



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

YASMIM RODRIGUES SENA

**SILENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS TKS4 E TKS5 RELACIONADAS À
FORMAÇÃO DE INVADOPÓDIO E O PROCESSO DE INVASÃO NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

BELÉM
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

YASMIM RODRIGUES SENA

**SILENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS TKS4 E TKS5 RELACIONADAS À
FORMAÇÃO DE INVADOPÓDIO E O PROCESSO DE INVASÃO NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da UFPA como pré-
requisito para obtenção do Grau de Bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

Coorientadora: MSc. Sâmia Cordovil de Almeida

BELÉM

2020

YASMIM RODRIGUES SENA

**SILENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS TKS4 E TKS5 RELACIONADAS À
FORMAÇÃO DE INVADOPÓDIO E O PROCESSO DE INVASÃO NO TUMOR
ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da UFPA
como pré-requisito para obtenção do Grau de Bacharel em Odontologia.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior

Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

Prof^a. Dr^a. Maria Sueli da Silva Kataoka

Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

(Orientador) Faculdade de Odontologia ICS/UFPA

Julgado em: ____/____/____

Conceito: _____

BELÉM

2020

*“Se você quer transformar o mundo,
experimente primeiro promover o seu
aperfeiçoamento pessoal e realizar
inovações no seu próprio interior.”*

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem o seu amor e bondade eu não chegaria até esse momento.

À minha mãe, **Izabel**, mulher que me inspira com sua resiliência, empatia e coragem, por sempre me apoiar e fazer tudo o que está ao seu alcance para a realização dos meus sonhos. Por todo o amor, ensinamentos e momentos árduos que vencemos juntas. Ao meu pai, **Miguel**, por todo o amor e suporte fornecido, por todas as piadas que sempre resultaram em muitos risos, mesmo nos dias mais difíceis, tornando essa jornada mais leve. Vocês são os meus alicerces, e não existe palavra que defina o quão eu sou grata por tudo o que vocês me proporcionam.

À minha avó materna, **Cecília**, que também é minha fonte de inspiração de mulher forte, por toda a sabedoria compartilhada, pelo carinho e cuidados durante toda a minha vida. Aos meus **avós paternos** (*in memoriam*), pela infância amorosa e divertida no quintal espaçoso da casa deles.

À minha madrinha, **Joana**, por todo o amor e carinho de mãe, por ter feito parte da minha infância de maneira tão ativa e por sempre ter torcido por mim. Aos meus **tios, irmãos, sobrinhos e primos**, que tornam a minha família imensa, barulhenta e repleta de boas histórias, por todas as palavras de estímulo, os almoços de domingo de casa cheia de gente e amor.

Ao meu noivo, **Renan**, por ter abraçado o meu mundo, tornando-se uma das pessoas que mais me incentiva e acredita no meu potencial, por todo o amor, reciprocidade e ombro amigo nos meus dias mais cinzas. Obrigada por tanto!

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor **João**, fonte de conhecimento, aprendizados e grande exemplo de pesquisador. Muito obrigada por ter me fornecido a oportunidade de trilhar o caminho da pesquisa a partir da iniciação científica.

À minha coorientadora, **Sâmia**, pessoa que me inspira pela sua resiliência e gentileza, por ser tão solícita de modo a ter me permitido fazer parte desse projeto de pesquisa que me forneceu tantos aprendizados. Jamais esquecerei de toda a sua ajuda para que essa etapa da minha vida se tornasse possível.

À professora **Sueli**, exemplo de profissional, por ser a “mãe” do nosso laboratório. Que me ensinou grandemente, não só sobre a ciência, mas também sobre a vida. Agradeço por toda a disciplina, risada contagiante e “tardes de tapioquinha”.

Agradeço ao professor **Sérgio**, um exímio profissional, pelo compartilhamento de tantos ensinamentos, tornando-se parte da minha aquisição de conhecimentos na área da patologia ao longo desses anos.

À **Universidade Federal do Pará** por todas as oportunidades fornecidas na graduação. À **Faculdade de Odontologia** e a todos os seus **funcionários da limpeza, técnicos da manutenção, ASBs, professores, secretários** por todo o amparo disponibilizado diariamente. Agradeço à diretora, professora **Danielle Emmi**, que é uma profissional inspiradora, por todo o amparo durante esses anos e, principalmente, nesse período em que necessitávamos de todo o suporte para a realização desse momento.

À minha dupla, **Karolyny**, por toda a sua dedicação em clínica para que conseguíssemos evoluir sempre juntas, e, principalmente, pelo companheirismo e amizade de todos os momentos, que tornaram a nossa rotina mais leve. Obrigada por tudo!

Aos meus **amigos de turma**, especialmente à minha querida **subturma**, que tornaram essa jornada menos difícil com cada sorriso, comemoração de fim de semestre, revisão pré-prova e abraços antes de iniciar o dia na clínica. Obrigada por todo o afeto compartilhado ao longo desses 5 anos, cada um de vocês foi essencial para a minha evolução profissional e pessoal.

