabricante.

Frascos de cultivo de 75 mm das linhagens HN30, HN31, HN6 e HacaT em subconfluência foram removidas dos frascos por tripsinização, centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso diretamente em Matrigel® 1:2 em DME sem soro fetal bovino. O Matrigel® contendo as células foi depositado dentro de tubos de congelamento para o crescimento tridimensional, que e em seguida, foi mantido à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As células permaneceram em contato com o Matrigel® pelo período de 3 dias, em condições de cultivo descritas previamente. Após esse período, o material foi fixado em paraformaldeído a 4% em PBS por 24 horas. Depois de fixadas, as células em Matrigel® foram levadas a centrífuga e foram submetidas a um único pulso de centrifugação para que o concentrado de células (células + Matrigel®) fosse depositado no fundo do tubo. O fixador foi então removido e o material foi submetido à desidratação em bateria de etanol crescente (50, 70, 90, 96 e 100% por 10 minutos). O último banho de álcool foi removido do tubo e o concentrado de células foi ressuspenso em Histogel (Perk Scientific, Inc. Devon PA, USA) previamente aquecido em banho-maria. O tubo contendo o concentrado de células em Histogel foi colocado na geladeira por 10 minutos para o endurecimento do material e em seguida foi cortado para a liberação do bloco de histogel endurecido. Nova desidratação foi procedida utilizando inicialmente a mesma bateria de álcool acima descrita por 30 minutos e posteriormente solução de álcool/xilol (1:1) por 30 minutos e xilol puro por 1 hora. Por fim, o concentrado de células em histogel foi emblocado em parafina para a confecção de cortes histológicos.

Como controle, foram utilizadas células HN30, NH31, HN6 e Hacat crescidas na ausência do Matrigel® e submetidas aos mesmos passos descritos anteriormente.

4.3 Análise histológica e imunoistoquímica

Após secções de 5 micrometros, os cortes foram hidratados em cadeia de etanol descendente (absoluto I, II, III, 95% e 85%, por cinco minutos cada), corados pela hematoxilina e eosina, desidratados em cadeia de etanol ascendente (80, 90, 100% por 3 passagens) e xilol puro por duas passagens, montados sob lâminulas de vidro e solução de Permount (Fisher Scientific Fair Law, NJ, USA) e observados em microscopia de luz.

Outros cortes de 3 micrometros foram montados em lâminas preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano 10% (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) em etanol 100% e foram submetidos à técnica de imunoistoquímica utilizando-se anticorpo contra vimentina. Brevemente, cortes histológicos foram desparafinados em 2 banhos de xilol (15 minutos à 59°C e 15 minutos à temperatura ambiente). Em seguida, os cortes foram hidratados em cadeia descendente de etanol (absoluto I, II, III, 95% e 85%, por três minutos cada) e imersos por 5 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% com etanol a 95% para a remoção de pigmento formólico. As lâminas foram lavadas em 2 banhos de água destilada por 5 minutos cada.

A recuperação do antígeno para a vimentina foi feita com imersão por 30 minutos em ácido cítrico, com pH 6,0, mantido em banho-maria à 95°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de água destilada por 5 minutos cada. Foi então realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual através de duas passagens em solução de peróxido de hidrogênio e metanol a 6 % (v/v 1:1) por 15 minutos cada. Após essa etapa, as lâminas foram novamente lavadas em água destilada. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de Tris (pH 7,4) por 5 minutos, e após uma troca da solução de Tris as lâminas foram processadas automaticamente no DAKO Autostainer Universal Staining System™.

Brevemente, a técnica imunoistoquímica foi realizada pelo complexo avidina-biotina-peroxidase. A diluição do anticorpo primário foi 1:800 (vimentina). Em seguida iniciou-se a incubação do anticorpo secundário polivalente (anti-mouse) seguido pelo complexo terciário (L.V. Dako LSAB + kit, HRP, Dako Corporation, CA, USA). A revelação da reação foi realizada com substância cromógena de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4' - tetraaminobiphenyl-tetrahydrochloride, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e a contracoloração foi realizada com solução de hemtoxilina de Mayer.

Os cortes histológicos sofreram desidratação em cadeia de etanol ascendente (80, 90, 100% por 3 passagens) e xilol puro por duas passagens. As lâminas foram então montadas com lamínulas de vidro e solução de Permount (Fisher Scientific Fair Law, NJ, USA).

O resultado das reações foi avaliado através da observação das lâminas em microscopia de luz e a documentação foi realizada por captura digital das imagens em câmera digital IIICCD modelo DC330E, DAG-MTI INC, Michigan, IN-USA acoplada a microscópio (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e a

computador Power Macintosh (9600/200MP, Apple Computer, INC, Cupertino, Califórnia 95014, USA).

4.4 Plaqueamento das linhagens celulares sobre membrana basal reconstituída (Matrigel®) e análise da imunofluorescência

Foi também plaqueado Matrigel® sobre lamínulas de vidro com a finalidade de analisar a relação do padrão de marcação e a indução de fenótipo mediada pela matriz extracelular. Toda a manipulação do material foi realizada como descrito previamente.

Primeiramente foi calculado a área da lamínula de vidro e colocado sobre toda a extensão da mesma 150 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ da mistura de Matrigel® com meio sem soro na proporção 1:3. Para que ocorresse a total geleificação do substrato, as lamínulas foram colocadas na estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período de espera, foram plaqueadas 3×10^5 células das linhagens HN30, HN31, HN6 e Hacat sobre o Matrigel®. Essas células permaneceram em contato com a membrana basal reconstituída por 48 hoas.

Como controle foi realizado o mesmo experimento, porém as linhagens cresceram em única camada sobre lamínulas de vidro até atingirem a semi-confluência sem adição de Matrigel®.

As lamínulas contendo as células foram lavadas em PBS e em água Milli-Q, e foi acrescentado, depois da lavagem, metanol suficiente para cobrir as lamínulas.

O metanol foi deixado em contato com as células por 6 minutos no freezer. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS, água destilada e água Milli-Q, nesta seqüência. Após as lavagens, foi colocada sobre as lamínulas 50 µL de solução de PBS + BSA a 1% por 30 minutos e então, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS, água destilada e água Milli-Q.

O anticorpo primário contra a vimentina (clone V9- Dako A/S, Denmark) estava na concentração de 1:50 diluído em PBS+BSA a 1% e reagiu por 90 minutos em geladeira. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas na seqüência de soluções já citada. Após tal lavagem, foi colocado sobre as lamínulas o anticorpo secundário (Fluoresceína anti-mouse IgG (H+L) – Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) na concentração 1:50 diluído em PBS+BSA a 1% por 45 minutos, e a reação ocorreu na ausência de luz. Lavou-se novamente as lamínulas com PBS, água destilada e água Milli-Q, para posterior montagem das lâminas com Vecta Shild (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010). As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor, e foram armazenadas na geladeira na ausência de luz para posterior análise no microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.5 Western-blotting (Burnette, 1981)

Foi realizada a extração das proteínas tanto das células cultivadas em Matrigel® como as cultivadas sem esse substrato.

4.5.1 extração protéica de células cultivadas em Matrigel®

As linhagens acima citadas foram cultivadas em frascos de cultivo de 75 mm² até estarem em confluência. Posteriormente, foram removidas dos frascos por tripsinização, centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado diretamente em 1 ml de Matrigel® na diluição de 1:2 em DME sem soro fetal bovino. A manipulação do Matrigel® foi realizado como anteriormente descrito.

O Matrigel® contendo as células foi depositado dentro de tubos de congelação para o crescimento tridimensional, que e em seguida, foi mantido à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As células permaneceram em contato com o Matrigel® pelo período de três dias e sob as condições de cultivo descritas previamente. Após esse período, as células foram lisadas para a realização da técnica de Western Blot.

Primeiramente foi adicionado 0,5 ml de PBS 1X no tubo de congelação contendo células mais Matrigel®, seguido de centrifugação à 15.000 rpm por 10 minutos à 4°C. Após a centrifugação, foi sugado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de tampão RIPA+ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10 mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 1 Mm PMSF) e a solução ficou em contato com o precipitado por 10 minutos em gelo. Posteriormente, o conteúdo contido no tubo de congelação foi centrifugado a 15.000 rpm por mais 40 minutos à 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado à -80°C.

4.5.2 extração protéica de células cultivadas na ausência do Matrigel®

Após remover o meio de cultura, as placas contendo as células em 85% de confluência foram lavadas 3 vezes com PBS 1X a frio e colocadas sobre o gelo (4°C). A extração protéica foi realizada com tampão RIPA+ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10 mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 1 mM PMSF) por 10 minutos. As placas foram raspadas e as amostras centrifugadas à 15.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado à -80°C.

4.5.3 western blot propriamente dito

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconínico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce). Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na sua redução e consequente formação de um complexo (peptídeos mais o cátion cuproso - Cu^+). O ácido biocinconínico, por sua vez, reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu^+ que produz uma cor púrpura. Essa cor é lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm. Portanto, quanto mais intensa for a cor púrpura, mais absorção de luz ocorrerá, significando maior quantidade de proteína.

As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos com sample buffer (3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) para a denaturação das proteínas. Em seguida, foram submetidas à SDS-PAGE em géis de acrilamida, conforme a tabela 4.2.

Tabela 4.2- Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de Separação 15% (total 40 ml)	Gel de empilhamento 5% (total 20ml)
H₂O Milli Q	9,5	12
Acrilamida/bisacrilamida		
30%	20	2,6
Tampão de separação	10	-
Tampão de empilhamento		
(4X conc.)	-	5
10% SDS	0,4	0,2
10% persulfato de amônio	0,2	0,1
Temed	0,01	0,01

A eletroforese foi realizada à 120 V durante 3 horas. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope® (Biuo Rad, Hercules, Califórnia, USA).

A transferência das proteínas que migraram do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond-P, Amersham) foi feita por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Höefer, mini VE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) utilizando-se o tampão de transferência (48 mM Tris Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) conforme recomendações do fabricante. A transferência foi realizada à 30 V por 3 horas.

Após o término da transferência, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST (150 mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween 20) por 2 horas em temperatura ambiente, sob

agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida, lavou-se a membrana com TBST e foi colocado o anticorpo anti-vimentina (Santa Cruz®) diluído em solução de bloqueio na concentração 1:100. Essa solução ficou em contato com a membrana “overnight” à temperatura ambiente e sob agitação. Posteriormente, foi realizadas 3 lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST sob agitação, à temperatura ambiente. Incubou-se o anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio aplicado por 1 hora, e depois lavado três vezes, sendo uma vez em TBST por 5 minutos e duas vezes com PBS por 10 minutos.

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Bio-Rad. Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25 ml para cada cm² da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado, foi adicionado 0,2 ml de substrato Opti-4CN, que após ser bem misturado, foi colocado sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30 minutos, no escuro, depois lavada em água deionizada por 15 minutos, e pronta para documentação.