Agradeço grandemente à minha **família labcult/lapi**, pela solicitude, conhecimento compartilhado e por se mostrarem presentes em momentos difíceis durante a busca de um resultado, mas também em circunstâncias de pura amizade. À **Giordanna**, por estar me acompanhando desde o início da minha iniciação científica, fornecendo todo o suporte necessário. Ao **Felippe e Geovanni**, mestres que foram essenciais para o meu aprendizado. À **Thaiana** que foi essencial para a minha primeira apresentação do seminário da iniciação científica e segue até hoje sendo tão atenciosa. À **Taiane**, por ser tão prestativa e ter se tornado minha companheira de WB. À **Karina**, por ser tão zelosa e ter se tornado fundamental para a realização dessa etapa, minha enorme gratidão por toda a sua ajuda e amizade! À

Beatriz, que, apesar de ter sido de um turno diferente do meu, tornou-se presente ao me acompanhar em muitos almoços corridos, além disso, obrigada por me ajudar sempre que possível, inclusive na clínica, principalmente como monitora de periodontia. À **Vanessa, Biana, Lena, Athus, Raissa, Aline, Katherine, Gabriela, Felipe, Humberto** e tantos outros que fazem/fizeram parte desse grupo, por toda a prestatividade para que eu pudesse progredir no caminho da pesquisa.

À **Yasmin**, minha amiga de alma, que literalmente esteve comigo no dia que me permitiu ingressar na faculdade ao estarmos juntas na mesma sala para a realização do ENEM. Obrigada por estar ao meu lado, torcendo por cada conquista e progresso na minha vida pessoal e profissional.

Ao **Claudio, Ellen Gabriela, Pedro, Rafael e Isabela** por compartilharem anos de amizade, independentemente do quão distinto sejam os nossos caminhos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3. RESULTADOS	17
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXO I: Conflito de interesse	26
ANEXO II: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	27
ANEXO III: Normas para submissão da revista Experimental Cell Research	30

CAPÍTULO 1

SILENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS TKS4 E TKS5 RELACIONADAS À FORMAÇÃO DE INVADOPÓDIO E O PROCESSO DE INVASÃO NO TUMOR ODONTOGÊNICO AMELOBLASTOMA

Yasmim Rodrigues Sena

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Sâmia Cordovil de Almeida

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Sérgio de Melo Alves Júnior

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil

Maria Sueli da Silva Kataoka

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

João de Jesus Viana Pinheiro

Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Autor Correspondente: João de Jesus Viana Pinheiro

Endereço: Laboratório de Cultivo Celular. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Rua Augusto Corrêa, 1. Belém, Pará, 66075-110, Brasil.

Fone: +55 91 999850765

E-mail: radface@hotmail.com

RESUMO

O ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico benigno, de origem epitelial e crescimento lento, porém apresenta invasividade local e altas taxas de recorrência. Diante da agressividade e recorrência deste tumor, investigam-se os processos que contribuem para a invasividade da lesão, atribuída, em parte, à capacidade de degradação da matriz extracelular (MEC). Estudos sugerem que as protrusões dinâmicas da membrana plasmática, denominadas invadopódios, podem estar fortemente relacionados com a degradação da MEC, sendo o grupo das proteínas TKs moléculas chave para a formação dos invadopódios. Diante da relevância desta neoplasia, sua agressividade e capacidade de invasão local, estudos que busquem compreender os processos biológicos deste tumor são essenciais para que futuros tratamentos e melhores prognósticos sejam alcançados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a participação das proteínas TKs4 e TKs5 no processo de invasão, em linhagem celular de ameloblastoma. Os métodos utilizados foram Cultivo celular, Silenciamento de RNA (shRNA), Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) e Ensaio de invasão em sistema de câmaras bipartites. Os resultados revelaram a diminuição da invasividade das células tratadas com shRNA para TKs4 e TKs5, quando comparadas às células do grupo controle, indicando que possivelmente essas proteínas têm papel importante na invasividade local do ameloblastoma.

Palavras chaves: Ameloblastoma, Invadopódio, Invasividade Neoplásica.

ABSTRACT

Ameloblastoma (AME) is a benign odontogenic tumour, of epithelial origin and slow growth, but it presents local invasiveness and high recurrence rates. In view of the aggressiveness and recurrence of this tumour, the processes that contribute to the invasiveness of the lesion are investigated, attributed, in part, to the degradation capacity of the extracellular matrix (ECM). Enhanced studies that the dynamic protrusions of the plasma membrane, called invadopodia, can be strongly related to the degradation of the ECM, being the group of TKs proteins key molecules for the formation of invadopodia. In view of the promotion of this neoplasm, its aggressiveness and capacity for local invasion, studies that seek to understand the biological processes of this tumour are essential for future treatments and better prognosis to be achieved. Therefore, the objective of this work was to verify the participation of TKs4 and TKs5 proteins in the invasion process, in ameloblastoma cell line. The methods used were Cell culture, RNA silencing (shRNA), Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Cell invasion assay. The results revealed a decrease in the invasiveness of cells treated with TKs4 and TKs5 shRNA, when compared to cells in the control group, indicating that possibly these genes have an important role in local invasion of ameloblastoma.

Keywords: Ameloblastoma, Invadopodia, Neoplastic Invasiveness.

1. INTRODUÇÃO

A atividade migratória e a capacidade de superar as barreiras dos tecidos são componentes-chave para que as células tumorais invadam os tecidos circunvizinhos. Sabe-se que as células neoplásicas malignas possuem a habilidade de invadir os tecidos adjacentes e ocasionar metástase local ou à distância a partir da sua capacidade de remodelar e degradar a matriz extracelular (MEC). Sendo assim, estudos recentes têm voltado seus esforços para entender melhor a participação da expressão gênica, fatores de crescimento tumorais e proteínas relacionadas à apoptose na tumorigênese e invasão local dos tumores [1,2,3,4].