Como controle foi utilizado anticorpo gerado em camundongo β -actina (Sigma).

5 RESULTADOS

5.1 Linhagem Haca

A linhagem Haca cultivada sem a presença de Matrigel®, quando corada por hematoxilina e a eosina (HE), mostrou-se sem pleomorfismo na morfologia celular, exibindo formato arredondado e não houve praticamente alteração no tamanho celular. O núcleo ora era localizado centralmente, ora excêntricamente, e por vezes, de volume aumentado (Figura 5.1 A).

Quando em contato com o Matrigel®, as células apresentaram-se bem adaptadas a esse substrato mostrando-se geralmente arredondadas, porém houve uma maior variação no tamanho celular quando essas células foram comparadas as células plaqueadas sem Matrigel®. A localização nuclear central e excêntrica foi mantida e a relação núcleo-citoplasma continuou por vezes aumentada. Em algumas células foi possível observar condensação na cromatina (Figura 5.1 B).

Tanto na imunoistoquímica como na imunofluorescência quando as células são cultivadas na presença e ausência de Matrigel® não houve marcação para o anticorpo vimentina (Figuras 5.2 A e B; 5.3 A e B; Tabelas 5.1 e 5.2).

5.2 Linhagem HN6

Em células cultivadas na ausência de Matrigel®, observou-se na coloração por HE células de formato arredondado, porém com maior variação no tamanho celular quando células HN6 são comparadas com células HaCat. Em relação ao núcleo, pôde-se notar pleomorfismo, aumento de volume e alteração na sua localização, sendo que este, por vezes era visto na periferia celular. Houve também alteração na relação núcleo-citoplasma. Não foi observada qualquer figura de mitose (Figura 5.1 C).

As células cultivadas no Matrigel® apresentaram-se pleomórficas com morfologia irregular, sendo umas maiores e outras menores, embora a maioria exibisse formato arredondado e ovalado (Figura 5.1 D). Notou-se, também, que existiam células em divisão e raras células binucleadas. O núcleo se mostrou pleomórfico, volumoso, geralmente hipercromático e localizando por vezes no centro da célula, e por vezes excentricamente (Figura 5.1 D). A cromatina, muitas vezes, apresentou-se bastante irregular e dispersa pela célula. Aparentemente, as células em contato umas com as outras mostraram alteração na morfologia, exibindo tamanho mais volumoso e perdendo o aspecto circular observado em células isoladas. É importante salientar que de um modo geral, quando as células HN6 foram cultivadas em Matrigel®, elas apresentaram as mesmas características morfológicas encontradas em células cultivadas sem Matrigel®. No entanto, essas características celulares eram mais evidentes na presença do mesmo.

No exame imunoistoquímico, algumas células isoladas cultivadas na ausência do Matrigel® apresentaram-se positivas para a vimentina. A marcação foi

totalmente citoplasmática mas, na presença da membrana basal reconstituída, não foi observada nenhuma marcação (Figuras 5.2 C e D; Tabela 5.1).

A reação de imunofluorescência realizada para a vimentina exibiu positividade intensa em poucas células na presença e ausência de Matrigel®. No restante das células, não houve marcação ou essa se apresentava bastante fraca. Entretanto, algumas variações no padrão de marcação da vimentina foram observadas pela técnica de imunofluorescência, visto que por vezes a marcação exibia aspecto filamentoso e por vezes formava agregados citoplasmáticos dispersos. Esses padrões de marcação foram vistos tanto nas células cultivadas em ambiente tridimensional como nas células sobre lamínulas de vidro (Figuras 5.3 C e D; Tabela 5.2).

5.3 Linhagem HN30

A coloração pela técnica da Hematoxilina-eosina da linhagem celular HN30 cultivada sem Matrigel® mostrou células de formato arredondado e ovalado com variação no seu tamanho. O núcleo encontrava-se ora excêntrico, ora central, com diversos formatos e com o volume aumentado; que por vezes, ocupava quase toda a célula. Não foram observadas células em divisão (Figura 5.1 E).

No Matrigel®, algumas células mostravam-se pleomórficas mas a maioria exibia formato ovalado em arranjo difuso (Figura 5.1 F). Algumas figuras de mitose foram observadas. O núcleo ocupava quase toda a porção do citoplasma, era facilmente visualizado, possuía formato circular e, algumas vezes, estava localizado

no centro da célula, e em outros casos, o núcleo era excêntrico (Figura 5.1 F). Foi possível observar nucléolos e algumas células apresentam degeneração da cromatina, exibindo corpúsculos arredondados que assemelhavam-se à corpos apoptóticos. Havia células em contato, porém estas não possuíam alterações em sua morfologia. Os limites celulares eram facilmente visualizados.

Assim como na linhagem HN6, as características celulares eram mais evidentes na presença de Matrigel®.

A reação de imunoistoquímica para a proteína vimentina mostrou positividade nas duas formas de cultivo utilizadas (Figuras 5.2 E e F; Tabela 5.1). A marcação era citoplasmática e na região em que existia o contato entre as células não era possível observar positividade. Por outro lado, quando a célula se apresentava solta do conjunto celular, a marcação citoplasmática era visível. Além disso, algumas células possuidoras de núcleo vesiculoso mostraram-se positivas.