O ameloblastoma (AME) é um tumor benigno que tem origem na proliferação do epitélio odontogênico, possuindo aspecto clínico, radiográfico e histopatológico variável. Apesar de possuir crescimento lento, é localmente invasivo, apresentando altas taxas de recorrência [5,6,7]. Em razão da variabilidade de características, o tratamento deste tumor varia de terapia cirúrgica conservadora à cirurgia radical [8,9]. Diante da agressividade e recidiva dessa lesão, faz-se necessária a investigação dos mecanismos que estão relacionados à sua invasividade, a qual está atribuída, em parte, à capacidade de degradação da MEC [10].

Estudos sugerem que as protrusões dinâmicas da membrana plasmática, denominadas invadopódios, podem estar fortemente relacionadas com a degradação da MEC [11,12]. Essas estruturas surgem na superfície ventral da membrana celular e são ricas em F-actina [13,14]. Além disso, possuem uma série de proteínas, incluindo proteases, proteínas reguladoras de actina e moléculas de sinalização, que regulam a maquinaria de actina, o processo de formação e maturação dessas protrusões [1,15,16].

O grupo das proteínas substrato tirosina-quinase (TKs), são proteínas adaptadoras e intermediárias (ou andaimes), que atuam como moléculas chave para a formação e função dos invadopódios, estando presentes, portanto, em vários tecidos com diferentes papéis, desempenhados em processos fisiológicos e patológicos [17,18].

A TKs5 é codificada pelo gene SH3PXD2A, enquanto a TKs4 é codificada pelo gene SH3PXD2B. Ambas possuem domínios de homologia Phox (PX) N-terminal,

mas diferem no número de domínios SH3 (cinco e quatro, respectivamente), locais de fosforilação de Src e sequências de ligação [4,18]. A partir disso, estudos sugerem que essas proteínas apresentam funções distintas, uma vez que a TKs5 é necessária para ambos os processos de formação e função dos invadopódios, devido ao recrutamento de cortactina, responsável principalmente pela formação da rede de actina. Enquanto que a TKs4 desempenha um papel mais proeminente na degradação da MEC a partir dessas protrusões, por meio do recrutamento e/ou ativação de proteases, principalmente a MT1-MMP [12,17,19].

Diante da relevância dessa neoplasia, sua agressividade e capacidade de invasão local, estudos que busquem compreender os processos biológicos deste tumor são essenciais para que futuros tratamentos e melhores prognósticos sejam alcançados. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar a participação das proteínas TKs4 e TKs5 no processo de invasão, em linhagem celular de ameloblastoma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi cadastrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA (CAAE: 80191417.8.0000.0018).

2.2. CULTIVO CELULAR

Para a realização dos experimentos, as células da linhagem oriunda de ameloblastoma humano, denominada AME-hTERT, foram descongeladas e mantidas em frascos de cultivo de 25 cm², em meio DMEM-F12 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB (Gibco®) 2 mM de glutamina (Sigma®), 3 mM de bicarbonato de sódio (Sigma®), 100 UI/mL de penicilina (Gibco®), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Gibco®).

As células foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Todos os procedimentos de cultivo foram executados seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos instrumentais, materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. Além disso, todas as etapas que envolveram

a manipulação das células foram realizadas em capela de fluxo laminar tipo II, obedecendo todas as normas de biossegurança exigidas pela legislação vigente de acordo com a CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio de contraste de fase (Axiovert 40 C – Carl Zeiss, Oberkochen, DEU) e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

2.3. RNA DE INTERFERÊNCIA (SHORT HAIRPIN RNA – shRNA)

Para a diminuição da expressão das proteínas TKs4 e TKs5, utilizou-se RNA de interferência Mission® Lentiviral Transduction Particles (Sigma®), descritos na Tabela 1. As células AME-hTERT (2×10^5) foram cultivadas em placas de 6 poços até alcançarem 60-80% de confluência em meio DMEM-F12 (Sigma®) com 10% de SFB (Gibco®) sem antibiótico e antimicótico. As partículas virais de shRNA para TKs4 e TKs5 foram adicionadas em seus respectivos poços, sendo um poço utilizado como controle, no qual o shRNA não foi adicionado. Após essa etapa, 2 μ L de Puomicina (Gibco®), antibiótico de seleção, foram adicionados aos poços com shRNA.

Tabela 1. Sequência específica dos vetores de transfecção para inibição dos genes de TKs4 e TKs5

Gene	TRC Number	Sequence
TKs4 (SH3PXD2B)	TRCN0000129568	CCGGCCACAGATCCTGTGTCTAAGACTCGA GTCTTAGACACAGGATCTGTGGTTTTTTG
TKs4 (SH3PXD2B)	TRCN0000147775	CCGGGTAAGATTCTCTTCAGACGAACTCGAG TTCGTCTGAAGAGAATCTTACTTTTTTG
TKs5 (SH3PXD2A)	TRCN0000136337	CCGGGTATATCAGATACCTGGGCAACTCGA GTTGCCCAGGTATCTGATATACTTTTTTG
TKs5 (SH3PXD2A)	TRCN0000136512	CCGGGCCTTTGATTTCCGACAGATTCTCGAG AATCTGTCCGAAATCAAAGGCTTTTTTG