A reação de imunofluorescência para o anticorpo vimentina, com e sem uso do Matrigel® durante o cultivo celular exibiu positividade intensa em algumas células e na maioria das células restantes a marcação apresentava-se fraca. Nos maiores aumentos era possível visualizar que essa marcação era, geralmente, em forma de placas que facilitavam a visualização do citoplasma, nos casos sem Matrigel®. Nos casos com Matrigel®, houve uma prevalência do aspecto filamentosos (Figuras 5.3 E e F; Tabela 5.2).

5.4 Linhagem HN31

Observou-se que a linhagem celular HN31 cultivada sem Matrigel® possuía células de formato arredondado e ovalado e uma intensa variação de tamanho. Algumas células mostraram o núcleo bastante volumoso, ocupando quase a totalidade citoplasmática e muito pleomorfismo nuclear. Por vezes, o núcleo apresentou-se hipercromático e com localização central ou periférica (Figura 5.1 G).

Quando cultivadas no Matrigel®, houve numerosas células pleomórficas e geralmente de formato ovalado em arranjo difuso. Algumas figuras de mitose foram observadas. O núcleo ocupava quase toda a porção do citoplasma, era facilmente visualizado, possuía formato circular e, na maioria das vezes, estava localizado no centro da célula, sendo raros os casos de núcleo excêntrico (Figura 5.1 H). Havia células em contato, porém estas não possuíam alterações em sua morfologia (Figura 5.1 H). Os limites celulares eram facilmente visualizados. As características celulares também eram mais facilmente observadas quando as células eram cultivadas em Matrigel®.

No Matrigel®, quando a reação imunoistoquímica para a vimentina foi realizada, houve poucas células marcadas e essas se apresentavam isoladas do conjunto celular (Figura 5.2 H; Tabela 5.1). No experimento realizado sem esse substrato, houve imunonegatividade para essa proteína (Figura 5.2 G; Tabela 5.1).

Na imunofluorescência, a vimentina era intensamente positiva em poucas células e no restante, não houve marcação ou essa se apresentava bastante fraca (Figuras 5.3 G e H; Tabela 5.2).

5.5 Western Blotting

Pela técnica de Western Blot, tanto na presença como na ausência de Matrigel®, foi possível detectar a vimentina apenas nas linhagens de carcinoma epidermóide, sendo que a quantidade de proteína foi maior na ausência do Matrigel®. Comparando o cultivo normal com o 3D, foi notado um aumento de 1,17 para a HN30; 1,27 para a HN6 e 1,23 para a HN31. A linhagem HN30 foi a que apresentou maior quantidade, seguida da linhagem HN6, e posteriormente da linhagem HN31. Essa variação foi igualmente observada em ambas formas de cultivo celular (Figura 5.4).

Tabela 5.1 – Resultados da reação de imunoistoquímica para os ensaios realizados na presença e ausência de Matrigel®

LINHAGEM	HACAT	HN6	HN30	HN31
SEM MATRIGEL	-	+	+	-
COM MATRIGEL	-	-	+	-/+*

*Positividade apenas para raras células

Tabela 5.2 – Resultados da reação de imunofluorescência para os ensaios realizados na presença e ausência de Matrigel®

LINHAGEM	HACAT	HN6	HN30	HN31
SEM MATRIGEL	-	+	+	+
COM MATRIGEL	-	+	+	+

Figura 5.1- Linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31 coradas pela hematoxilina-eosina (HE)

Figura 5.2- Reação de imunoistoquímica para o anticorpo vimentina nas linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31

Figura 5.3- Reação de imunofluorescência para o anticorpo vimentina nas linhagens Hacat, HN6, HN30 e HN31

Figura 5.4- Representação gráfica dos valores da quantificação da proteína vimentina pelo Western Blot

6 DISCUSSÃO

Os mecanismos da carcinogênese e da progressão tumoral têm sido constantemente estudados para o entendimento da evolução neoplásica e para a busca de uma reposta terapêutica mais eficaz e menos agressiva para os tumores de modo geral.

As neoplasias malignas são responsáveis por uma grande parcela dos óbitos em todo o mundo e uma fonte de gasto com a saúde pública. No entanto, grandes investimentos e esforços têm sido empregados na identificação de novos marcadores e na compreensão dos intrincados mecanismos que viabilizam o desenvolvimento e progressão desta doença. Se fosse possível definir marcadores moleculares que indicassem o início ou o fim dos processos neoplásicos, poderia se identificar indivíduos com alto risco de desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca, e até mesmo aqueles que apresentassem lesão com potencial para a transformação maligna. Além disso, esses marcadores de malignidade ajudariam no estabelecimento de uma terapia mais apropriada e desta forma, haveria um aumento da sobrevida dos doentes. Devido ao fato do câncer bucal ser multifatorial e faltar conhecimento das interações existentes entre as diversas vias de sinalização, fica difícil determinar a extensão verdadeira de sua etiologia.

Inúmeros trabalhos vêm sendo publicados com o objetivo de caracterizar os tipos de filamentos intermediários expressos em determinados tipos celulares que sofreram transformação neoplásica, buscando assim, o seu diagnóstico diferencial com outras neoplasias que ocorrem no mesmo tecido ou em tecidos diferentes.

A transformação neoplásica se caracteriza por uma interação entre os fatores externos e internos ou genéticos, que irão culminar na perda da regulação da divisão, diferenciação e morte celular. Desta forma, as células neoplásicas conseguem escapar de seu sítio de origem, degradam a matriz extracelular, adquirem um fenótipo mais invasivo e finalmente, geram metástase (KUDO et al.; 2004; CHRISTOFORI, 2006).

Tanto o estímulo externo proveniente da matriz, quanto os estímulos internos, como alterações genéticas que controlam a interação entre as células e a matriz e controlam também os programas de sinalização são capazes de estimular ou reprimir a proliferação celular (HANAHA; WEINBERG, 2000). A somatória desses eventos associado com a perda de adesão, com a degradação da matriz, com o aumento da migração e alteração celular fazem com que ocorra a invasão tecidual e metástase (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996).

Com os avanços nas pesquisas, foi observado que cultura de células em ambiente bidimensional não são capazes de fornecer as características necessárias para que o comportamento celular *in vitro* seja semelhante ao *in vivo*, sendo mostrado, que às vezes, há a presença de células com morfologia diferente das células originais nesta forma de cultivo celular (RADISKY; BISSELL, 2004).

Além disso, muitos processos biológicos, tais como motilidade, progressão tumoral e a polarização e a diferenciação das células epiteliais podem ser mimetizados em micro-ambientes tridimensionais simulando uma situação fisiológica melhor que a superfície bidimensional (GRIFFITH; SWARTZ, 2006). Logo, há a necessidade de se estudar as células derivadas de carcinoma epidermóide em íntimo contato com a matriz extracelular.

Para mimetizar a matriz extracelular, foi usado neste estudo, o cultivo tridimensional em Matrigel® que possui alguns componentes em comum com a matriz extracelular humana, como por exemplo a laminina, o colágeno tipo IV, o heparan sulfato, a entactina e o nidogênio.

Os resultados demonstraram que as células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço quando cultivadas em Matrigel® apresentaram-se bem adaptadas, uma vez que houve aumento na quantidade de células após o período de contato com o Matrigel® e era possível visualizar mitoses. As alterações celulares e nucleares, como por exemplo, o pleomorfismo, foram mais intensas nas células cultivadas no Matrigel®.

Além disso, as células não apresentaram qualquer indício de sofrimento, o que poderia indicar uma não adaptação nesse ambiente tridimensional. Essa somatória de características morfológicas é facilmente explicada pela capacidade que o Matrigel® possui de mimetizar o microambiente em que a célula vive, já que nutrientes básicos para a sobrevivência celular estão presentes.

Embora bem adaptadas, as células não apresentaram em nenhuma das amostras estudadas alteração em sua morfologia no sentido de ganho de formato de fuso compatível com células de origem mesenquimal. *In vivo*, esse tipo de alteração fenotípica costuma ser descrita em células neoplásicas da frente de invasão tumoral que são capazes de degradar a matriz extracelular e invadir os tecidos adjacentes e em geral relaciona-se a um comportamento mais agressivo (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996). A metástase tumoral compreende uma seqüência de eventos relacionados ao crescimento local do tumor, invasão pela transmigração através da membrana basal, com conseqüente ganho da circulação, disseminação e sobrevivência no interior dos vasos, saída dos

vasos e fixação no novo sítio (LAMORTE et al., 2002). Uma vez desalojadas de seu sítio primário, as células neoplásicas pós-transição epitélio-mesenquimal devem manter a maquinária citoplasmática necessária para a efetiva migração, permitindo o espalhamento local e a disseminação no foco secundário. No novo sítio, as células devem ser capazes de se adaptarem e crescerem em colônias para posterior invasão, dando assim, continuidade ao ciclo (GUARINO, 2007).

Portanto, provavelmente, o Matrigel®, deve estar estimulando o crescimento e talvez a transdiferenciação celular para que, posteriormente, algumas células sofram processos que culminarão na aquisição de um fenótipo invasivo.

A teoria acima explicitada vai de encontro com os resultados obtidos na imunoistoquímica para a vimentina, na qual o padrão positivo para células desgarradas foi observado em algumas (raras) células da linhagem HN31 que é metastática, mas foi totalmente ausente nas linhagens Hacat e HN6. No entanto, essas células positivas apresentaram-se arredondadas e não fusiformes como era esperado.

Desta forma, pode-se supor que a influência do Matrigel® não foi suficiente para induzir ainda a morfologia fusiforme da frente de invasão tumoral, mas permitiu a adaptação para que eventualmente as células, num segundo momento, possam seguir seu destino natural causando a invasão e eventual metastáse tumoral.

Foi experimentado deixar as células em contato com o Matrigel® por um período maior para analisar se realmente as células passariam a exibir o formato de fuso, porém após o período de 3 dias o material se degradava, impossibilitando tal análise.

Dessa forma, podemos supor que num momento inicial, as células neoplásicas podem estar crescendo para formar as colônias e posteriormente, na

periferia dessas colônias irão surgir células capazes de degradar a matriz extracelular e invadir os tecidos adjacentes. Quando esse processo é mimetizado no cultivo tridimensional, as células da linhagem metastática HN31 que portanto, já adquiriram geneticamente a capacidade de invadir, expressam temporariamente a vimentina.

Na ausência do Matrigel®, a positividade para a vimentina nas linhagens HN6 e HN30 em algumas células, pode ser explicada devido ao fato dessas células estarem se preparando para invadir os tecidos adjacentes ou estarem respondendo ao estímulo de contato oferecido pelo vidro. Devido à técnica empregada para a avaliação das células usar a tripsinização e posterior centrifugação para formação de pellet, fica impossível avaliar se essas células que foram positivas encontravam-se na frente de invasão tumoral.