2.4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5 mL, foi acrescentado às células silenciadas e não silenciadas para TKs4 e TKs5, 1000 µL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, HE, DEU) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em agitador Vortex (Quimis, São Paulo, SP, BR) o conteúdo foi centrifugado (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburgo, HH, DEU) a 12.000 rpm por 10 minutos a 6 °C. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, contendo 500 µL de isopropanol (Merck®) e em seguida homogeneizado manualmente. Esse microtubo foi armazenado em refrigerador a -20 °C para precipitação por um período mínimo de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6 °C, foi realizada. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado, restando o pellet de RNA no lado e no fundo do tubo, e a esse RNA precipitado foi acrescentado 1000 µL de etanol 70% (Merck®) em água DEPC (dietil pirocarbonato) onde foi centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6 °C, para ser realizada a lavagem do RNA. Após esta lavagem, o pellet de RNA foi desidratado por evaporação a 37 °C, e diluído em 30 µL de água DEPC.

Após este procedimento, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Invitrogen Qubit® Fluorometer e Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit (250 pg/uL-100 ng/uL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante.

2.5. SÍNTESE DE cDNA

A transcrição reversa das amostras foi realizada para a obtenção do cDNA a ser utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Desse modo, esse procedimento foi realizado utilizando o kit Superscript III (Superscript® III Reverse Transcriptase – Invitrogen®) de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação foram acrescentados 1 µg da amostra de RNA de cada amostra (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10 mM, com volume final de 13 µL. A reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler®) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, tampão 5x (first strand buffer), DTT (ditiotretitol, Sigma®) 10 mM, MgCl₂ a 50mM e SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10.000 U – 200 U/mL, com volume final de 20 µL, levando-se a reação a 50 °C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada,

aquecendo-se a solução a 85 °C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10 µL de água destilada ultrapura (Invitrogen®), totalizando um volume final de 30 µL.

Para a detecção dos amplicons foi utilizado o agente fluorescente Sybr Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para as reações de RT-PCR foram primers para TKs4 (F- AAAGATGAGGCAGAGACCCC; R- CCACCAGCCACTCAAGTTTT) e para TKs5 (F- CCTCCACCACGCAGAGAAT; R- TTCTCACCGATCTGCACGTA).

A reação de RT-PCR foi realizada no StepOne Plus (Real Time PCR Systems - Applied Biosystems®) com o reagente GoTaq qPCR (Promega Madison, WI, USA). A partir da reação de transcrição reversa, foi utilizado cDNA, GoTaq qPCR pcr master mix (2x), primers (18 uM) sentido reverso, e água Milli Q autoclavada qsp 20 µL. Após um período de 10 minutos a 50 °C para ativação da enzima e desnaturação de 5 minutos a 95 °C, foram executados 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados foram analisados pelo StepOne TM Software v2.0 (Thermo Fisher Scientific®).

2.6. ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

Para avaliar se as proteínas TKs4 e TKs5 induzem fenótipo invasivo nas células AME-hTERT, foi empregado o sistema de câmaras bipartites de 10 poços (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) utilizando membrana de policarbonato porosa coberta por 5 µL de matrigel (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) na concentração de 14 µg/mL. Poços da câmara inferior foram preenchidos com DMEM-F12 (Sigma®) e 10% de soro fetal bovino (Gibco®). Nesse experimento, células com a expressão de TKs4 e TKs5 reduzidas por shRNA e as células não silenciadas, utilizadas como controle (15×10^4 células/poço), foram suspendidas em meio sem soro e colocadas na câmara superior sobre a membrana coberta por matrigel. Posteriormente, a câmara foi incubada por 48 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, para ocorrer a digestão do matrigel e invasão das células, da câmara superior para a inferior. Após esse período, a membrana foi removida e sua porção superior delicadamente raspada para a remoção de células que não invadiram e dos restos de matrigel. As células

localizadas na porção inferior foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS durante 15 minutos e coradas com solução de violeta cristal a 0,2% em metanol a 20%, por um período de 2 h. Para aquisição de imagens, utilizou-se microscópio de fluorescência (AxioScope, A1, Zeiss®), equipado com câmera fotográfica digital (AxioCam MRc - Zeiss®), com aumento final de 400x, permitindo a contagem das células.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Após a confirmação do silenciamento, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos: AME-hTERT não silenciado; AME-hTERT silenciado para TKs4 e para TKs5. Foi utilizando o pós-teste de Dunn para avaliar as diferenças entre os grupos, com nível de significância $\alpha = 0,05\%$.

3. RESULTADOS

3.1. RNA DE INTERFERÊNCIA e PCR

Para a confirmação do silenciamento dos genes SH3PXD2B (TKs4) e SH3PXD2A (TKs5) na linhagem AME-hTERT, foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a qual verificou a diminuição da expressão das proteínas TKs4 e TKs5, demonstrando o silenciamento dos genes em questão.

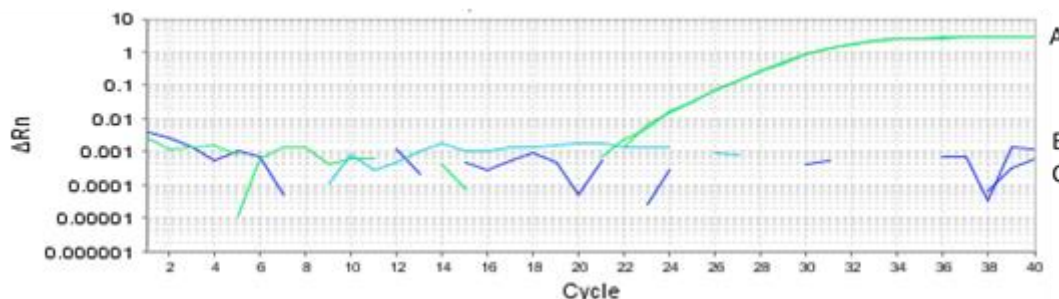


Figura 1. Gráfico da Reação em Cadeia de Polimerase do gene silenciado SH3PXD2B (TKs4) em células AME-hTERT, demonstrando controle não silenciado (a), gene silenciado (b) e controle negativo (c).

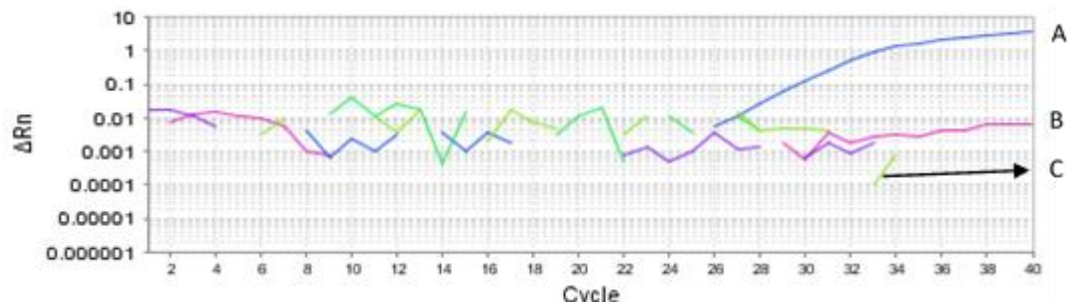


Figura 2. Gráfico da Reação em Cadeia de Polimerase do gene silenciado SH3PXD2A (TKs5) em células AME-hTERT, sendo controle não silenciado (a), gene silenciado (b) e controle negativo (c).

3.2. ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

No ensaio de invasão celular, verificou-se que houve maior invasão nos poços das células AME-hTERT que não foram silenciadas em comparação às células silenciadas para TKs4 (shTKs4) e para TKs5 (shTKs5). Observou-se também que as células shTKs4 invadiram mais quando comparadas às shTKs5. Houve diferença estatística entre o grupo controle e shTKs4 ($p < 0,05\%$) e entre o grupo controle e shTKs5 ($p < 0,01\%$). Não houve diferença estatística entre shTKs4 e shTKs5.

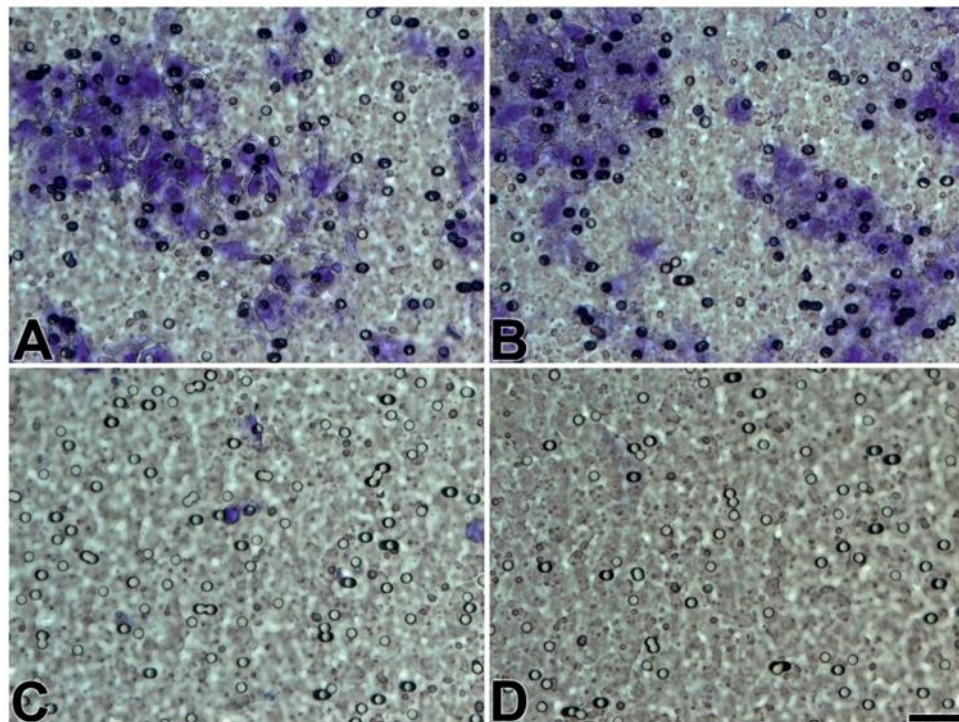


Figura 3. Fotomicrografias do ensaio de invasão de células da linhagem AME-hTERT. Nos controles do silenciamento (A e B), observa-se grande número de células invadindo a membrana de matrigel. (C) shTKs4: observa-se algumas células invadindo a membrana de matrigel. (D) shTKs5: poucas ou nenhuma célula foram observadas invadindo a membrana de matrigel. Escala: 20 μm .

Invasion assay

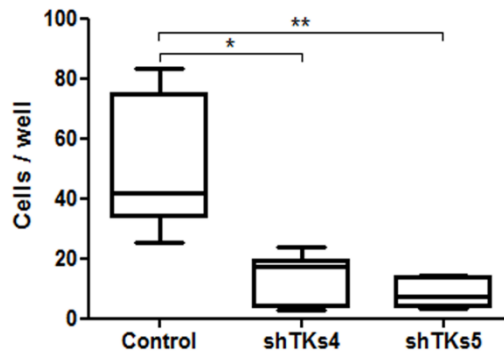


Gráfico 1: Quantificação do ensaio de invasão em matrigel na linhagem do AME-hTERT. Houve maior invasão celular nos poços das células de AME-hTERT controle em comparação às células shTKs4 e shTKs5. Houve diferença estatística entre os três grupos. Não houve diferença estatística entre shTKs4 e shTKs5. * $p < 0,05\%$; ** $p < 0.01$. Nível de significância $\alpha = 0,05\%$.

4. DISCUSSÃO

Apesar de ser considerado um tumor odontogênico de origem epitelial de caráter benigno, sabe-se que o ameloblastoma possui altas taxas de morbidade, recidivas e invasão local, sendo considerado um tumor altamente destrutivo, mesmo após um procedimento cirúrgico radical [6,7]. Os mecanismos associados à invasão tumoral ainda não foram completamente elucidados, no entanto, nota-se em muitas pesquisas a importância das proteínas estudadas neste trabalho no processo invasivo.

A matriz extracelular fornece uma estrutura essencial para a proliferação, migração e diferenciação celular [20]. No microambiente tumoral, as células neoplásicas utilizam mecanismos moleculares para causar a degradação da MEC e subsequente invasão para os tecidos adjacentes [21].

Os invadopódios são protrusões da membrana formados por actina, que estão localizados em regiões de contato entre as células tumorais invasivas e a MEC, com capacidade para a degradação dessa. Se formam a partir de 3 processos: iniciação,

montagem e maturação. Na iniciação ocorre a modificação estrutural do citoesqueleto, devido ao início da formação do prolongamento de actina, por meio da interação de receptores de membrana do tipo integrina diretamente com a MEC. Esse processo envolve diversas proteínas, como a TKs5. A fase de montagem, é caracterizada pelo alongamento da estrutura dos invadopódios, pois a TKs5 se liga às proteínas chave da regulação de actina, o que possibilita a associação dessas com a cortactina, permitindo com que a TKs5 realize o recrutamento de cortactina para a polimerização de F-actina. Na fase de maturação, ocorre a consolidação do invadopódio, que cria a capacidade de recrutar metaloproteinases responsáveis pela degradação da MEC, especialmente a MT1-MMP, que apresenta grande significância na invasão tumoral por possuir um mecanismo chave na regulação da atividade proteolítica dos invadopódios, onde a TKs4 participa de maneira ativa no processo de sua estabilização e secreção [16,17,19,22].

Os invadopódios já foram identificados em várias linhagens de células cancerígenas, incluindo melanoma maligno, câncer de mama, pancreático, glioma e câncer de cabeça e pescoço [1,4,14,23,24], o que sugere que a maioria dos cânceres tem uma tendência a adotar invadopódios para realizar invasão e metástase [3,4].

Já é bem descrito na literatura que a cortactina e a MT1-MMP são superexpressas em cânceres humanos, correlacionando-se com o potencial metastático, devido à importância dessas na formação e função dos invadopódios, principalmente pela atuação das metaloproteinases (MMPs) para a degradação da MEC e posterior invasão celular [2,6,14,25]. A expressão de cortactina e MT1-MMP em ameloblastoma foram observadas *in vivo* por Pinheiro et al. (2011), que demonstraram maior expressão dessas proteínas em tecido de ameloblastoma quando comparado ao tecido de tumor odontogênico calcificante cístico, considerado uma lesão não-invasiva.

Além disso, a importância dessas proteínas é reforçada pela alta expressão de seus indutores, TKs5 e TKs4 [17]. Stylli et al. (2012) já haviam mostrado que a formação do invadopódio desempenha papel importante na invasão do melanoma de camundongo através da via Src-Tks5 em células com superexpressão de TKs5 ativo. Dessa forma, acreditamos que ao realizar o silenciamento das proteínas TKs, consideradas proteínas intermediárias, são acarretadas consequências na formação dos invadopódios e redução da capacidade invasiva do ameloblastoma.

Buschman et al. (2009), notaram em seu estudo *in vitro* que ao silenciar TKs4 em embrião de camundongo ocorreu formação incompleta de invadopódios e inibição da degradação da MEC. No entanto, ao ocasionarem a superexpressão de TKs5 para a reposição dos fenótipos somente a formação foi recuperada, enquanto que ao ser realizada a reintrodução de TKs4 as duas características foram recuperadas, demonstrando a interdependência dessas duas proteínas.

Na pesquisa de Chen et al. (2018), investigou-se a relevância de TKs5 em células de câncer pancreático, a partir do silenciamento *in vitro*, comparando a formação e atividade de invadopódios dessas células com um grupo controle. Em seus achados, notaram que os níveis reduzidos de TKs5 diminuíram a capacidade das células tumorais pancreáticas de formar invadopódios e digerir uma gelatina fluorescente, semelhante a matriz extracelular. Esses dados indicam que a TKs5 é necessária para formar invadopódios funcionais, em células de câncer pancreático, e sugerem que a expressão dessa proteína em tumores pancreáticos está amplamente associada à remodelação e degradação ativa da matriz extracelular.

Nossos resultados revelaram, por meio de PCR, que houve o silenciamento dos genes SH3PXD2B (TKs4) e SH3PXD2A (TKs5) diminuindo, consequentemente, a expressão das proteínas TKs4 e TKs5. O ensaio de invasão celular evidenciou que a invasão e a degradação do matrigel foram maiores no grupo controle quando comparadas aos grupos shTKs4 e shTKs5. Possivelmente, esses resultados sugerem a participação dos invadopódios na invasividade local do ameloblastoma e no seu comportamento agressivo. Portanto, silenciando essas proteínas, a invasividade celular poderia ser diminuída.

Pesquisas fazem referência a esses achados em outras neoplasias. Blouw et al. (2008) em seu estudo *in vivo*, concluíram que fibroblastos src-transformados com redução de expressão de TKs5 possuem menor proliferação quando implantados subcutaneamente, provavelmente como resultado do aumento da apoptose e redução da vascularização do tumor [26].

Além disso, Leong et al. (2014), apontaram que em metástase pulmonar de camundongo *in vivo*, o silenciamento de TKs4 e TKs5 resultou em diminuições significativas no extravasamento celular em comparação com o controle. Os dados revelaram que os invadopódios são necessários para a invasão e colonização

metastática de locais distantes, sugerindo que a inibição de invadopódios tem efeitos anti-invasivos que levam a uma redução na capacidade de metástase.

Apesar deste ser o primeiro estudo que realizou o silenciamento e ensaio de invasão celular de TKs4 e TKs5 em ameloblastoma, as evidências fornecidas por estudos *in vivo* e *in vitro* em outros tumores, mostra a importância de ambas as proteínas para a formação do invadopódio.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados dos experimentos realizados, concluímos que o silenciamento das proteínas de TKs4 e TKs5 reduziu a invasão celular na linhagem AME-hTERT. Diante do papel crucial desempenhado pelos invadopódios, essas proteínas representam um potencial alvo terapêutico para estratégias de ação contra a invasão celular para tecidos adjacentes.

REFERÊNCIAS

- [1] Blouw B, Patel M, Iizuka S, Abdullah C, You WK, Huang X, et. al. The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Plos One*, **2015**;10(3): e0121003.
- [2] Marioni G, Zanoletti E, Mazzoni A, Gianatti A, Valentini E, Girasoli L, et. al. Cortactin and phosphorylated cortactin tyr466 expression in temporal bone carcinoma. *American Journal of Otolaryngology*, **2017**;38(2): 208-212.
- [3] Castro-Castro A, Marchesin V, Monteiro P, Lodillinsky C, Rossé C, Chavrier P. Cellular and molecular mechanisms of MT1-MMP-dependent cancer cell invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, **2016**;32:20.1–20.22.
- [4] Iizuka S, Abdullah C, Buschman MD, Diaz B, Courtneidge SA. The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget*, **2016**; 29;7(48):78473-78486.
- [5] da Costa NM, Fialho AD, Proietti CC, da Silva Kataoka MS, Jaeger RG, de Alves-Júnior SM, et. al. Role of hypoxia-related proteins in invasion of ameloblastoma cells: crosstalk between NOTCH1, hypoxia-inducible factor 1 α , a disintegrin and metalloproteinase 12, and heparin-binding epidermal growth factor. *Histopathology*, **2016**;69(1):99-106.
- [6] Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology*, **2010**;57(1):128–137.
- [7] Li X, Kurita H, Xiao T, Iijima K, Kurashina K, Nakayama J. Potential involvement of chondroitin sulfate A in the pathogenesis of ameloblastoma. *Acta Histochemica*, **2017**;119(5):439-445.
- [8] Figueiredo NR, Dinkar AD, Meena M, SatoSkar S, Khorate M. Ameloblastoma: A clinicoradiographic and histopathologic correlation of 11 cases seen in Goa during 2008-2012. *Contemporary Clinical Dentistry*, **2014**;5(2):160-165.
- [9] Cecim RL, Carmo HA, Kataoka MS, Freitas VM, de Alves-Júnior SM, Pedreira EN, et. al. Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. *J Oral Pathol Med*, **2014**;43(2):143–147.

- [10] Pinheiro JJ, Nascimento CF, Freitas VM, de Siqueira AS, Junior SM, Jaeger RG. Invadopodia proteins, cortactin and membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are expressed in ameloblastoma. *Histopathology*, **2011**;59(6):1266-9.
- [11] Eddy RJ, Weidmann MD, Sharma VP, Condeelis JS. Tumor cell invadopodia: invasive protrusions that orchestrate metastasis. *Trends Cell Biol.*, **2017**;27(8):595-607.
- [12] Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, Wen F, Pass I, Courtneidge SA. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol Biol Cell.*, **2009**;20(5):1302-11.
- [13] Alblazi KMO, Siar CH. Cellular Protrusions - lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes - and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. *Asian Pac J Cancer Prev.*, **2015**;16(6):2187-2191.
- [14] Hwang YS, Park KK, Chung WY. Invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma: The role of epidermal growth factor receptor signaling. *Arch Oral Biol.*, **2012**;57(4):335-43.
- [15] Chen YC, Baik M, Byers JT, Chen KT, French SW, Díaz B. TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. *Exp Mol Pathol.*, **2019**;106:17-26.
- [16] Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2011**;12(7):413-26.
- [17] Ribeiro AL, da Costa NM, de Siqueira AS, Brasil da Silva W, da Silva Kataoka MS, Jaeger RG, et. al. Keratocystic odontogenic tumor overexpresses invadopodia-related proteins, suggesting invadopodia formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* **2016**;122(4):500-8.
- [18] Saini P, Courtneidge SA. Tks adaptor proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, **2018**; 131, jcs203661.
- [19] Jeannot P, Besson A. Cortactin function in invadopodia. *Small GTPases*. **2017**;31:1-15.
- [20] Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med.*, **2006**;35:345–51.
- [21] Paterson EK, Courtneidge SA. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J.* **2018**;285(1):8-27.

- [22] Leong HS, Robertson AE, Stoletov K, Leith SJ, Chin CA, Chien AE, et. al. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Reports*, **2014**;8:1558–1570.
- [23] Stylli SS, Stacey TTI, Kaye AH, Lock P. Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *J Clin Neurosci*. **2012**;19(3):436-42.
- [24] Chen YC, Baik M, Byers JT, Chen KT, French SW, Díaz B. Experimental supporting data on TKs5 and cortactin expression and localization in human pancreatic cancer cells and tumors. *Data in Brief*, **2018**;30(22):132-136.
- [25] Siar CH, Rahman ZA, Tsujigiwa H, Alblazi KMO, Nagatsuka H, Ng KH. Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. **2016**;45(8):591-8.
- [26] Blouw B, Seals DF, Pass I, Diaz B, Courtneidge SA. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol*. **2008**;87:555–567.

ANEXOS

ANEXO I

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

ANEXO II

Parecer do comitê de ética

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão das proteínas TKS4, TKS5, MT1-MMP e cortactina relacionadas a formação de invadopódio e o processo de invasão no tumor odontogênico ameloblastoma

Pesquisador: JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80191417.8.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.462.441

Apresentação do Projeto:

O Ameloblastoma (AME) é um tumor odontogênico benigno de origem epitelial que apresenta crescimento lento, localmente invasivo e altas taxas de recorrência. O presente estudo será experimental e laboratorial e utilizará experimentos in vitro em linhagem celular anteriormente estabelecida. A partir desses experimentos, buscarão verificar a expressão de proteínas relacionadas ao processo de invasão do ameloblastoma.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a expressão de proteínas TKS4, TKS5, MT1-MMP e cortactina, relacionadas ao invadopódio e sua participação no processo de invasão do Ameloblastoma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os possíveis riscos poderão ocorrer aos pesquisadores e para que sejam minimizados, todos os procedimentos de cultivo serão executados seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos instrumentais, materiais, suplementos e meio de cultura utilizados.

Como benefício, a pesquisa envolvendo o Tumor Odontogênico Ameloblastoma, que possui altas taxas de prevalência e recidiva, poderá fornecer para a comunidade científica informações relevantes sobre a morfologia e comportamento deste Tumor, podendo promover o desenvolvimento de drogas e mecanismos ligados a diminuição dos prognósticos ruins que envolvem as neoplasias ligadas a cavidade oral e ao organismo como um todo.

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do Guamã

CEP: 66.075-110

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-7735

Fax: (91)3201-8028

E-mail: cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO**



Continuação do Parecer: 2.482.441

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo de grande relevância para a odontologia e para a sociedade em geral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória, estão presentes e de acordo com a legislação vigente.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por apresentar todos os termos obrigatórios, por ter relevância social e estar de acordo com a Resolução 466/12, somos favoráveis à sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1002902.pdf	21/11/2017 13:06:32		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_isencao_onus_financeiro CEP.pdf	21/11/2017 13:03:46	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_.pdf	25/09/2017 12:50:55	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_AME_CEP.pdf	23/09/2017 19:39:23	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	23/09/2017 19:35:00	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_aceite_orientador.pdf	23/09/2017 19:34:15	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_orientador.pdf	23/09/2017 19:33:55	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Consentimento_instituicao.pdf	23/09/2017 19:33:27	JOAO DE JESUS VIANA PINHEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
 Bairro: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.482.441

Não

BELEM, 09 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

ANEXO III

Formato da revista

Trabalho elaborado e formatado conforme as normas do periódico científico Experimental Cell Research.



ISSN: 0014-4827

Disponível em:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622826?generatepdf=true

Article structure

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

Material and methods: Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results: Results should be clear and concise.

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

Conclusions: The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations.* Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names.

Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

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

Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

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

References

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

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately

(e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/experimental-cell-research>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

For reference style 1 numbered: [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 1a numbered without article and chapter titles: [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and

surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.
<http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 2 Harvard Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 3 Vancouver Numbered: [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 4 Vancouver Name and Year: Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 5 APA: Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

For reference style 6 AMA: 5. Oguro, M, Imahiro, S, Saito, S, Nakashizuka, T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

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

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Virtual Microscope: The journal encourages authors to supplement in-article slide images with corresponding high resolution whole slide scans for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based slide viewer that enables users to view slide

images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share high resolution versions of slides with their readers. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/about/contentinnovation/virtual-microscope>. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create slide scans for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed and contains conventional slide images.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication.

You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment

on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.