No entanto, apesar do resultado do cultivo sem Matrigel® para as linhagens HN30 e HN6 ser semelhante, quando essas mesmas linhagens celulares foram cultivadas em Matrigel®, o comportamento em relação à expressão de vimentina foi parcialmente diferente, visto que a linhagem HN30 mostrou-se positiva, enquanto a linhagem HN6 foi negativa.

É importante salientar que a linhagem HN30 é proveniente de um carcinoma epidermóide não metastático, e também não apresenta ativação constitutiva de EGF como a linhagem HN6, o que pode ser traduzido clinicamente como uma menor agressividade de suas células. Portanto, essa marcação de vimentina na linhagem HN30 no Matrigel® pode estar relacionada às funções básicas dessa proteína, como por exemplo a motilidade celular (ALBERTS et al., 1994), ou a uma reação das células no sentido de diferenciação em resposta a algum dos componentes do Matrigel®.

Por outro lado, a total negatividade da linhagem HN6 no Matrigel® quando comparada a positividade de algumas células da mesma linhagem na ausência desse material mostra que não há nesta linhagem, reação celular a nenhum dos componentes da matriz, e que por essa célula ter o receptor de EGF constitutivamente ativado, seu mecanismo de invasão provavelmente é diferente do que ocorre nas linhagens HN30 e HN31.

Vale ressaltar que foi observado um crescimento celular mais intenso nas condições sem Matrigel® que na presença do mesmo quando as células foram plaqueadas para a reação de imunofluorescência. Foram plaqueadas a mesma quantidade de células nas duas formas de ensaio, porém as sem Matrigel® confluíam antes.

Apesar do modelo de cultura celular bidimensional *in vitro* fornecer um conveniente e rápido significado de análises bioquímicas, ele não mostra as propriedades encontradas no microambiente tecidual *in vivo*. Portanto, os modelos bidimensionais possuem uso limitado para estudos das funções específicas dos tecidos e sinais estruturais (SCHMEICHEL; BISSELL, 2003).

Os resultados da imunofluorescência para vimentina nas células derivadas de carcinoma epidermóide (HN6, HN30 e HN31) cultivadas sobre lamínulas de vidro com e sem Matrigel® mostraram raras células positivas. Essas células positivas cultivadas na ausência da membrana basal reconstituída geralmente exibiam morfologia fusiforme enquanto aquelas cultivadas sobre o Matrigel® apresentaram tanto morfologia fusiforme quanto arredondada.

Estes resultados podem ser explicados com base nos diferentes graus de diferenciação celular uma vez que Gilles et al. (1999) demonstraram que as células distantes da lesão não expressam a vimentina, movimentam-se sem trajetória

orientada e permanecem essencialmente estacionárias. Logo, nem todas as células vão se apresentar positivas para a marcação de imunofluorescência, sendo positivas as mais indiferenciadas.

Outra possibilidade é que as células que estão expressando essa proteína estejam com ela ativada pois estão utilizando alguma via na qual suas funções são necessárias. Por exemplo, as células podem expressar vimentina antes de entrar em divisão, uma vez que essa proteína tem como uma de suas funções a orientação da formação do fuso (ALBERTS., 1994). Por essa razão, algumas células de formato não fusiforme apresentam a expressão da vimentina.

Já a linhagem controle de queratinócitos imortalizados (Hacat) não apresentou qualquer positividade para a proteína vimentina nas diferentes formas de cultivo (bi e tridimensional). Esse resultado já era esperado, uma vez que essa linhagem não é de origem mesenquimal e nem de carcinoma que poderia estar expressando a vimentina durante a fase de transição epitélio mesenquimal.

Os resultados obtidos na imunofluorescência também mostraram que a vimentina pode apresentar-se na forma filamentosa ou em agregados dispersos, dependendo do estágio de proliferação em que a célula se encontra. Segundo a literatura, a vimentina se dispersa em agregados pelo citoplasma durante a mitose, pois a proteína sofre fosforilação no seu domínio amino terminal (FRANKE et al., 1978).

Nem todas as linhagens positivas para a imunofluorescência apresentaram-se imunopositivas para a técnica da imunoperoxidase, visto que a reação de imunofluorescência mostrou-se muito mais sensível que a outra técnica utilizada, independentemente da forma de cultivo (com ou sem Matrigel®).

Alguns estudos usando materiais fixados e embebido em parafina para a realização da técnica de imunoistoquímica tem se mostrado menos sensível que a técnica de imunofluorescência. Esse fato pode ser explicado pela diminuição da reatividade antigênica causado pela fixação das células para a confecção de blocos de parafina com o paraformaldeído (MERA; YONG; BRADFIELD, 1980; SKEETE; BLACK, 1977). Portanto fica claro o porquê dessa variação na marcação podendo ser explicada pela sensibilidade da técnica.

A técnica de Western Blot confirmou os resultados mostrados pela imunofluorescência na qual apenas as linhagens derivadas de carcinoma epidermóide apresentam a proteína vimentina.

7 CONCLUSÃO

Com este estudo, podemos concluir que:

1. As células não permaneceram tempo suficiente em contato com o Matrigel® para que houvesse a aquisição de características fenotípica das células da frente de invasão tumoral.
2. A localização da proteína vimentina foi citoplasmática em todas as linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide estudadas e a sua expressão pode variar dependendo da linhagem analisada e da reação de suas células aos componentes da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS¹

Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 2003;424(6951):870–2.

Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest* 2003;83:435-48.

Alberts B, Bray B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3a. ed. New York: Garland Publishing; 1994.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-8.

Anderthon BH. Intermediate filaments: a family of homologous structure. *J Muscle Res Cell Motil* 1981;21:141-66.

Araujo VC, Pinto Junior DS, Sousa SO, Nunes FD, Araujo NS. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250:105–9.

Balkwill F: Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4:540-50.

Battistelli M, Borzi RM, Olivotto E, Vitellozzi R, Burattini S, Facchini A, et al. Cell and Matrix Morpho-Functional Analysis in Chondrocyte Micromasses. *Microsc Res Tech* 2005;67:286–95.

Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Acta Anat* 1996;156:217-26.

Boudreau N, Bissel MJ. Extracellular matrix signaling: interaction of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:640-6.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004;33:317–22.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56(11):2488–92.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61(1):98-103.

Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 1981;256:5209-14.

Castilho RMC. Transição epitélio-mesenquimal em carcinomas epidermóides bucais. Análise através da expressão das proteínas CTBP, vimentina e b-catenina e da identificação gênica de larga escala [Dissetação de Mestrado]. São Paulo:Faculdade de Odontologia da USP;2003.

Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodrigues J, Chu TS, Lopes JP, Aguilera J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116(3):401-6.

Chou YH, Ngai KL, Goldman RD. The regulation of intermediate filament reorganization in mitosis. p34cdc2 phosphorylates vimentin at a unique N terminal site. *J Biol Chem* 1991;26:7325–8.

Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006;441:444–50.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissue and neoplasm. *Histopathology* 2002;40(5):403-39.

Chung AE, Jaffe R, Freeman JL, Vergness JP, Broginski KE, Carlin B. Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* 1979;16:277-87.

Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2003 Oct;36(Suppl 1):45-58.

Colucci-Guyon E, Gimenez M, Ribotta Y, Maurice C, Babinet T, Privat A. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* 1999;25:33–43.

Colucci S, Mothersill C, Harney J, Gamble SC, Seymour C, Arrand JE. Induction of multiple PCR-SSCPE mobility shifts in p53 exons in cultures of normal human urothelium exposed to low-dose gamma-radiation. *Int J Radiat Biol* 1997;72(1):21–31.

Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells – new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2006;12:443–54.

Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004;36:653–9.

Crowe DL, Hacia JG, Hsieh CL, Sinha UK, Rice H. Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:909–14.

Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has a predictive value for developing oral cell carcinoma. *J Pathol* Apr 1998;184(4):360–8.

Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):9–17.

Dolo V, Ginestra A, Gherzi G, Nagase H and Vittorelli ML: Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1994;26:173–80.

Dontu G, Al-Haaj M, Abdullah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolifer* 2003;36 Suppl 1:59–72.

Durand RE, Olive PL. Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods Cell Biol* 2001;64:211–33.

Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, et al. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* 2000;113:2455–62.

Eger A, Mikulits W. Models of epithelial-mesenchymal transition. *Drug Discovery Today. Dis Mod.* 2005;1(2):57-63.

Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Chou YH, et al. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments, *J Cell Sci* 2004;117:919–32.

Erlandson RA. Diagnostic immunohistochemistry of human tumors (editorial) *Am J Surg Pathol* 1984;8:624-51.

Fliegner KH, Ching GY, Liem RKH. The predicted amino acid sequence of alfa-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *Embo J* 1990;9:749-55.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil : a case control study. *Int. J Cancer* 1989;43(6):992-1000.

Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(10):5034-8.

Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial–mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Molec Med* 2008;14(5):199-209.

Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, et al. L1, a novel target of b-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 2005;168(4):633–42.

Ghosh S, Munshi RS, Linz-McGillem LA, Goldman RD, Lorch J, Green KJ, et al. Loss of adhesion-regulated proteinase production is correlated with Invasive activity in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;95(12):2524-33.

Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, Birembaut P. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 1999;112(24):4615-25.

Gottwald E, Giselsbrecht S, Augspurger C, Lahni B, Dambrowsky N, Truckenmuller R, et al. A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip* 2007;7(6):777–85.

Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 2004;566:9-20.

Grahans S. Dentition, diet, tobacco and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer* 1977;59:1611-8.

Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(3):211–24.

Guarino M. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Bioch Cell Biol* 2007;39:2153–60.

Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;197:461–3.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Helfand BT, Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 2004;117:133–41.

Henderson D, Weber IC. Immunoelectron microscopic studies of intermediate filaments in culture cells. *Expl Cell Res* 1980;129:441-53.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:79–90.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds, *Annu Rev Biochem* 2004;73:749–89.

Herrmann H, Häner M, Brettel M, Muller SA, Goldie KN, Fedtke B, et al. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* 1996;264:933–53.

Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 2003;223:83–175.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548–58.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:127–35.

INCA- Instituto Nacional do Câncer:Disponível em: [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br) [maio de 2008].

Islam S, Kim J-B, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KA. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *J Cell Bioch* 2000;78:141–50.

Ivaskaa J, Pallarib H-M, Nevoa J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 10 June 2007;313(10):2050-62.

Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF[β] cooperatively regulate cell plasticity and etastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J cell Biol* 2002;156:299-313.

Joo M, Lee HK, Kang Y. Expression of E-cadherin, beta-catenin, Cd44s and Cd44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003;23:1581-8.

Jothy S. CD44 and its partners in metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:195-202.

Kalluri R, Neilson EG: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776-84.

Kanwar YS, Farquhar MG. Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4493-97.

Kefalides NA. Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 1973;6:63-104.

Kitamura H. Establishment of a bipotent cell line CL-1 which differentiates into chondrocytes and adipocytes from adult mouse. *Osteoarth Cart* 2004;12:25–37.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassel JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement membrane complexes with biological activities. *Bioch* 1985;25:312-8.

Klymkowsky MW. Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:46–54.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous B-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10:5455-63.

Lamorte L, Royal I, Naujokas M, Park M. Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymal-like transition and are required for HGF-mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions. *Mol Biol Cell* 2002;13:1449-61.

Lazarides E. Biochemical and immunocytochemical characterization of intermediate filaments in muscle cells. *Methods Cell Biol* 1982;25 Pt B:333-57.

Lazarides, E. Intermediate filament as mechanical integrators of cellular space *Nature* 1980;283:249-56.

Lebleu V, MacDonald B, Kalluri R. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med* 2007;232:1121–29.

Lee H-J, Guo H-Y, Lee S-K, Jeon B-H, Jun C-D, Lee S-K, et al. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med* 2005;34:436–43.

Ling Y, Rubin J, Deng Y, Huang C, Demirci U, Karp JM. A cell-laden microfluidic hydrogel. *Lab Chip* 2007;7(6):756–62.

Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* 2005 Oct 1;65(19):8944-50.

Machado GF, Figueiredo F. Revisão:filamentos intermediários. *Medicina* 1996 jan./mar;29:104-113.

Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and Aggressive tumor features. *Cancer* 2008;112(9):2088-100.

Mera SL, Yong EW, Bradfield JWB. Direct immunofluorescence of skin using formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Clin Pathol* 1980;33:365-9.

Millimaggi D, Festuccia C, Angelucci A, D'Ascenzo S, Rucci N, Flati S, et al. Osteoblast-conditioned media stimulate membrane vesicle shedding in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2006;28:909-14.

Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21:1021-30.

Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol* 2001;3(9):785–92.

Nawshad A, LaGamba D, Hay ED: Transforming growth factor b (TGFb) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol* 2004;49:675-89.

Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol* 2005;15:342–52.

Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 2006;8:156–62.

Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J. “Heads and tails” of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 2006;31:383–94.

OMS- Organização Mundial da Saúde. Disponível em: [http:// www.who.int](http://www.who.int) [abril de 2008].

Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 2000;1:57.

Osborn M, Weber K. Biology of disease tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 1983;48:372-94.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer *Nat Rev Cancer* 2003;3:895–902.

Parsons M, Keppler MD, Kline A, Messent AD, Humphries MJ, Gilchrist R, et al. Site-directed perturbation of protein kinase C-integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis. *Mol Cell Biol* 2002;22:5897–911.

Pedrero JMG, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114(2):242-48.

Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411:336-41.

Prahlad V, Yoon M, Moir RD, Vale RD, Goldman RD. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 1998;143:159–70.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jan 16;104(3):973-8.

Radisky DC, Bissell MJ. Cancer. Respect thy neighbor! *Science* 2004 Feb 6;303(5659):775-7.

Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2000;81(3):173–82.

Ramaekers F, Haag D, Kant A, Moesker O, Jap P, Vooys G. Coexpression of keratin and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2618-22.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–11.

Savagner P, Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Thiery JP. Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Treat Res* 1994;71:229-49.

Schaffeld M, Herrmann H, Schultess J, Markl J. Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. *Eur J Cell Biol* 2001;80:692–702.

Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 2003;116:2377–88.

Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncol 2007;43:107-15.

Shaw KR, Wrobel CN, Brugge JS. Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9:297–310.

Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1995;7:229-33.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396–401.

Skeete MVH, Black MM. The evaluation of a special liquid fixative for direct immunofluorescence. *Clin Exp Dermatol* 1977;2:49-56.

Sodunkea TR, Turnerb KK, Caldwellb SA, McBridec W, Reginatob MJ. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials* 2007;28:4006–16.

Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, et al. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1989;49:4258-63.

Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;29:7–15.

Steinert PM, Parry DA. Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure. *Annu Rev Cell Biol* 1985;1:41–65.

Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004;31(6):726-33.

Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1523–32.

Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 2003;94:593-7.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 2005;65(14):5996–6000.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:740-6.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.

Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992;150:534-44.

Timpl R, Dziadek M, Fujaware S, Nowack H, Wich G. Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* 1983;137:455-65.

Toh YC, Zhang C, Zhang J, Khong Y M, Chang S, Samper VD, et al. A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip* 2007;7(3):302–9.

Tremmel SC, Gotte K, Popp S, Weber S, Hörmann K, Bartram CR, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144(2):165–74.

Tudor D, Locke M, Owen-Jones E, Mackenzie IC. Intrinsic patterns of behavior of epithelial stem cells. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004;9:208–14.

Weaver VM, Lelievre S, Lakings JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F, et al. Beta4 integrin-dependent formation of polarized threedimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2002;2:205–16.

Woods AJ, White DP, Caswell PT, Norman JC. PKD1/PKCmicro promotes alpha beta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *Embo J* 2004;23:2531–43.

Wright JM. A review and update of oral precancerous lesions. *Texas Dent J* 1998 June;115(6):15-9.

Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:674-81.

ANEXO A - Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Parecer no.134/05

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a inclusão no material e método, de técnicas de Western Blot e câmara de invasão, utilizando-se as mesmas linhagens celulares para avaliar a expressão da vimentina, do projeto intitulado "Expressão da vimentina, da c-erbB-2, da B-catenina-E em cultivo tridimensional de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca", de responsabilidade do Professor(a) Doutor(a) Décio dos Santos Pinto Júnior.

São Paulo, 05 de março de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador