



**Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação**

André Luís Ribeiro Ribeiro

Imunoexpressão das metaloproteinases da matriz, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz e fatores de crescimento no tumor odontogênico queratocístico.

Belém

2011

André Luís Ribeiro Ribeiro

Imunoexpressão das metaloproteinases da matriz, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz e fatores de crescimento no tumor odontogênico queratocístico: o possível papel na regulação da invasividade local e atividade proliferativa.

Dissertação apresentada ao Curso de Odontologia da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, pelo programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Área de Concentração: Patologia oral

Orientador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

Belém – Pará

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Pará
Faculdade de Odontologia
Biblioteca Prof. Dr. Francisco Gemaque Álvaro

Ribeiro, André Luís Ribeiro

Imunoexpressão das metaloproteinases da matriz, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz e fatores de crescimento no tumor odontogênico queratocístico: o possível papel na regulação da invasividade local e atividade proliferativa / André Luís Ribeiro Ribeiro; orientador, João de Jesus Viana Pinheiro. — 2011. 76f. 6 il. 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Belém, 2011.

1. Patologia bucal. 2. Tumores odontogênico. 3. Neoplasias bucais. 4. Boca - Doenças. I. Título.

CDD - 22. ed. 616.31

**Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia**

Candidato: André Luís Ribeiro Ribeiro

Título da dissertação: Imunoexpressão das metaloproteinases da matriz, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz e fatores de crescimento no tumor odontogênico queratocístico: o possível papel na regulação da invasividade local e atividade proliferativa.

Orientador: João de Jesus Viana Pinheiro

A comissão julgadora de trabalhos de defesa de dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 25 de fevereiro de 2011 na cidade de Belém, considerou o candidato:

Aprovado Reprovado

Examinador: Nome: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Examinador: Nome: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Examinador: Nome: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir”.

DALAI LAMA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Primeiramente a minha mãe NEUZA MARIA RIBEIRO RIBEIRO, pelo amor e confiança incondicionais, apoio em todas as horas e ainda por servir de inspiração para o caminho da odontologia.

A meus irmãos MARCOS e CÉZAR, pela amizade, companheirismo e por partilharem comigo de momentos singulares na minha vida.

Aos amigos, que nesta vida de andanças, foram mais que apenas amigos. Vocês me acolheram como membro de suas próprias famílias. Sei que cada um de vocês saberá quando e como se enquadrar nesta condição.

Aos pacientes, que confiaram em minhas mãos suas vidas, na ciência e arte da cirurgia. Por vocês, todo sacrifício e esforço são justificáveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO, pela compreensão, confiança e conhecimento a mim dedicado. Obrigado por me orientar no caminho da pesquisa e por me acolher em seu grupo de trabalho. Os caminhos que foram abertos serão pros primeiros passos de uma longa jornada.

Ao Prof. Dr. MÁRIO HONORATO DA SILVA E SOUZA, coordenador da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia, em nome de todos os professores do mestrado e da Universidade Federal do Pará pela oportunidade a mim oferecida.

Ao Prof. Dr. JOÃO PAULO DO VALLE MENDES, magnífico reitor do Centro Universitário do Pará e do Prof. Dr. OSCAR FASCIOLA PESSOA, coordenador do curso de Odontologia, pelo apoio institucional na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO DE MELO ALVES JÚNIOR, pela co-orientação neste trabalho, no qual pode compartilhar suas experiências e conhecimentos, sendo muitas vezes meus olhos diante do microscópio.

Ao Prof. Dr. RUY GASTALDONI JAEGER, que tem contribuído com seus conhecimentos neste e em outros trabalhos desenvolvidos.

Ao Prof. Dr. VITOR DE OLIVEIRA CARVALHO, primo e amigo, que trilhou comigo os primeiros passos em rumo do conhecimento, muito antes deste trabalho iniciar. Um exemplo de pesquisador dedicado à ciência.

Às Profas. Dra. MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA e Dra. REGINA FÁTIMA FEIO BARROSO, que auxiliaram na manipulação dos reagentes e também cederam seu espaço para que pudesse fotografar as lâminas.

Às Profas. MSc TÂNIA MARIA DE SOUZA RODRIGUES e HIAM GHASSAN DE VASCONCELOS, pela amizade e companheirismo, vocês amenizam a saudade gerada pela distancia dos familiares.

À Profa. MSc MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES PINHEIRO, que em muitas vezes teve que transportar reagentes e também por abrir mão do tempo com seu marido, para que este pudesse me orientar neste trabalho.

Aos professores do CESUPA, em especial aos professores MSc. SÍLVIO MENEZES, MSc. HELENA RODRIGUES, Dr. PATRÍCIA SOUZA, Dra. ELISA KLATAU e o grupo de professores do Diagnóstico Integrado, pela amizade e por compartilhar experiências na difícil arte da docência.

Ao CD JOSÉ CARLOS MENDES BEZERRA, que me acolheu como um filho quando me mudei para Belém, assim como me auxiliou nos primeiros passos profissionais. Muitas das minhas conquistas pessoais têm o toque de suas mãos. Obrigado por tudo, sempre serei grato pelo que fez e continua fazendo por mim.

Aos colegas de trabalho da URES/DOCA, Max, Ruy, Andréia e Regina, que compreenderam e me ajudaram nos momentos em que tive que me ausentar para poder concluir este trabalho.

Ao ITENIR, técnico de laboratório, que forneceu grande ajuda no preparo de peças e matérias de laboratório, assim como me ensinou como manusear as peças na execução do experimento.

Aos colegas de mestrado, em especial a MARIANA, JOSÉ MARCELO, RAFAELA, ISABELA e GABRIELA pela ajuda e amizade.

Ao amigo MARCELO MARTINS MANESCHY, que com sua amizade se tornou um irmão e me acolheu junto com sua mãe MARIA AUXILIADORA como membro de sua família.

A todos os amigos, que se não agradeço nominalmente, levo-os em meu coração, pela importante amizade construída ao longo destes anos.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho.

Ribeiro ALR. **Imunoexpressão das metaloproteinases da matriz, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz e fatores de crescimento no tumor odontogênico queratocístico: o possível papel na regulação da invasividade local e atividade proliferativa.** 2011. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

RESUMO

O tumor odontogênico queratocístico (TOQ) é uma neoplasia benigna de origem odontogênica caracterizada por invasividade local e recorrência. Sugere-se que o TOQ produza metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que seriam responsáveis por degradação da matriz extracelular (MEC), influenciando sua invasividade local. Uma vez degradada a MEC, fatores de crescimento seriam liberados da matriz óssea, com potencial de influenciar o comportamento biológico das células neoplásicas do TOQ. Neste trabalho, foram estudadas as MMPs, TIMPs e fatores de crescimento que regulariam a invasividade local e atividade proliferativa do tumor odontogênico queratocístico. Quinze casos de TOQ foram incluídos no estudo. Quatro casos da variante cística do tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) foram usados como controle. Através de estudo imunohistoquímico foi avaliada a expressão das MMPs, TIMPs, fatores de crescimento e seu receptor, assim como a via de sinalização da proteína quinase regulada por sinalização extracelular (ERK 1/2). As áreas de marcação foram mensuradas e analisadas através de porcentagem em TOQ e TOCC. Utilizou-se para análise de correlação o teste de Spearman entre as proteínas estudadas no TOQ. Todas as amostras de TOQ expressaram MMPs, TIMPs, fatores de crescimento e seu receptor, a via ERK e sua forma ativada. Todas as amostras de TOCC também expressaram as mesmas proteínas numa quantidade significativamente menor que o TOQ, exceto para MMP-2 e TIMP-1 que apresentaram expressões similares no TOQ.

Houve correlação entre MMP-9 e TIMP-2, assim como destas com o fator de crescimento epidermóide (EGF), fator de transformação do crescimento alfa (TGF α) e o receptor de fator de crescimento epidermóide (EGFr). MMP-9 foi expressa de forma marcante no citoplasma, mas eventualmente estava presente no núcleo. A forma ativa, fosforilada, da proteína quinase regulada por sinalização extracelular (pERK), apresentou expressão significativamente maior no TOQ e correlacionou positivamente com os fatores de crescimento (EGF e TGF α) e EGFr. MMP-9, TIMP-2, EGF e TGF α agem juntos, provavelmente regulando proliferação e invasividade no TOC. EGFr provavelmente é um receptor comum destas moléculas. ERK 1/2 é o transdutor dos sinais gerados por fatores de crescimento, MMP-9 e TIMP-2. O resultado deste processo pode estar relacionado ao aumento da invasividade e proliferação no TOQ.

PALAVRAS CHAVES: Tumores odontogênicos, tumor odontogênico queratocístico; metaloproteinases da matriz; inibidores teciduais de metaloproteinases; fatores de crescimento; EGF; TGF α ; EGFr; ERK; pERK.

Ribeiro ALR. **Immunoexpression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and growth factors in keratocystic odontogenic tumor: the possible role in regulating local invasiveness and proliferative activity.** 2011. Master of Science Dissertation (Clinical dentistry) – Institute of Health Sciences, School of Dentistry, Federal University of Pará, Belém, 2011.

ABSTRACT

The keratocystic odontogenic tumor (KOT) is a benign tumor of odontogenic origin characterized by local invasiveness and recurrence. It is suggested that KOT produces matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) that would account for the degradation of extracellular matrix (ECM), acting on their invasiveness. Once ECM is degraded, growth factors would be released from the bone matrix, probably affecting biological behavior of KOT cells. Here we studied MMPs, TIMPs and growth factors regulating local invasiveness and proliferative activity of keratocystic odontogenic tumor. Fifteen cases of KOT were included in our study. Four cases from cystic variant of calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) were used as controls. Immunohistochemistry assessed expression of MMPs, TIMPs, growth factors, and ERK 1/2 signaling pathway. Staining areas were measured and expressed as percentage in either KOT or control samples (CCOT). Spearman's rank correlation test analysis was used amongst the proteins studied in KOT. All KOT samples expressed MMPs, TIMPs, growth factors and their receptor, the ERK pathway and its activated form. All CCOT samples also showed the same proteins in a significantly lower quantity, except for MMP-2 and TIMP-1, which had similar expression in KOT. MMP-9 and TIMP-2 showed correlation with one another as well as with epithelial growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF α) and the receptor of epidermal growth factor

(EGFr). MMP-9 was markedly observed in cytoplasm, but sometime was expressed in cell nuclei. The active, phosphorylated, form of the extracellular signal-regulated kinase (pERK) showed a significantly higher expression area in the KOT when compared to CCOT and it correlated positively with the growth factors (EGF and TGF α) and EGFr. MMP-9, TIMP-2, EGF and TGF α act together, probably regulating proliferation and invasiveness of KOT. EGFr would be a common receptor of these molecules. ERK 1/2 is the transducer of signals generated by growth factors, MMP-9 and TIMP-2. The outcome of this process would be related to increase of KOT proliferation and invasiveness.

KEYWORDS: Odontogenic tumours; keratocystic odontogenic tumour; matrix metalloproteinases; tissue inhibitors of metalloproteinases; growth factors; EGF; TGF α ; EGFr; ERK; pERK

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Imunohistoquímica das MMPs no TOQ e no TOCC.....	31
FIGURA 2	Imunohistoquímica das TIMPs no TOQ e no TOCC.....	32
FIGURA 3	Imunohistoquímica dos fatores de crescimento no TOQ e no TOCC.	33
FIGURA 4	Imunohistoquímica da via de sinalização ERK no TOQ e no TOCC.	34
FIGURA 5	Gráfico de comparação das proteínas estudadas entre as áreas de marcação no TOQ e no TOCC.....	35
FIGURA 6	Diagrama que resume nosso atual entendimento da invasividade local e atividade proliferativa no tumor odontogênico queratocístico.	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Metaloproteinases de mamíferos.....	15
TABELA 2	Anticorpos utilizados e condições da reação.....	27
TABELA 3	Resultados do teste de correlação de Spearman.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	do inglês “bovin serum albumin”, traduzido como soro albumina bovina.
cAMP	adenosina monofosfato cíclica.
DNA	do inglês “deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico.
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	do inglês “epidermal growth factor”, traduzido como fator de crescimento epidermóide.
EGFr	do inglês “epidermal growth factor receptor”, traduzido como receptor para o fator de crescimento epidermóide.
ERK	do inglês “extracellular signal-regulated protein kinase” traduzida como proteína quinase regulada por sinalização extracelular
IL	interleucina.
G_0	fase do ciclo celular em que as células permanecem metabolicamente ativas, mas não entram em proliferação até que seja necessário.
G_1	fase do ciclo celular que representa um intervalo entre a mitose e o início da replicação de DNA.
LSAB	“Labelled Streptavidin-Biotin”
MEC	Matriz extracelular.
MMPs	do inglês “matrix metalloproteinases”, traduzidas como metaloproteinases da matriz.
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	pró-análise.
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline” traduzido como tampão fosfato-salino
PCNA	do inglês “proliferative cell nuclear antigen”, traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular.
pH	cologarítimo da concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)
pERK	do inglês “phospho-extracellular signal-regulated protein kinase” traduzida como fosfo-proteína quinase regulada por sinalização extracelular
TGF α	do inglês “transforming growth factor”, traduzido como fator de transformação do crescimento.
TIMPs	do inglês “tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, traduzido como inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz.
TOQ	tumor odontogênico queratocístico
TOCC	tumor odontogênico cístico calcificante
TRIS	tri-hidroximetil-aminometano.

LISTA DE SÍMBOLOS

α alfa

β beta

γ gama

$^{\circ}$ graus

% por cento

μ micron

μm micrômetro

nm nanômetro

kDa kilodalton

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1	Tumor odontogênico queratocístico.....	5
2.2	Tumor odontogênico cístico calcificante.....	9
2.3	Matriz extracelular.....	10
2.4	Metaloproteinases da matriz e seus inibidores teciduais.....	14
2.5	Fatores de crescimento.....	18
2.6	Via de sinalização celular.....	21
3	OBJETIVO.....	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1	Amostras de tecido.....	24
4.2	Material de laboratório.....	24
4.3	Método.....	26
4.3.1	Cortes das peças.....	26
4.3.2	Imunohistoquímica.....	26
4.3.3	Análise dos Resultados.....	28
4.3.4	Análise estatística.....	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Imunohistoquímica das MMPS, TIMPS, fatores de crescimento, ERK e pERK no TOQ.....	30
5.2	Áreas de marcação de MMPs, TIMPs e fatores de crescimento no TOQ e TOCC.....	34
5.3	Áreas de marcação de ERK e pERK no TOQ e TOCC.....	36
5.4	Correlação entre as áreas de marcação no TOQ.....	36
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÕES.....	45
8	REFERÊNCIAS.....	46
9	ANEXO A – Parecer do comitê de ética.....	60

1 INTRODUÇÃO

O tumor odontogênico queratocístico (TOQ) é uma neoplasia benigna localmente invasiva, derivada do epitélio odontogênico, definida como uma neoplasia intra-óssea uni ou multicística, caracterizada por um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado.¹ Uma das características desta neoplasia que têm gerado grandes desafios está relacionada a sua alta taxa de recidiva, mesmo após tratamento cirúrgico. Taxas que variam entre 3 a 60% dos casos, dependendo do tratamento empregado.² Devido ao seu comportamento clínico agressivo, o TOQ é umas das lesões mais controversas dos maxilares na literatura.

Em 2005, esta lesão foi reclassificada quanto a sua natureza pela Organização Mundial da Saúde (OMS), deixando de ser considerado um cisto de desenvolvimento chamado de queratocisto odontogênico, para atualmente ser considerado um tumor odontogênico benigno.¹ No entanto, os mecanismos envolvidos em sua invasividade local ainda não foram totalmente esclarecidos.

Os tumores são circundados por tecido conjuntivo que formam o estroma, compostos por componentes celulares, que incluem fibroblastos e miofibroblastos, dispostos numa rede tridimensional complexa e organizada de macromoléculas de suporte conhecida como matriz extracelular (MEC).³ A matriz extracelular pode ser dividida em matriz intersticial e membrana basal (MB). Ambas possuem uma estrutura básica composta por colágeno, sendo que a matriz intersticial é formada por colágenos tipicamente fibrilares como o tipo I, e a membrana basal por colágeno tipo IV.⁴ A membrana basal é praticamente impenetrável para células normais e funciona como primeira barreira para invasão tumoral.⁵

A invasão tumoral é um processo no qual células neoplásicas destroem e infiltram o tecido normal nas proximidades da massa tumoral,⁶ e pode ser analisada sob a hipótese dos

“três passos” da invasão celular: adesão das células tumorais a MEC, degradação da MEC por proteólise, e migração celular em direção à área degradada.⁷ As metaloproteinases da matriz (MMP) são um grupo de endopeptidases largamente estudadas na literatura, justamente por realizarem proteólise da MEC e sua ação tem sido relacionada com o crescimento invasivo de uma variedade de tumores.⁸⁻¹⁰ As MMPs apresentam um papel crucial em diversas funções fisiológicas como a reparação tecidual e desenvolvimento de órgãos, no processo inflamatório e em doenças, como as neoplasias.^{11,12}

Existem mais de 20 tipos de metaloproteinases na família das MMPs, na qual a subfamília das gelatinases, que incluem as MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel crítico na tumorigênese devido a sua capacidade de degradar o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, e primeiro obstáculo para as células tumorais causarem invasão e metástase.¹³

Apesar deste papel crucial no desenvolvimento tumoral, as MMPs não devem ser analisadas exclusivamente como portadoras de atividade proteolítica, mas sim, como reguladoras da função celular, uma vez que as mesmas alteram a função celular normal em processos fisiológicos e patológicos, interagindo com o meio ambiente local em múltiplas vias de sinalização na biologia celular.^{11,14}

Por esta razão, o papel da MEC no comportamento tumoral não deve ser limitado a uma simples barreira física, mas como um potencial modulador do microambiente tumoral, servindo de reservatório de proteínas ligantes e fatores de crescimento. Estas substâncias que antes estavam aprisionados na matriz óssea são liberadas após o processo de degradação da MEC, e passam a modular a função celular por uma série de processos complexos.^{14,15} As células mantêm uma via de comunicação com a MEC através de receptores transmembranas, que podem influenciar o comportamento celular induzindo crescimento, diferenciação, síntese protéica e mobilidade.⁵

O comportamento biológico do TOQ foi estudado tendo as MMPs como ponto central de uma série de eventos que poderiam culminar com aumento da síntese protéica, proliferação celular e invasão, reguladas pelas TIMPs.^{14,16} As MMPs presentes no TOQ promoveriam proteólise localizada da MEC, propiciando a liberação de uma série de fatores com atividade biológica, entre eles, fatores de crescimento. Estes fatores de crescimento ao atingirem receptores específicos na membrana celular, ativariam uma cascata de proteínas quinase com sinalização nuclear.^{14,16} Esta cadeia de eventos levaria a um aumento da atividade proliferativa induzindo mitoses, assim como a um aumento da síntese protéica de mais MMPs num processo de alimentação autócrina.

Com este objetivo, realizou-se um estudo imunohistoquímico a fim de detectar a expressão das MMPs-2 e -9, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs-1 e -2), em amostras de TOQ humanos. Estudou-se também a imunexpressão do receptor do fator de crescimento epidermóide (EGFr), um receptor tirosina quinase que é ativado de forma anormal em muitos tumores epiteliais.¹⁷ EGFr é uma proteína transmembrana que possui um domínio ligante-permanente extracelular e um domínio intracelular de tirosina quinase.¹⁸ O EGFr é ativado em seu domínio extracelular por seus ligantes naturais, o fator de crescimento epidermóide (EGF) e o fator de transformação do crescimento alfa (TGF α),¹⁹ ambos os fatores de crescimento relacionados ao desenvolvimento tumoral promovendo angiogênese,^{18,20} ativação da proliferação celular¹⁸ e metástase²⁰, e tornam-se disponíveis para células tumorais após serem liberados da MEC degradada.²¹ A ligação entre EGF/TGF α e o EGFr, resulta na ativação do domínio intracelular tirosina quinase do receptor, que por sua vez, pode iniciar a fosforilação de uma cascata de proteínas quinase de sinalização extracelular, um dos mais importantes caminhos de proliferação celular.^{22,23} Utilizou-se o tumor odontogênico calcificante cístico (TOCC) como controle para expressão das mesmas moléculas, pois o mesmo é uma neoplasia epitelial cística

odontogênica não invasiva¹ e é conhecido por expressar as MMPs estudadas.²⁴ Foi realizada análise de correlação para determinar a interação destas moléculas no TOQ. Procurou-se por marcadores de sinalização celular no TOQ.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar a compressão do texto, a revisão da literatura foi dividida em tópicos, a saber:

2.1- Tumor odontogênico queratocístico

2.2- Tumor odontogênico calcificante cístico

2.3- Matriz extracelular

2.4- Metaloproteinases da matriz e seus inibidores teciduais

2.5- Fatores de crescimento

2.6- Via de sinalização celular

2.1 Tumor odontogênico queratocístico (TOC)

O TOQ é uma neoplasia benigna localmente invasiva, derivada do epitélio odontogênico, definida como uma neoplasia intra-óssea uni ou multicística.¹ Histologicamente, o TOQ é descrito como uma lesão formada por uma fina camada de epitélio escamoso paraqueratinizado, com aproximadamente 5 a 8 camadas de células, coberto por uma camada corrugada de paraqueratina.²⁵

A camada basal tende a exibir um padrão celular em paliçada com um núcleo uniforme.¹ O epitélio pode invadir a camada basal e o tecido conjuntivo adjacente, dando origem à formação de microcistos destacados, comumente chamados de cistos filhos ou satélites.²⁶ A cápsula cística é freqüentemente fina e contém células do infiltrado inflamatório.²⁷

O TOQ é uma das lesões mais controversas na literatura desde que foi inicialmente descrita por Philipsen em 1956.²⁸ Esta lesão vem merecendo considerações especiais há algum tempo, pois apresenta comportamento clínico singular, caracterizados por uma agressividade local e taxa de recidiva bastante elevadas.²⁵ Este comportamento do TOQ era

exclusivo quando comparado com os demais cistos odontogênicos sendo questionado quanto uma possível natureza neoplásica da lesão.²⁹

O TOQ era anteriormente conhecido queratocisto odontogênico, um cisto de desenvolvimento de origem nos remanescentes celulares da lâmina dentária, compreendendo cerca de 10% a 12% de todos os cistos odontogênicos. Uma lesão que acometia principalmente indivíduos do gênero masculino, numa faixa etária bastante ampla, apesar de a maioria dos casos serem diagnosticados em idades de 10 a 40 anos.²⁵

Contudo, o TOQ diferencia-se dos demais cistos odontogênicos, possuindo um padrão de crescimento diferenciado. Uma característica do TOQ bastante singular é o tipo de crescimento da lesão no interior do osso. Enquanto os cistos dentígero ou radicular provocam expansão óssea conforme vão aumentando de tamanho, o TOQ apresenta mínima expansão da cortical mesmo em lesões grandes, invadindo o tecido ósseo medular em um crescimento em sentido antero-posterior. Esta característica sugere um papel importante do epitélio da lesão na invasão tumoral.²⁵

O crescimento de um cisto odontogênico se deve principalmente pelo aumento da pressão intracística decorrente da elevação da pressão osmótica em sua luz atraindo fluidos da área perilesional para o seu interior. Com a entrada de fluídos no interior do cisto, a pressão hidrostática exercida pela cápsula sobre o osso circunvizinho promoveria reabsorção óssea, e conseqüentemente proporcionaria o aumento do tamanho da lesão. O aumento da pressão osmótica é decorrente da necrose celular das células epiteliais mais distantes da camada basal, que expõe seu conteúdo citoplasmático que apresenta uma osmolaridade maior que do líquido intersticial. Desta forma, as lesões crescem em todos os sentidos, levando a expansão de corticais.³⁰ O TOQ apresenta um crescimento em sentido antero-posterior através do osso medular, o que sugere a participação de outros mecanismos na patogênese da lesão.^{25,31,32}

Após uma série de publicações que enfatizaram o comportamento clínico do TOQ, questionamentos de sua natureza cística ou neoplásica foram instituídas.³¹⁻³⁴ Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) revisou a classificação das lesões odontogênicas e mudou sua classificação deixando de ser um cisto de desenvolvimento chamado de queratocisto odontogênico para ser classificado entre as neoplasias odontogênicas, sendo considerado um tumor benigno de origem odontogênica, passando a se chamar tumor odontogênico queratocístico.¹

Essas mudanças são de extrema importância, pois sugerem que existem muitas propriedades a serem conhecidas no TOQ, visto que quanto mais conhecimento é obtido de uma determinada lesão, maior será a probabilidade de instituir terapia adequada. O TOQ apresenta taxas de recidivas que podem variar de 3 a 60% dos casos.² Tendo em vista do objetivo do tratamento de uma neoplasia que é a remoção de todo o tecido patológico, diferentes modalidades terapêuticas podem ser selecionadas e que possibilitem a alcançar o objetivo de remover o tecido patológico e minimizar as chances de recidiva, associado a menor morbidade para o paciente.³⁵

Pogrel e Jordan³⁶ em 2004 publicaram um estudo no qual obtiveram um resultado clínico e radiológico de 10 casos de TOQs através da marsupialização. Eles observaram que após o tratamento com marsupialização, o epitélio que reveste a área que anteriormente era ocupada pela lesão era um epitélio similar à mucosa oral normal. Avaliaram ainda a expressão de bcl-2, uma proteína antiapoptose que é forte e constantemente expressa nas células da camada basal do TOQ e não em outros cistos odontogênicos. A expressão de bcl-2 foi observada nos tecidos oriundos da biópsia incisiva dos TOQs e estava ausente no epitélio que recobria o local anterior a lesão, que era similar à mucosa oral. Os resultados foram atribuídos a redução da pressão intracística e também à alteração e substituição do epitélio do TOQ por um epitélio mucoso normal,

seja devido metaplasia do epitélio do TOQ ou por migração e substituição do epitélio do TOQ por células normais da mucosa oral das bordas da ferida da marsupialização.

Posteriormente em 2007, Pogrel³⁷ relatou que desde a data de publicação de um estudo anterior de Pogrel e Jordan³⁶ em 2004 os autores haviam tratado 42 paciente com casos de TOQ por marsupialização, com o controle mais longo de 5 anos. Destes, 5 casos apresentaram recidiva, sendo 3 deles intra-ósseo e 2 casos próximos a cavidade oral. Os autores concluíram que a marsupialização e descompressão podem reduzir o tamanho do TOQ, e até reduzir completamente, mas remanescentes epiteliais do TOQ podem levar a recidiva. Uma segunda cirurgia seria necessária para resolução dos casos.

Numa revisão sobre as taxas de recidivas do TOQ relacionados à modalidade terapêutica, a ressecção é a que está relacionada com a menor taxa de recidiva (0%), mas com a maior taxa de morbidade, criando um defeito ósseo de difícil reconstrução. A enucleação simples recidivou em uma faixa de 15 a 56% dos casos, e a associação de enucleação com a solução de Carnoy ou com marsupialização prévia apresentou uma taxa de recidiva entre 1 a 8,7%.³⁸ Resultados discrepantes após tratamento diversos têm sido atribuídos a algumas propriedades do tumor que lhe conferem uma maior invasividade.^{35,38,39}

O TOQ é considerado um tumor localmente invasivo e destrutivo, com tendência a recorrência mesmo após tratamento cirúrgico.⁴⁰ Alguns autores têm procurado esclarecer os motivos deste comportamento biológico através de estudos imunohistoquímicos.

A atividade proliferativa do TOQ foi avaliado por uma série de marcadores como a expressão de p53, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e ki67.²⁸ Estes marcadores são expressados em maior quantidade no TOQ do que em outros cistos odontogênicos e podem estar relacionados ao crescimento tumoral.³²

Atividade anti-apoptose pode ser outro mecanismo relacionado ao crescimento tumoral, uma vez que pode levar a sobrevivência celular. Bcl-2 é uma proteína derivada de um proto-oncogene localizado no cromossomo 18q21 e que é caracterizado por bloquear a apoptose sem promover proliferação celular. TOQs expressam bcl-2 predominantemente na camada basal.⁴¹ Bcl-2 inibe apoptose na camada basal e supra-basal para facilitar proliferação celular nesta região. Enquanto a apoptose e homeostasia são mantidos nas camadas mais altas, o que preserva a espessura do epitélio e permite a síntese de grande quantidade de queratina na superfície do TOQ. Considerando o balanço entre proliferação, diferenciação e morte celular nesta lesão, pode se explicar seu comportamento neoplásico com atividade proliferativa elevada, contudo sem formação de uma massa tumoral.²⁸

TOQs também expressam citocinas inflamatórias que desempenham um papel importante em seu crescimento. O epitélio do TOQ expressa grande quantidade de interleucina-1 α (IL-1 α) e IL-6.⁴² Elas são responsáveis por estimular a reabsorção óssea induzindo a formação e/ou ativação de células semelhantes a osteoclastos, produção de prostaglandinas e collagenases.²⁸

Os TOQs possuem uma marcação fraca e descontínua de laminina e colágeno tipo IV, sugerindo uma interação incomum do epitélio e do tecido conjuntivo.^{43,44} Esta interação entre o epitélio neoplásico e a MEC sugerem o caminho a ser estudado a seguir.

2.2 Tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC)

O TOCC foi descrito pela primeira vez como uma patologia distinta em 1962 por Gorlin, chamado cisto odontogênico calcificante, uma lesão odontogênica cística de natureza não-neoplásica²⁴. Em 2005, a OMS reclassificou a lesão e a definiu como uma neoplasia cística benigna derivada do epitélio odontogênico chamada tumor odontogênico cístico calcificante.¹

O TOCC constitui cerca de 1,43% dos tumores odontogênicos⁴⁵. Histologicamente é caracterizado por uma lesão cística bem-definida, com uma cápsula fibrosa. O epitélio consiste de células cúbicas ou colunares na camada basal, formado por células que podem lembrar o retículo estrelado de um ameloblastoma. Apresenta como característica um número variável de células fantasmas no componente epitelial. Algumas destas células fantasmas podem estar calcificadas.²⁵

O tratamento do TOCC é cirúrgico e a enucleação simples é o tratamento de escolha com pouquíssimas recidivas relatadas na literatura.²⁵ O TOCC expressa uma série de MMPs, dentre elas a MMP-1, -2, -7, -9 e 26 e supõe-se que estas MMPs poderiam contribuir para o crescimento e expansão da neoplasia.²⁴ O TOCC apresenta características como ser uma neoplasia benigna cística derivada do epitélio odontogênico com um comportamento clínico pouco agressivo e com baixas taxas de recidivas, e por estes motivos, tem sido utilizado como controle para avaliação da imunexpressão de uma série de proteínas como as MMPs.^{14,46,47}

2.3 Matriz extracelular

A matriz extracelular é uma rede tri-dimensional macromolecular organizada de forma precisa,⁴⁸ composta por uma grande variedade de moléculas estruturais, como colágenos, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos que são secretados localmente e estão em estreita associação com a superfície da célula que os produz.⁴⁹

Inicialmente acreditava-se que a MEC seria uma estrutura de suporte inerte, entretanto é atualmente conhecida como uma estrutura dinâmica que possui papel biológico importante e funciona como um reservatório biológico para uma variedade de componentes que desempenham um papel complexo na regulação do comportamento das

células com as quais fazem contato, influenciando seu desenvolvimento, crescimento, sobrevivência, migração, transdução de sinais, forma e função.⁵⁰⁻⁵²

A matriz não é uma estrutura estática e está em constante remodelação por ação de diferentes enzimas, especialmente as da família das metaloproteinases de matriz.⁵⁰ Disponibilidade dessas substâncias para as células podem ser regulados através de rearranjos da matriz, como os que ocorrem, por exemplo, durante os processos de cicatrização e de invasão neoplásica.³

A MEC apresenta uma ultraestrutura que pode ser dividida em matriz intersticial e membrana basal. Ambas possuem uma estrutura básica composta por colágeno, sendo que a matriz intersticial é formada por colágenos tipicamente fibrilares como o tipo I, e a membrana basal por colágeno tipo IV.⁵³

A MB é uma estrutura altamente especializada da matriz extracelular. É formada por fina camada de proteínas extracelulares que possuem íntimo contato com células de vários tecidos. Além de situar-se adjacente às células epiteliais, a membrana basal também se encontra recobrando outras células, como as do mesotélio, músculos, células de Schwann e adipócitos.^{54,55} É composta por uma camada de 20 a 300nm de espessura formada por um complexo protéico de matriz extracelular especializada. Sua estrutura é identificada via transmissão de microscopia eletrônica como uma folha eletro-densa adjacente a uma monocamada células epiteliais ou endoteliais. A MB separa camadas monocelulares do tecido conjuntivo subjacente, promovendo suporte estrutural para células, e, influenciando e modificando o comportamento celular via sinalização de fora para dentro.⁵⁶

A MB possui funções mecânicas de suporte, ancoragem celular e compartimentalização de tecidos. Também desempenha outras atividades, sendo capaz de determinar a polaridade celular, influenciar o metabolismo das células, organizar as

proteínas na membrana plasmática, promover sobrevivência celular e proliferação e, atuar como vias para a migração celular.⁵⁷

Quando madura, a MB é, em sua maior parte, constituída por moléculas de colágeno organizadas em rede.^{58,59} O colágeno tipo IV forma a arquitetura da membrana basal, sendo sintetizado por células do estroma e células parenquimais ou células de revestimento.⁵⁸

A membrana basal serve como barreira para grandes solutos e é impenetrável para a maioria das células no tecido adulto, exceto durante processos inflamatórios e desenvolvimento embrionário.⁵ Por isso, ela representa o primeiro obstáculo a ser atravessado por células neoplásicas durante o processo de invasão. As células tumorais desenvolvem mecanismos que as permitem ultrapassar este obstáculo e migrar para o estroma circundante.^{5,53}

A composição da membrana basal é variável, principalmente quando comparada uma MB fisiológica a uma MB tumoral. Esforços com o intuito de analisar a composição e organização fisiológica da membrana basal têm demonstrado sua heterogeneidade e seu papel biológico multifuncional. Quatro componentes básicos irão formar a MB e são eles o colágeno tipo IV, laminina, nidógeno e perlecan.⁶⁰

O colágeno tipo IV é um colágeno não fibrilar que forma cerca de 50% da MB. Seis genes distintos são responsáveis por codificar seis cadeias diferentes de colágeno tipo IV, conhecidas como cadeias ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) com 400 nm de comprimento. O domínio colágeno consiste numa seqüência repetitiva de aminoácidos Gli-X-Y, na qual X e Y são freqüentemente prolina e hidróxiprolina ou lisina e hidróxilisina. O colágeno tipo IV é secretado de células na forma de protômero. Os protômeros do colágeno tipo IV são heterotrímeros compostos de três cadeias- α , e atualmente são conhecidas nas seguintes

combinações: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ e $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ e também os possíveis protômeros $\alpha 1\alpha 1\alpha 5$, $\alpha 1\alpha 2\alpha 5$ e $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$.⁶¹

A laminina é a proteína não colágena mais abundante na MB. Onze genes diferentes codificam as 11 cadeias da família laminina: ($\alpha 1-5$, $\beta 1-3$ e $\gamma 1-3$). A cadeia- α possui uma média de 400 kDa de tamanho e 160 nm de extensão. Ambas as cadeia β - e γ - possuem uma média de 200 kDa com braços curtos de 60 e 40 nm de extensão respectivamente.⁶²

O nidógeno, também conhecido como entactina, compõe cerca de 2% a 3% de todas as proteínas da MB. Dois genes denominados NID1 e NID2, codificam os dois tipos de nidógenos. O nidógeno1 possui 30 nm de extensão e o nidógeno2 com 40 nm. Ambos compartilham estrutura organizacional semelhantes.⁶³ Nidógenos se ligam ao colágeno tipo IV, perlecan, laminina fibrinogênio e fibronectina.⁶⁴ Os dois tipos de nidógenos são expressos em todas as MB e estudos em mouses atímicos demonstraram que estas glicoproteínas não são essenciais para formação da MB em embriões, mas são fundamentais para o correto funcionamento das MB pós-natais de certos órgãos como o coração e pulmão.⁶⁵

A perlecan é um proteoglicano heparan sulfatase, cujo núcleo possui de 400 a 450 KDa de tamanho com cinco domínios distintos (Domínios I-V). Sua estrutura é semelhante a um colar de pérolas e possuem vários locais de ligação com o nidógeno, colágeno tipo IV, integrina e heparina. Perlecan está expresso em praticamente todas as MB e também são fundamentais na condrogênese. Também podem ser encontrados no tecido conjuntivo fora da MB.⁶⁶

A invasividade local dos tumores está associada à capacidade dessas lesões em exercerem atividades proteolíticas e degradar a matriz extracelular (MEC).^{8,11,14,16} Com a

intenção de avaliar este critério, vários estudos têm sido direcionados ao estudo das metaloproteinases da matriz.

2.4 Metaloproteinases da matriz e seus inibidores teciduais

As MMPs são um grupo de endopeptidases que estão envolvidas em funções na homeostasia, dentre elas a reparação tecidual e imunidade, tanto quanto em processos patológicos como fibroses, inflamações e neoplasias¹¹ (TABELA 1). As MMP são caracterizadas por sua habilidade em degradar a MEC e sua ação tem sido relacionada ao crescimento invasivo de uma variedade de carcinomas.⁶⁷

As MMPs fazem parte de uma família de proteínas zinco dependentes, que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular.^{68,69} Desse modo, participam da remodelação da matriz extracelular, atividade inerente aos processos de cicatrização e de crescimento epitelial invasivo, tanto durante a morfogênese e a organogênese, quanto durante o crescimento de carcinomas e cistos.⁷⁰ São controladas por fatores de crescimento, hormônios, oncogenes e citocinas.^{71,72}

As MMPs são classificadas em 4 subfamílias: colagenases, gelatinases, estromelinas e metaloproteinases de matriz tipo membrana (MT-MMPs). As MMPs são expressas em baixos níveis em tecidos normais de adultos, o aumento desta expressão parece estar relacionado com o desenvolvimento de vários processos patológicos incluindo artrite reumatóide, invasão tumoral, doença periodontal e enfisema pulmonar.⁷³

As MMPs são secretadas na forma inativa como pró-MMP e podem ser ativadas por diferentes agentes: substâncias químicas como acetato aminofenilmercúrio, ácido hipocloroso (HOCL) e dodecil sulfato de sódio; proteinases como a tripsina e a plasmina e agentes caotrópicos.⁷⁴

TABELA 1: Metaloproteinases de mamíferos

DESIGNAÇÃO	NOME COMUM	OUTROS NOMES	MECANISMO DE ATIVAÇÃO
MMP-1	Colagenase-1 Mcol-A, Mcol-B	Colagenase fibroblástica, colagenase intersticial	Desconhecido
MMP-2	Gelatinase-A	72-kD gelatinase 72- kD colagenase tipo IV	MT1-MMP/TIMP-2
MMP-3	Estromelisina-1	Transina-1	Desconhecido
MMP-7	Matrilisina	PUMP	Desconhecido
MMP-8	Colagenase-2	Colagenase de neutrófilo	Desconhecido
MMP-9	Gelatinase-B	92-kD gelatinase 92- kD colagenase tipo IV	Desconhecido
MMP-10	Estromelisina-2	Transina-2	Desconhecido
MMP-11	Estromelisina-3	-	Furina
MMP-12	Metaloelastase	-	Desconhecido
MMP-13	Colagenase-3	Colagenase de rato	MT1-MMP/TIMP-2
MMP-14	MT1-MMP	MMP tipo membrana	Furina
MMP-15	MT2-MMP	-	Furina
MMP-16	MT3-MMP	-	Furina
MMP-17	MT4-MMP	-	Furina
MMP-19	RASI-1	-	Desconhecido
MMP-20	Enamelisina	-	Desconhecido
MMP-21	-	-	Desconhecido
MMP-22	-	-	Desconhecido
MMP-23	CA-MMP	-	Furina
MMP-24	MT5-MMP	-	Furina
MMP-25	Leucolisina	MT6-MMP	Furina
MMP-26	Endometase	Matrilisina-2	Desconhecido
MMP-27	-	-	Desconhecido
MMP-28	Epilisina	-	Furina

Fonte: Fu X et al., 2008.¹¹

As MMP-2 e MMP-9 fazem parte do grupo das gelatinases, sendo por isso denominadas respectivamente, de gelatinase A e gelatinase B. Sua principal função é clivar

colágeno desnaturado, sendo importantes na degradação da membrana basal. A MMP-2 possui a capacidade de clivar colágeno tipo I, II e III, e é importante para a osteogênese, migração celular, aumento da afinidade pelo colágeno e ação antiinflamatória. A MMP-9 é responsável pelo aumento da afinidade pelo colágeno, ação pró e antiinflamatória e resistência das células tumorais.⁷⁵

As MMP-2 e MMP -9 digerem o colágeno tipo IV da membrana basal e a MMP-9 é capaz de clivar fibrina, e está envolvida em processos como a oncogênese.⁷⁶ As gelatinases são bem conhecidas como fator de prognóstico em diversos tipos de cânceres.⁷⁷

As MMPs apresentam inibidores naturais dentre os quais são conhecidas a $\alpha 2$ macroglobulina e os inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecidos como TIMPs. A atividade proteolítica de degradação da MEC pelas MMPs, resulta do balanço entre a concentração destas enzimas e de suas inibidoras endógenas.⁷⁸

Existem quatro tipos de TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, as quais são produzidas por vários tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoblastos.^{79,80} As TIMPs inibem a invasão celular *in vitro*, tumorigênese, metástase *in vivo* e angiogênese, e são importantes não somente no processo de renovação da matriz, mas também em algumas atividades celulares.⁷¹ TIMP-1 e -2 são os inibidores teciduais de MMPs mais estudados na literatura e apresentam papéis importantes na invasividade de tumores odontogênicos.^{14,16}

As TIMPs são constituídas de dois domínios funcionais e estruturais. O domínio N-terminal sozinho é um eficiente inibidor de todas as MMPs através de interação com o domínio catalítico da enzima. O domínio C-terminal tem ao menos dois sítios ligantes distintos, um para MMP-2 e outro para MMP-3. A taxa de inibição de cada enzima é aumentada por interação com o domínio C-terminal.⁸¹ TIMPs influenciam a ativação de pro-metaloproteinases e agem também modulando proteólise da MEC.⁷² Em certos tipos

celulares, TIMPs possuem atividade semelhante a fatores de crescimento e inibem tumorigênese e fenótipo metastático de células cancerígenas.⁸²

Contudo, os efeitos das TIMPs *in vitro* não podem ser extrapoladas literalmente para situações *in vivo*. Existe um grupo específico de MMPs, as metaloproteinases da matriz tipo membrana (MT-MMP) que apresentam quatro diferentes tipos, a MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT4-MMP. A ligação da MT1-MMP com TIMP-2 pode ativar o mecanismo de ação da MMP-2 e induzir a proteólise.^{83,84}

MMPs e TIMPs agem juntas na remodelação da MEC. Como visto anteriormente, a matriz extracelular não somente oferece suporte estrutural para as células, mas também atua como reservatório de citocinas e fatores de crescimento. Através de receptores localizados em sua superfície, as células recebem sinais e são capazes de perceber o microambiente que as cerca e assim reagir a estímulos. Desta maneira, o estado das macromoléculas dentro da MEC é de extrema importância e a proteólise decorrente da interação entre MMPs e TIMPs são as maiores responsáveis por mudanças ocorridas nessa matriz. A proteólise pode afetar a aderência das células à MEC, bem como liberar fatores de crescimento e citocinas.^{52,68}

Pesquisas a respeito da MEC têm veiculado que fragmentos ou epítopos de macromoléculas presentes na matriz também podem apresentar alguma atividade biológica. A partir desses dados, surgiu o termo cryptic (do Latin *crypticus*) para se referir a sítios funcionais que estão escondidos dentro da estrutura das macromoléculas da MEC, e que, portanto, não estão expostos na superfície da proteína.⁵²

Em algumas situações, os fragmentos das moléculas da MEC apresentam uma bioatividade que as moléculas progenitoras não possuem. Alguns desses fragmentos bioativos, gerados principalmente através da ação das MMPs, estão relacionados à ativação de receptores e fatores de crescimento nas células.⁶⁸

2.5 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são polipeptídios que estão presentes no soro ou são produzidos pelas células, e que modificam a proliferação celular. A biologia dessas moléculas difere um pouco da dos hormônios clássicos porque seus sítios de síntese e de atuação estão restritos a tecidos definidos. Alguns fatores de crescimento são chamados fatores de competência, pois não estimulam diretamente a síntese de DNA, mas tornam as células em G0 e G1 competentes a fazê-lo. Outros são considerados fatores de progressão, já que estimulam a síntese de DNA.⁸⁵

A MEC funciona como um reservatório para citocinas e fatores de crescimento latentes. A liberação e ativação desses fatores de crescimento podem depender do processo de proteólise mediado pelas MMPs.⁶⁸

Dois fatores de crescimento em geral chamam a atenção no estudo da invasividade local do TOQ, são eles o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de transformação do crescimento- α (TGF α). O EGF e o TGF α fazem parte da mesma família de fatores de crescimento, mas que são codificadas por genes distintos. Dessa família também fazem parte os fatores de crescimento do pox vírus, a anfiregulina, entre outros. Essas moléculas caracterizam-se por possuir alta afinidade ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr) e por produzir resposta proliferativa em células sensíveis à sinalização de EGF.⁸⁶

Ambos os fatores conservam uma estrutura molecular em comum, o domínio EGF, compostos por seis resíduos de cisteína que formam uma estrutura importante para sua ligação com o receptor. No entanto, os domínios transmembrana e citoplasmático de TGF α e EGF não apresentam similaridades, o que pode explicar algumas diferenças de função entre eles.⁸⁷

O EGF possui um importante papel na regulação da proliferação tanto de células normais quanto células neoplásicas.⁸⁸ Algumas evidências sugerem que o sistema regulatório celular estimulado por EGF pode desenvolver um importante papel na carcinogênese. Esse fator de crescimento é capaz de promover a carcinogênese viral e a expressão de proto-oncogenes, além de apresentar atividade imunossupressora.⁸⁹

O TGF α é um polipeptídeo de 50 aminoácidos que foi extraído inicialmente de células transformadas pelo vírus do sarcoma e por esse motivo foi considerado seu envolvimento na transformação de células normais em cancerosas.⁸⁵ Ele é estrutural e funcionalmente similar ao EGF, compartilhando uma identidade em torno de 42%.⁹⁰

O TGF α maduro e solúvel é processado a partir de um precursor transmembrana, o pró-TGF α . Essa molécula é formada por um domínio extracelular aminoterminal e está ancorado no plasma a partir de uma porção hidrofóbica aminoácida intermediária, possuindo ainda uma porção citoplasmática C-terminal.⁸⁷

O pro-TGF α passa por uma clivagem endoproteolítica seqüencial para que haja a liberação da forma ativa do fator. A forma transmembrana também é biologicamente ativa e pode interagir com o receptor EGFr em células adjacentes. Existe ainda uma forma mais agressiva desse fator transmembrana, o pro-TGF α que sofreu apenas clivagem em sua porção N-terminal, e que foi detectado na membrana plasmática em certas linhas de células tumorais. Esse precursor apresenta uma capacidade aumentada de ativar EGFr e isso vem sendo associado com maior crescimento em alguns tumores.⁹¹

O TGF α tem sido relacionada à progressão, invasão e metástase de uma série de neoplasias, tanto pelo suprimento sanguíneo, devido ao potencial angiogênico de TGF α que promove uma maior vascularização ao redor do tumor, quanto pela proliferação celular e depósito de matriz extracelular.⁸⁷

O EGF e o TGF α liberados após degradação da MEC poderão induzir proliferação celular através de uma via de sinalização de uma enzima denominada quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A fim de compreender este processo é necessário o estudo do EGFr.^{92,93}

O EGFr é uma glicoprotéina membro da família erb-B de receptores tirosinoquinases, por esse motivo sendo também conhecido por erb-B1. Em outras palavras, esse receptor é uma proteína transmembrana que possui atividade intrínseca de ativação fosfotransferase.⁹⁴

O EGFr pode se ligar e ser ativado por alguns fatores de crescimento como o EGF e TGF α . Estes fatores contêm vários tipos de aminoácidos que possuem um papel importante em sua ligação com o receptor. A estimulação promovida por um desses ligantes pode promover replicação de DNA seguida por divisão celular. Esse sistema parece ser uma das influências mais importantes no crescimento de células epiteliais.⁹⁵

A função de EGFr pode estar desregulada em várias desordens malignas, nas quais podemos encontrar super expressão do receptor,^{91,94} mutação do receptor que resulta em ativação independente de ligante e ativação autócrina a partir de superprodução dos ligantes.^{94,95} Nesses tumores, o EGFr está envolvido na transformação maligna e no crescimento tumoral, a partir da inibição da apoptose, proliferação celular, promoção de angiogênese e metástase.⁹⁴

É importante ressaltar que, para que possa gerar proliferação exagerada, a expressão de EGFr deve ser acompanhada da presença de ligantes ativos, já que o surgimento de um fenótipo maligno depende da exposição das células a altas concentrações de EGF. A hiperproliferação também pode estar relacionada a uma alteração do meio que promova a apresentação do receptor a fluidos secretórios contendo EGF, implicando em sinalização e proliferação inesperada.⁹⁵

Como relatado anteriormente o EGFr é uma proteína transmembrana cujo domínio extracelular pode ser ativado pelo EGF e TGF α . A porção intracelular do EGFr pode ser alinhada a proteínas tirosinoquinases e à subunidade catalítica das quinases dependentes da adenosina monofosfato cíclica (AMP cíclico). Esta porção pode levar a fosforilação da via de sinalização do ERK e induzir proliferação celular.⁹⁶

2.6 Via de sinalização celular

Apesar das células estarem circundadas pela membrana citoplasmática que separa o meio intra e extracelular, as células são capazes de responder a estímulos provenientes do meio externo proveniente de mitógenos ou hormônios e converter estes sinais em processos celulares.⁹⁷ A cascata de sinalização do ERK é uma via de sinalização chave que monitora a interação da célula com o meio extracelular.⁹⁶

A ativação do ERK requer fosforilação, transformando a forma inativa da cascata ERK na sua forma ativa fosforilada pERK. Uma vez ativada, a ERK torna-se capaz de promover fosforilação de substratos citoplasmáticos, membranosos e nucleares muitos dos quais são proteínas quinase cuja atividade prolonga e diversifica a cascata de sinalização.⁹⁶

Proteínas quinases são enzimas que transferem grupamentos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia, como o trifosfato de adenosina (ATP), para moléculas-alvo específicas, os substratos. Este processo tem o nome de fosforilação. O substrato pode ativar-se ou inativar-se mediante a fosforilação. Estas enzimas são ativadas pela adenosina monofosfato cíclica (AMP-cíclica), que catalisa a fosforilação das proteínas. A ativação da cascata do ERK participaria na regulação da proliferação, diferenciação sobrevivência e apoptose celulares.⁹⁷

A ativação da cascata do ERK ocorre no citoplasma, porém para exercer a maioria das suas funções, ela deve se deslocar para o núcleo da célula. A manutenção da ligação de

integrinas da MEC é importante para manutenção da ativação do ERK para suficiente acumulação no núcleo.⁹³

A proliferação celular decorrente da ativação da cascata da ERK é realizada através da transição do ciclo celular que leva a célula a sair da fase G1 para S. Esta ativação é necessária para a indução de vários mecanismos da via da proteína ciclina D1.⁹⁶

O comportamento biológico do TOQ foi estudado tendo as MMPs como ponto central de uma série de eventos que poderiam culminar com aumento da síntese protéica, proliferação celular e invasão, regulados pelas TIMPs. As MMPs presentes no TOQ promoveriam proteólise localizada da MEC, propiciando a liberação de uma série de fatores com atividade biológica, entre eles, fatores de crescimento. Estes fatores de crescimento ao atingirem receptores específicos na membrana celular (EGFr), ativariam uma cascata de proteínas de sinalização celular (ERK). Esta cadeia de eventos levaria a um aumento da atividade proliferativa induzindo mitoses, assim como a um aumento da síntese protéica de mais MMPs num processo de alimentação autócrina.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a imunexpressão das MMP-2 e MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, fatores de crescimento EGF e TGF α , seu receptor, EGFr e da proteína ERK e sua forma ativa pERK no tumor odontogênico queratocístico.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Verificar o padrão de imunorreatividade das MMP-2 e MMP-9 e TIMP-1 e TIMP-2 nas células epiteliais do TOQ e compará-las ao TOCC.
- 2- Verificar o padrão de imunorreatividade dos fatores de crescimento EGF e TGF- α , e do receptor EGFr nas células epiteliais do TOQ e compará-las ao TOCC.
- 3- Verificar o padrão de imunorreatividade da proteína ERK e sua forma ativa pERK nas células epiteliais do TOQ e compará-las ao TOCC.
- 4- Verificar se existe correlação entre as proteínas estudadas no TOQ

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, registrado com o CAAE 0084.0.073.000-10 e parecer número 124/10 – CEP-ICS/UFPA.

4.1 Amostras de tecido

As amostras de tecido foram coletadas nos arquivos do Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, Centro Universitário do Pará – CESUPA (Belém, PA, Brasil). Foi composta por quinze blocos de parafina (correspondentes à amostra de 15 indivíduos) contendo fragmentos de tecido obtido através de biópsia, diagnosticados microscopicamente como TOQ. Como critério de inclusão, foram selecionados todos os casos diagnosticados e confirmados histologicamente como TOQ. Como critério de exclusão, foram excluídas amostras que estivessem relacionadas ao mesmo paciente, sendo utilizada apenas a amostra que apresentasse o padrão histológico mais característico e em melhor conservação. Quatro casos de TOCC foram estudados como controle.

4.2 Material de laboratório

- Micrótomo de parafina
- Vidrarias de Laboratório (lamínulas, tubos de ensaio, entre outros);
- Lâminas imersas em poly-D-lisina (Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA)
- Solução de BSA (tampão bloqueador);
- Tampão PBS (tampão fosfato-salino)
- Xilol;
- Etanol;
- Hidróxido de amônia a 10%;

- Anticorpos para imunohistoquímica: anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 (DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA), anti-EGFr (Spring Bioscience, Inc., Pleasanton, CA, USA), anti-EGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-TGF- α (Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA), anti-ERK e anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
- Álcool metílico P.A.;
- Ácido Cítrico;
- Peróxido de hidrogênio a 3%;
- Anticorpos secundário e terciário – LSAB (DAKO Corporation, Carpinteria CA, EUA);
- Diluente de anticorpo (DAKO Corporation, Carpinteria CA, EUA);
- Diaminobenzidina;
- Hematoxilina de Mayer
- Microscópio de luz com câmera Axioskop 40 (Carl Zeiss, Germany)
- Solução de recuperação antigênica Tris/EDTA (Dako, Carpinteria, CA, USA)
- Solução de recuperação antigênica tampão citrato (Dako, Carpinteria, CA, USA)
- EDTA - sal dissódico (INLAB)
- Tris 99% (INLAB)
- Tween 20 (INLAB)
- Computador para trabalhar imagens e dados estatísticos
- Programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- Programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA)

4.3 Método

4.3.1 Cortes das peças

Foram realizados cortes seriados em blocos de parafina com três micrometros de espessura.

4.3.2 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram colhidos em lâminas tratadas com poli-D-lisina (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, EUA). Amostras de TOCC foram utilizadas como controle.

Substituição do anticorpo primário por BSA e soro fetal bovino em tampão TRIS foi utilizada como controle negativo.

Para detecção das proteínas estudadas foram utilizados anticorpos anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2, anti-EGFr, anti-TGF α , anti-EGF, anti-ERK 1/2 e anti-pERK 1/2.

Os anticorpos primários foram diluídos em diluente de anticorpo (Dako, Carpinteria, CA, USA) e incubados por uma hora em temperatura ambiente em câmara escura úmida.

Após lavagem com água destilada para remoção do excesso dos anticorpos primários, foi realizada a incubação dos anticorpos secundário e terciário por 30 minutos em temperatura ambiente em câmara escura úmida.

Clones, fornecedores, diluição e solução para recuperação antigênica podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2. Anticorpos utilizados e condições da reação.

Anticorpo	Clone	Fonte	Diluição	Solução de recuperação antigênica
Anti-MMP-2	A-Gel VC2	DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA	1:25	Tampão Tris/EDTA (pH9.0), Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-MMP-9	Não disponível*	DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA	1:300	Tampão citrato (pH 6.0)
Anti-TIMP-1	102D1	DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA	1:25	Tampão Tris/EDTA (pH9.0), Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-TIMP-2	3A4	DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA	1:100	Tampão citrato (pH 6.0)
Anti-EGFr	SP9	Spring Bioscience, Inc., Pleasanton, CA, USA	1:400	Tampão citrato (pH 6.0)
Anti-EGF	Z-12	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:25	Tampão citrato (pH 6.0), Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-TGF α	Não disponível**	Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA	1:400	Tampão citrato (pH 6.0)
Anti-ERK	C-16	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:1500	Tampão citrato (pH 6.0)
Anti-pERK	Thr 202	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:100	Tampão citrato (pH 6.0)

Abreviações: MMP, metaloproteinase da matriz; TIMP, inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz; EGFr, receptor do fator de crescimento epidermóide; EGF, fator de crescimento epidermóide; TGF α , fator de transformação do crescimento-alfa; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; pERK, fosfo-quinase regulada por sinal extracelular;

* Código do produto: RP O66 (DBS-Diagnostic Biosystem Inc, Pleasanton, CA, USA)

** Código do produto: ab15541 (Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA)

A técnica de imunohistoquímica realizada foi a da imunoperoxidase para os anticorpos utilizados consistindo de:

- a) Desparafinização em xilol e reidratação em série com concentração descendente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%).

- b) Recuperação antigênica em Câmara Pascal em solução específica para cada anticorpo (TABELA 2) por 30 segundos a 125 °C.
- c) Bloqueio da peroxidase endógena (álcool metílico P.A., peróxido de hidrogênio por 20 minutos na proporção de 1:1).
- d) Eliminação de anticorpos inespecíficos (incubação em BSA e soro fetal bovino por 1 hora).
- e) Incubação anticorpo primário por 1 hora.
- f) Lavagem em água destilada para remoção do excesso de anticorpo primário
- g) Incubação anticorpos secundário e terciário (LSAB, DAKO Corporation Carpinteria CA, EUA) para o método estreptoavidina biotina por 30 minutos.
- h) Lavagem em água destilada para remoção do excesso dos anticorpos secundário e terciário
- i) Revelação com diaminobenzidina por 2 minutos (DAB, DAKO Corporation Carpinteria CA, EUA).
- j) Lavagem em água destilada para remoção do excesso de DAB
- k) Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer por 3 minutos.
- l) Desidratação e diafanização.
- m) Montagem das lâminas em Permount.

4.3.3 Análise dos Resultados

A avaliação imunohistoquímica foi realizada através da extensão da área de marcação das proteínas MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, EGFr, EGF, TGF α , ERK 1/2 e pERK 1/2, nas células neoplásicas do TOQ e TOCC. Cinco imagens de campo brilhante foram adquiridas no microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Germany) equipado com uma câmera colorida CCD AxiocCam MRc (Carl Zeiss). Imagens foram adquiridas com o

mesmo aumento (40x). As áreas de marcação com DAB foram separadas e segmentadas usando o plug-in colour deconvolution (descrito por Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) do programa Image J (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband (NIMH, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). Depois da segmentação, toda a área epitelial foi demarcada e selecionada para avaliação. O percentual de área marcada para TOQ e TOCC foi analisado.

Análise qualitativa da imunolocalização das proteínas estudadas foi realizada de forma descritiva.

4.3.4 Análise estatística

Os dados estatísticos foram realizados no programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Diferenças entre os grupos de estudo (TOQ) e controle (TOCC) foram avaliadas com o teste Kruskal–Wallis não paramétrico, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. O teste de correlação de Spearman foi realizado para revelar uma possível correlação entre as áreas de marcação das MMPs, TIMPs, fatores de crescimento, ERK e pERK no TOQ.

5 RESULTADOS

5.1 A imunohistoquímica revelou MMPs, TIMPs, fatores de crescimento, ERK e pERK no TOQ

Todas as amostras de TOQ mostraram marcação de MMP-2 e -9. As células neoplásicas do TOQ mostraram estas enzimas como pontos nas células da camada basal e em células das camadas mais altas (figura 1A-C). MMP-9 mostrou uma expressão citoplasmática nas células epiteliais (figura 1B). Às vezes a marcação estava presente no citoplasma e no núcleo (figura 1C - setas). TOCC também expressou MMP-2 e -9 (figura 1D e 1E). Os controles negativos não mostraram imunoreatividade em qualquer das amostras (figura 1F).

TIMPs também foram expressadas no TOQ (figura 2A e 2B). TIMP-2 (figura 2B) pareceu ser mais proeminente comparado com o TIMP-1, que teve uma marcação fraca (figura 2A). TOCC expressou TIMP-1 e -2 (figura 2C e D). A reatividade foi mais observada nas células do epitélio odontogênico. Nenhuma reatividade foi observada nas células fantasmas.

EGFr estava presente em todas as amostras de TOQ (figura 3A), assim como fatores de crescimento EGF (figura 3B) e TGF α (figura 3C). Em TOQ, a reatividade do EGFr foi mais observada nas células epiteliais da camada basal (figura 3A) e EGF foi detectado nas células epiteliais da camada basal e das camadas mais altas (figura 3B). TGF α foi expresso no citoplasma e no núcleo de células epiteliais do TOQ (figura 3C). Estas proteínas tiveram uma expressão proeminente no TOQ. TOCC também expressou os mesmos fatores de crescimento (figura 3D-F). Esta expressão pareceu ser reduzida comparada a do TOQ.

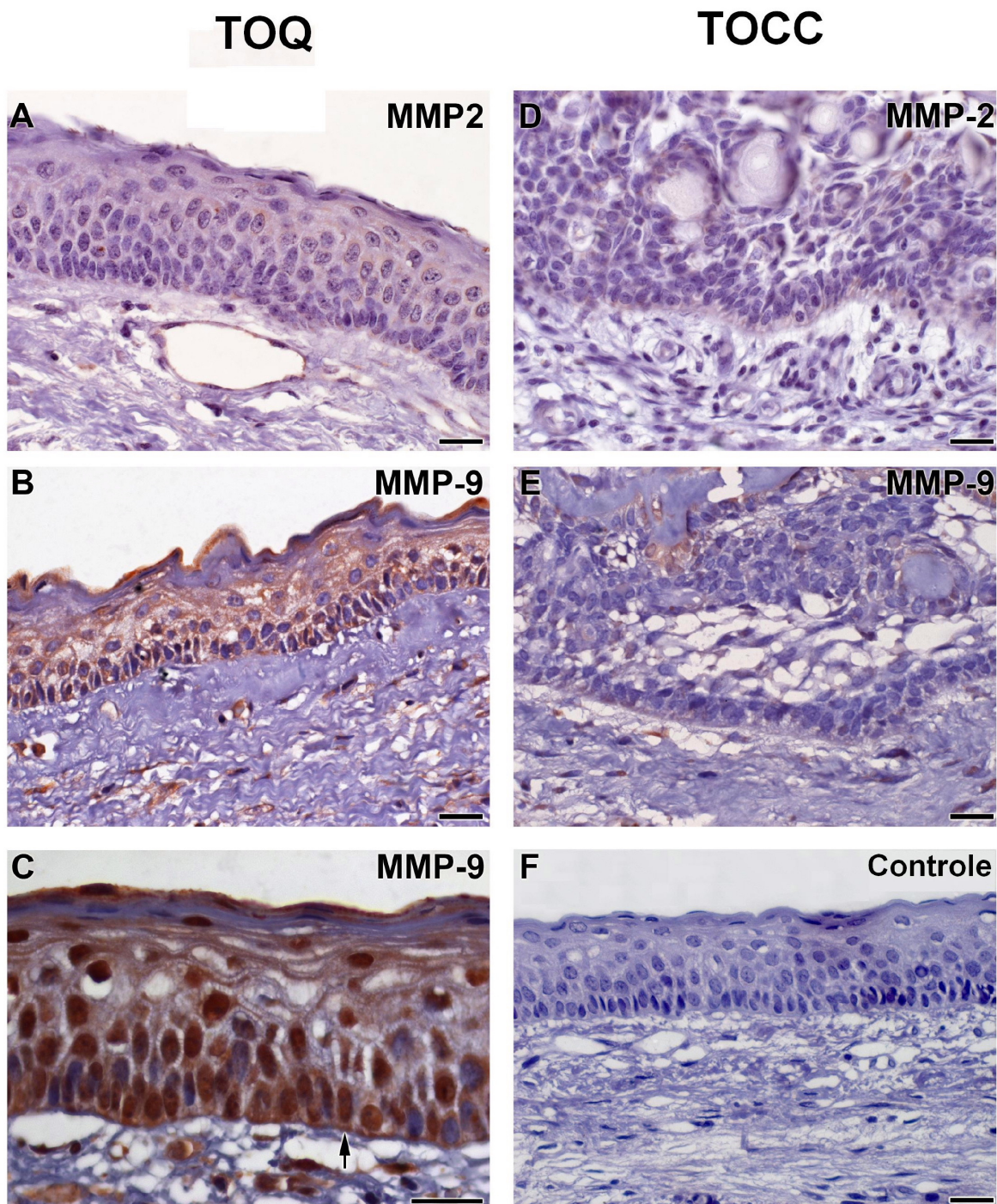


FIGURA 1. MMPs são expressas no TOQ. MMP-2 e MMP-9 estão presentes nas células epiteliais da camada basal e nas células das camadas mais altas (A e B). Às vezes, a marcação para MMP-9 estava presente no citoplasma e no núcleo (C, setas). TOCC também expressou MMP-2 e -9 (D e E). O controle negativo não apresentou imunoreatividade em qualquer amostra (F). Barras de escala: 20 μ m.

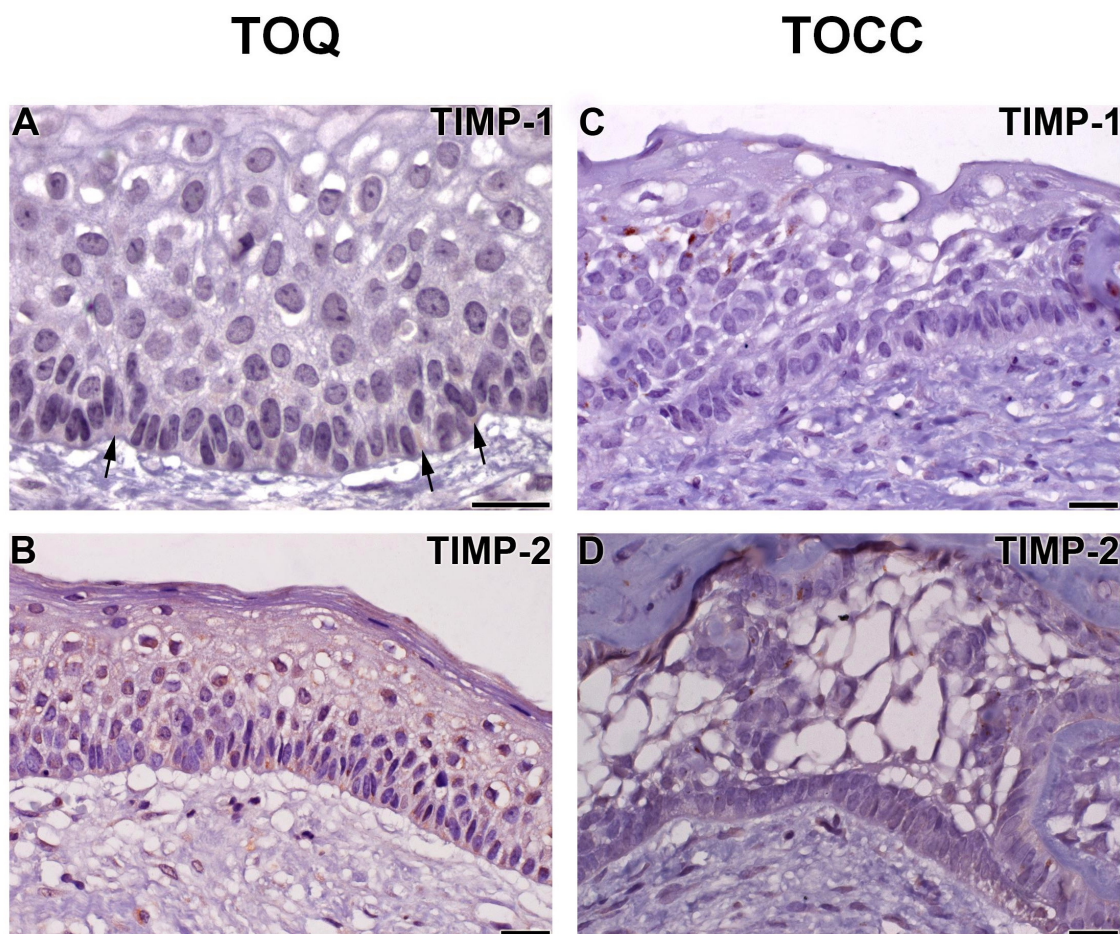


FIGURA 2. TIMPs também foram expressas no TOQ (A e B). TIMP-2 (B) aparentemente foi expressa de forma mais proeminente comparada com TIMP-1, que apresentou fraca marcação (A, setas). TOCC expressou TIMP-1 e TIMP-2 (C e D). Barras de escala: 20 μ m.

O TOQ exibiu ERK 1/2 e sua forma fosforilada (fosfo-ERK 1/2), conforme observado na figura 4. ERK 1/2 estava presente no citoplasma e no núcleo das células neoplásicas (figura 4A). Por outro lado, fosfo-ERK 1/2 foi detectado predominantemente no núcleo das células neoplásicas do TOQ (figura 4B). No TOCC, ERK 1/2 e o fosfo-ERK 1/2 mostraram uma distribuição similar nas células neoplásicas (figura 3C e D). Esta expressão pareceu ser reduzida comparada ao TOQ. Os controles negativos não mostraram imunoreatividade em qualquer das amostras (imagens não mostradas).

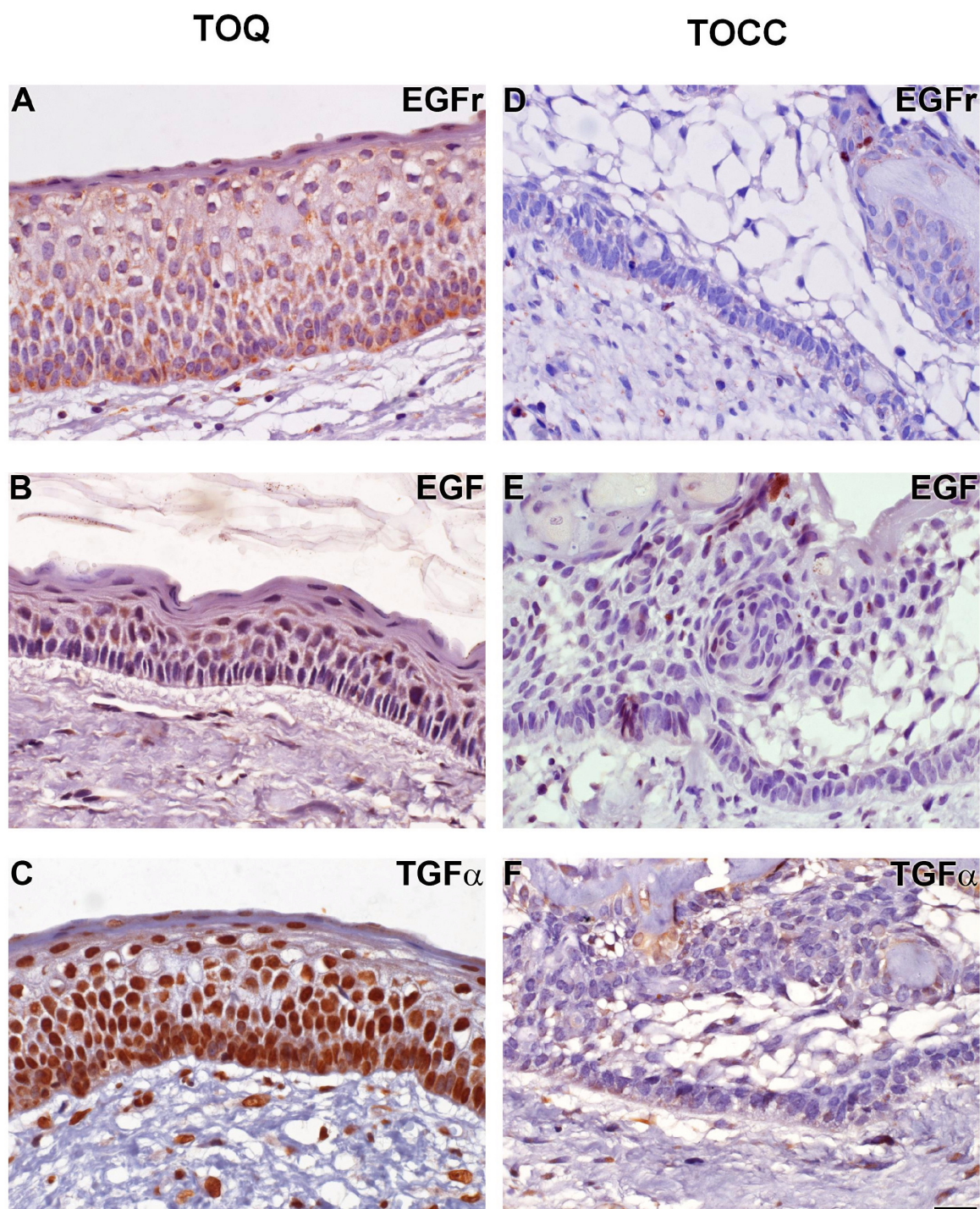


FIGURA 3. O receptor do fator de crescimento epidermóide (EGFr) e fatores de crescimento foram expressos do TOQ. EGFr está proeminentemente expresso nas células da camada basal (A). EGF foi detectado nas células da camada basal e células das camadas mais altas (B). TGF α foi expresso no citoplasma e núcleo das células epiteliais do TOQ (C). O TOCC apresentou uma expressão reduzida de EGFr e fatores de crescimento (D–F). Barras de escala: 20 μ m.

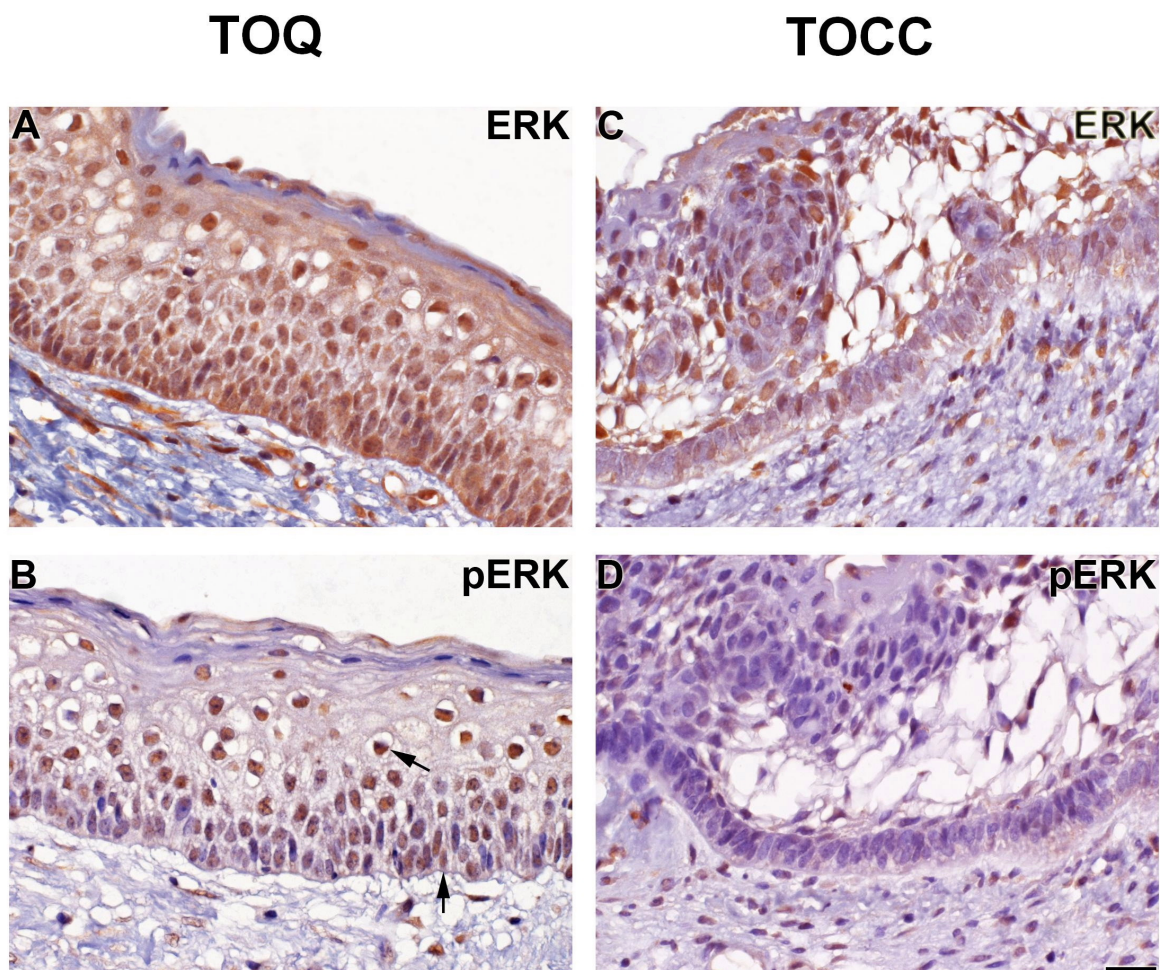


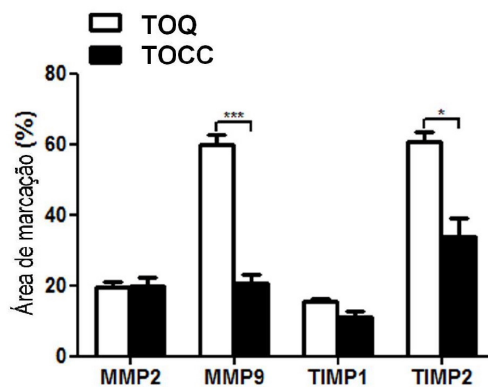
FIGURA 4. ERK e pERK mostraram imunorreatividade no TOQ. Alta expressão do ERK foi observada no citoplasma e núcleo das células da camada basal e células das camadas mais altas (A). A expressão do pERK foi observada predominantemente no núcleo das células da camada basal e células das camadas mais altas quando comparado ao citoplasma (B, setas). A imunoreatividade do ERK e pERK foi mais predominante no TOQ em relação ao TOCC. Bares de escala: 20 μ m.

5.2 As áreas de marcação mostraram uma maior expressão de MMP-9, TIMP-2 e de fatores de crescimento em TOQ quando comparadas com o TOCC.

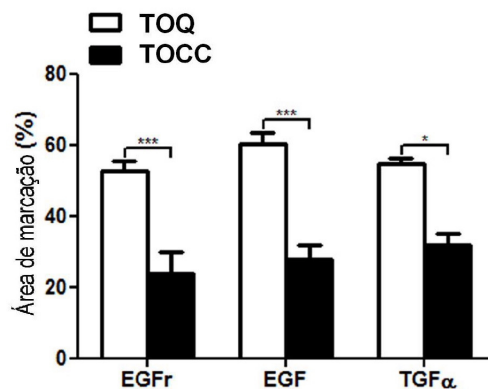
As áreas de marcação de MMPs, de TIMPs e de fatores de crescimento em TOQ e em TOCC são mostradas na figura 5. Imunoreatividade positiva nas células neoplásicas

foram incluídas no regime de contagem. A área de marcação de MMP-9 e de TIMP-2 foi significativamente maior no TOQ comparada com o TOCC (figura 5A).

A TOQ e TOCC: MMPs e TIMPs



B TOQ e TOCC: Fatores de crescimento



C TOQ e TOCC: ERK e pERK

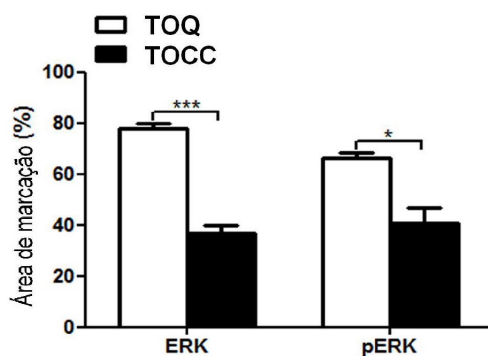


FIGURA 5. Comparação da área de marcação (AM) do TOQ e do CCOT. AMs da MMP-9 (A), TIMP-2 (A), Fatores de crescimento (B), ERK e pERK (C) no TOQ são aumentadas comparadas ao TOCC. Este aumento é observado nas células neoplásicas. Significância: * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

A expressão de todos os fatores de crescimento foi igualmente maior em TOQ do que no TOCC (figura 5B). Estes resultados sugerem que nossos achados em TOQ estejam relacionados a invasividade. Isto nos levou a investigar a expressão de ERK 1/2 e de pERK 1/2 em células epiteliais do TOQ.

5.3 As células neoplásicas do TOQ exibem proeminentemente ERK e fosfo-ERK

Nós procuramos por marcadores da ativação de ERK 1/2 (fosfo-ERK 1/2) em TOQ e TOCC. As áreas de marcação de ERK 1/2 e pERK 1/2 são mostradas na figura 4C. Imunoreatividade positiva nas células neoplásicas foram incluídas no regime de contagem. Nas células neoplásicas do TOQ as áreas de marcação de ERK 1/2 e pERK 1/2 foram significativamente maiores quando comparadas às células neoplásicas do TOCC (figura 5C).

Para resumir nossos resultados, MMP-9, TIMP-2, fatores de crescimento, ERK 1/2 e pERK 1/2 foram observados com maior expressão nas células neoplásicas do TOQ do que no TOCC.

5.4 Áreas de marcação das MMPs, TIMPs, fatores de crescimento, ERK e fosfo-ERK correlacionam no TOQ

Testes de correlação demonstraram uma correlação positiva entre algumas proteínas estudadas (TABELA 3). MMP-9 e TIMP-2 correlacionaram positivamente de forma moderada entre si. A área de marcação entre ambas crescia, conforme aumento da

expressão da outra. Houve também correlação positiva moderada entre MMP-9 e TIMP-2 e fatores de crescimento. Correlação positiva ocorreu entre os fatores de crescimento e seu receptor, EGFr. EGF correlacionou fortemente com EGFr, enquanto TGF α apenas de forma moderada. O pERK 1/2 apresentou correlação moderada com fatores de crescimento e EGFr.

TABELA 3. Teste de correlação de Spearman da área de marcação de MMP-9, TIMP-2, fatores de crescimento e pERK no TOQ.

Proteína 1	Proteína 2	Spearman r	Valor de p
MMP-9	TIMP-2	0,4168	0,0002
MMP-9	EGF	0,3738	0,0010
	TGF α	0,3877	0,0006
TIMP-2	EGF	0,5214	< 0,0001
	TGF α	0,4979	< 0,0001
EGFr	EGF	0,7315*	< 0,0001
	TGF α	0,5627	< 0,0001
pERK	EGF	0,4033	0,0003
	TGF α	0,4330	0,0001
	EGFr	0,4753	< 0,0001

Abreviações: MMP, metaloproteinase da matriz; TIMP, inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz; EGF, fator de crescimento epidermóide; TGF α , fator de transformação do crescimento-alfa; EGFr, receptor do fator de crescimento epidermóide; pERK, fosfo-quinase regulada por sinal extracelular;

* Forte correlação

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que o TOQ expressa MMPs, TIMPs, fatores de crescimento e a via de sinalização ERK. A expressão de MMP-9, TIMP-2, fatores de crescimento, ERK 1/2 e sua forma ativada pERK 1/2 no TOQ é significativamente maior comparada com o TOCC, um tumor odontogênico epitelial não invasivo. Os resultados sugerem que nossos achados em TOQ estejam relacionados a invasividade local e a atividade proliferativa.

O crescimento dos cistos e tumores odontogênicos é controverso e pode estar relacionado com a secreção⁹⁸ e regulação⁴⁷ de MMPs. O TOQ, cisto dentígero e cisto radicular expressam MMP-9 e TIMP-2 e seu mecanismo de expansão podem ser influenciados ou até conduzidos pela secreção de MMPs. A expressão de MMP é elevada no TOQ. Logo, uma expressão exuberante do TOQ pode estar relacionado à elevada agressividade desta lesão.⁹⁸

O KOT cresce e se desenvolve através dos espaços medulares em sentido antero-posterior e pode alcançar grandes extensões sem provocar expansão óssea significativa.² Este comportamento é singular entre os cistos e tumores odontogênicos e tem sido atribuído à atividade proteolítica desta neoplasia. Estudos prévios demonstraram que o KOT possui uma maior expressão de MMP-9,^{24,98,99} TIMP-2²⁴ e TGF α ¹⁰⁰ quando comparado a outros cistos odontogênicos e esta expressão poderia ser responsável pela maior agressividade do KOT. Adicionalmente, foi demonstrado uma expressão semelhante de MMP-9 e TIMP-2 no KOT e ameloblastoma²⁴.

O TOQ apresentou expressão de MMP-2 e -9, TIMP-1 e -2, sendo que a expressão de MMP-9 e TIMP-2, foram estatisticamente maiores quando comparada com o CCOT, e ainda apresentaram correlação positiva entre si. As MMPs são pouco expressas em condições fisiológicas nos tecidos, enquanto em processos patológicos pode haver uma

sobre expressão destas proteínas, além de um desequilíbrio entre seus inibidores teciduais (TIMPs).¹⁰¹

MMP-2 é uma proteína expressa por uma larga variedade de células em condições normais, enquanto apenas um pequeno grupo de células (ex: osteoclastos, leucócitos, células dendríticas) expressam MMP-9 em condições fisiológicas, sendo a MMP-9 mais observada e secretada em processos patológicos.^{21,101} Baixa expressão de MMP-2 tem sido um achado freqüente em cistos e tumores odontogênicos.^{14,102,103} Estudos *in vitro* têm demonstrado que a MMP-2 é secretada de forma espontânea por fibroblastos cultivados de TOQs¹⁰⁴ e a atividade da MMP-2 pode ser inibida pela sobre expressão de TIMP-2 em culturas primárias de ameloblastomas.¹⁰⁵

Se considerarmos a MMP-2 como constitucional, normalmente expressa em tecidos humanos, sua baixa expressão observada em nossos resultados e associarmos a capacidade de TIMP-2 (com alta expressão neste estudo) de inibir a atividade de MMP-2, podemos deduzir que a MMP-2 possa desempenhar um papel secundário na invasividade local de TOQs. Logo, uma atenção especial deve ser considerada ao papel da MMP-9, que apresentou alta expressão, além de correlações interessantes neste estudo.

Adicionalmente, nós observamos uma nova e inesperada marcação de MMP-9 no núcleo das células neoplásicas do TOQ. A marcação nuclear foi confirmada (dados não mostrados) pela incubação de um diferente anticorpo (anti-MMP-9 em uma diluição 1:200, código do produto AB19016, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). A expressão de MMP-9 no núcleo tem sido demonstrada na literatura e está associada a apoptose^{35,38} e divisão celular.³⁹ No entanto, este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido.

MMP-9 é uma das mais importantes proteinases envolvidas na reabsorção óssea, vista a expressão significativamente alta observada em osteoclastos.¹⁰⁶ Os resultados

demonstraram elevada expressão desta proteína cuja associação com as TIMPs, principalmente a TIMP-2, podem ser as responsáveis pela remodelação da MEC em TOQs. Uma remodelação da MEC é fundamental para a invasão tumoral, sendo necessário haver um certo balanço entre degradação da MEC e sua inibição, para que as células neoplásicas possam aderir a certas estruturas e interagir com substratos da MEC e invadir os tecidos vizinhos.⁷ Células neoplásicas do TOQ expressaram grande quantidade de MMP-9 e TIMP-2 e suas áreas de marcação correlacionam positivamente entre si. Estas proteínas provavelmente desempenham um papel crítico no comportamento do TOQ.

As MMP -2 e -9 podem agir de forma independente, apesar de possuírem funções semelhantes, e o mesmo ocorre com TIMP -1 e -2.⁷ Tumores diferentes, podem expressar diferentes tipos de MMPs e TIMPs.¹¹ Contudo, o comportamento clínico de uma determinada lesão pode ser influenciado por proteínas específicas, como observado em nossos resultados, que sugerem uma maior participação de MMP-9 e TIMP-2 no comportamento biológico do KOT. A identificação destas proteínas e suas funções fornecem maior conhecimento a respeito do comportamento da lesão e podem indicar alvos para possíveis tratamentos.¹¹

Baseado em estudos anteriores das MMPs em ameloblastomas, outro tumor odontogênico localmente invasivo, nós seguimos a hipótese de que as MMPs presentes no TOQ promoveriam reabsorção óssea. Após a reabsorção, fatores de crescimento seriam liberados da matriz óssea, tornando-se disponíveis ao ameloblastoma, induzindo um aumento da atividade proliferativa nesta neoplasia.¹⁴ Nossos resultados sugerem um mecanismo interdependente que envolve a síntese de MMP e aumento da atividade proliferativa devido a ação de fatores de crescimento e sua correlação com a via de sinalização celular ERK 1/2, que juntos, poderiam contribuir a invasividade local de TOQs.^{14,16}

Marcadores de proliferação celular como PCNA, Ki67 e p53 são geralmente expressos de forma mais intensa e freqüente no TOQ quando comparados com outros cistos dos maxilares.^{27,33,107} O TOQ apresenta uma maior expressão de Ki67,^{33,108} um expressão similar para p53,^{33,109} e expressão menor de PCNA quando comparado com o ameloblastoma.¹¹⁰

Foi detectada correlação positiva entre a expressão de MMP-9 e TIMP-2 com fatores de crescimento e EGFr. Neste estudo, o TOQ expressou grande quantidade de fatores de crescimento e de EGFr comparados ao CCOT. EGFr é uma importante proteína que afeta a proliferação celular e regula a homeostasia celular,¹² e está presente de forma aberrante em um significativo número de cânceres.¹¹¹

EGFr é ativado por EGF e TGF α , e sua ativação resulta na fosforilação da via de sinalização ERK induzindo proliferação celular,^{18,20,23,112} e síntese de mais MMP-9.^{12,112} Um estudo *in vitro* com células de adenocarcinoma pulmonar humano em camundongos atímicos, mostrou que a ativação do EGFr é dependente de EGF e TGF α , e na ausência destes fatores de crescimento, o EGFr estava expresso, mas em sua forma inativa, enquanto o EGFr ativo estava ausente ou praticamente imperceptível.²⁰ Ativação do EGFr por EGF leva a proliferação celular e metástase de células cancerosas decorrente da sobre expressão de MMP-9.¹¹²

Nós encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre EGF e MMP-9, assim como de EGFr e seus ativadores EGF e TGF α . Estes resultados sugerem um forte participação dos fatores de crescimento EGF e TGF α na biologia tumoral do TOQ e na ativação do EGFr. Na análise de correlação, EGFr correlacionou de forma fortemente positiva com o EGF, mas apenas de forma moderada com TGF α , o que sugere uma maior interação do EGFr com o EGF do que com TGF α em TOQ. Estes achados são importantes, visto que o EGF e EGFr são fortes indutores de secreção de MMP-9.^{12,112}

O TOQ expressa ERK 1/2 e sua forma ativa pERK. ERK 1/2 foi expresso no TOQ tanto no núcleo quanto no citoplasma das células neoplásicas. Uma vez que o ERK é ativado (pERK), ele é deslocado para o núcleo da célula, levando a uma ativação extensiva de fatores da transcrição neste local. Este mecanismo regulador conduz a mudanças globais no perfil da expressão genética que principalmente, mas não inequivocamente, resulta em promoção do crescimento celular, migração e invasão.¹¹³

Foi encontrada uma forte expressão de pERK 1/2 localizado no núcleo das células epiteliais do TOQ. Isto sugere que a cascata do ERK foi ativada e supostamente regula a atividade celular neste tumor. A análise de correlação foi positiva entre pERK 1/2, os fatores de crescimento EGF e TGF α e seu receptor, EGFr, sugerindo uma interação que influencia o crescimento, diferenciação e síntese protéica em células neoplásicas de TOQs.

Nossos resultados indicam que MMP-2, TIMP-2, EGF e TGF α agem juntos cooperando para regular a invasividade e proliferação de TOQs. Nós acreditamos que estas moléculas supostamente agiriam através de um receptor comum, que seria o EGFr. Nós também analisamos uma via de sinalização celular relacionada aos fatores de crescimento e o EGFr. A forma ativa, fosforilada do ERK foi observada e encontrada no núcleo de células neoplásicas do TOQ.

Estes resultados indicam que eventos de sinalização celular ocorrem dentro das células neoplásicas do TOQ, independentemente de sua relação com células do estroma, de uma forma diferente à observada em outros tumores.¹⁴ Estes resultados sugerem que ERK 1/2 é o transdutor de sinais gerados por fatores de crescimento, MMP-9 e TIMP-2, provavelmente aumentando taxa de proliferação celular em TOQs.

A figura 6 resume nosso entendimento da invasividade local e atividade proliferativa do TOQ.

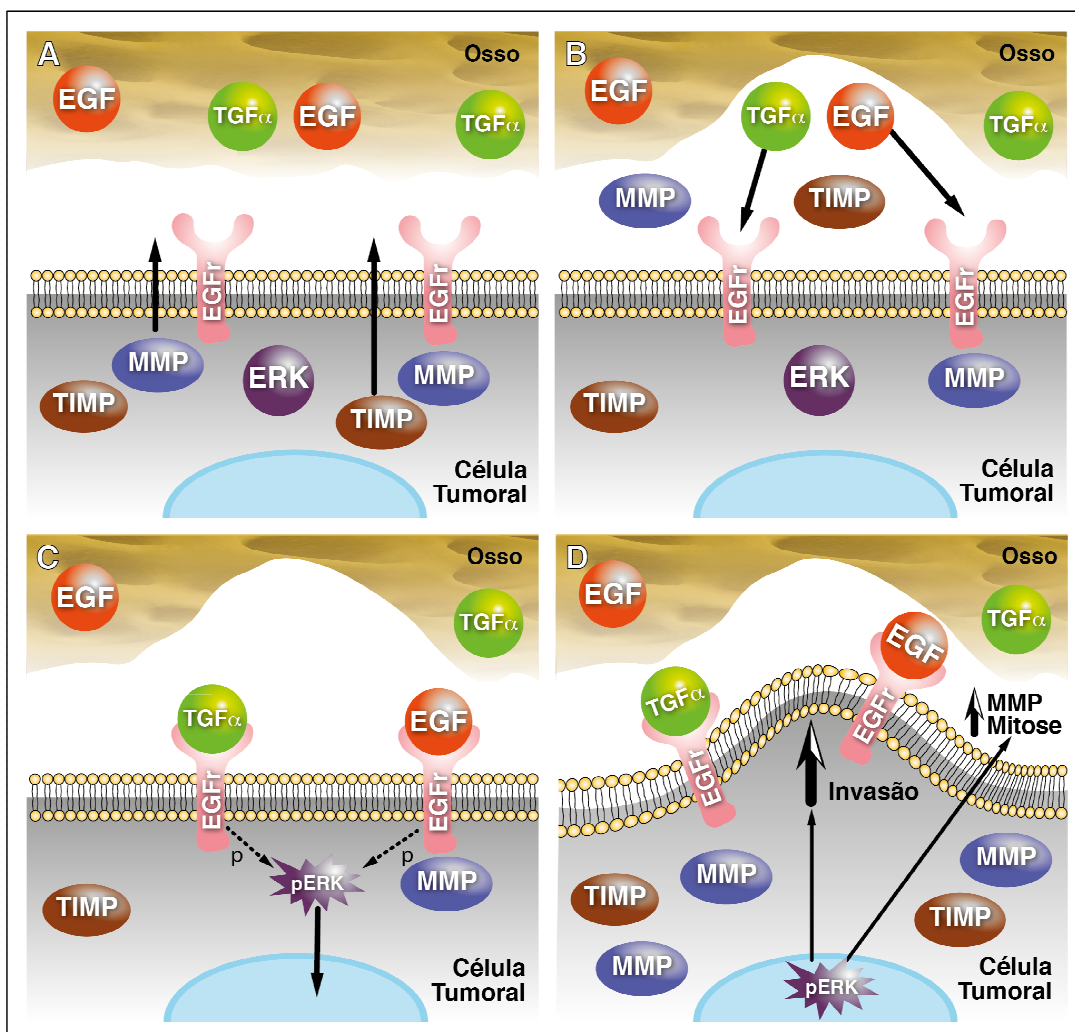


FIGURA 6. Diagrama que resume nosso atual entendimento da invasividade local e atividade proliferativa no tumor odontogênico queratocístico (TOQ). O diagrama mostra a interface osso-célula neoplásica. As metaloproteínas da matriz (MMP) estão presentes nas células do TOQ, enquanto a matriz óssea serviria como um reservatório de fatores de crescimento (A). O TOQ secreta MMPs iniciando a remodelação óssea e solubilização da matriz extracelular. Assim, haveria a liberação do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de transformação do crescimento alfa (TGF α) da matriz óssea (B). Estes fatores de crescimento se ligariam ao mesmo receptor, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr). Uma vez que estivessem ligados, ocorreria uma fosforilação no domínio intracelular do EGFr, ativando e fosforilando a via de sinalização da proteína quinase regulada por sinalização extracelular o ERK (C). A proteína quinase regulada por sinalização extracelular fosforilada (pERK) é translocada para o núcleo, ativando fatores de transcrição relacionado com o crescimento celular, migração e invasão. O resultado deste processo seria a invasão de células neoplásicas, síntese de MMP e mitoses (D).

Em resumo, nós demonstramos a expressão de MMPs, TIMPs e fatores de crescimento em TOQs. Também demonstramos que este tumor pode utilizar a via de sinalização celular ERK para transdução de sinais gerados do microambiente tumoral através de um receptor comum, o EGFr. A expressão dessas proteínas foi comparada com o CCOT, um tumor odontogênico epitelial não agressivo, no qual os resultados da área de marcação foram significativamente maiores no TOQ para a maioria das proteínas estudadas, exceto para MMP-2 e TIMP-1. Estes resultados suportam a hipótese de que existe uma rede de comunicação celular combinando esforços para aumentar a invasividade local e atividade proliferativa em TOQs, que envolve MMP-9, TIMP-2, fatores de crescimento, EGFr e a via de sinalização ERK 1/2, suportada por interatividade entre estas moléculas e análise de correlação positiva entre as mesmas. A rede ERK 1/2 seria o transdutor chave desta rede molecular.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados oriundos do estudo imunohistoquímico de cortes histológicos de tumores odontogênicos queratocísticos, concluí-se:

- 1- As células neoplásicas dos tumores odontogênicos queratocísticos expressam MMP-2 e -9, TIMP-1 e -2, EGFr, EGF, TGF α , ERK e pERK.
- 2- A expressão dessas moléculas é significativamente maior no TOQ do que no TOCC, exceto para MMP-2 e TIMP-1.
- 3- MMP-9, TIMP-2, EGF e TGF α podem agir juntos influenciando invasividade local e proliferação no tumor odontogênico queratocístico.
- 4- O EGF e o TGF α poderiam utilizar um receptor comum, o EGFr, que é fortemente expresso no tumor odontogênico queratocístico e se correlacionam.
- 5- A via de sinalização ERK, seria um possível transdutor dos sinais gerados pelas MMP-9, TIMP-2 e fatores de crescimento.

8 REFERÊNCIAS

- 1- Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of Head and neck tumors. Lyon: IARC; 2005.
- 2- Shear M, Speight PM, editors. Cysts of the oral and maxillofacial regions. 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2007.
- 3- Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* 2008;49(3):203-6.
- 4- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996;316 (Pt 1):1-11.
- 5- Tanzer ML. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* 2006;11(3):326-31.
- 6- Zhang B, Huang HZ, Tao Q, et al. Establishment and biological behavior of human ameloblastoma xenograft in nude mice. *China J Oral Maxillofacial Surg* 2004;2:270–3.
- 7- Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(2):215-28.
- 8- Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 2006;11:479-91.
- 9- Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(6):593-600.

- 10- Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):52-60.
- 11- Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):2-13.
- 12- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141(1):52-67.
- 13- Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck* 2007;29(6):564-72.
- 14- Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJV. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology* 2010;57(1):128-37.
- 15- DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ: Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 2004;164(4):1131-39.
- 16- Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology* 2004;45(1):65-72.
- 17- Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 2006;33(4):369-85.

- 18- Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol* 2006;1:11.
- 19- Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319(1):1-11.
- 20- Wu W, O'Reilly MS, Langley RR, Tsan RZ, Baker CH, Bekele N, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor-alpha by human lung cancer cells determines their response to EGF receptor tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice. *Mol Cancer Ther* 2007;6(10):2652-63.
- 21- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
- 22- Mishima K, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002;38(5):468-74.
- 23- Bodart JF. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem* 2010;109(5):850-7.
- 24- Henriques AC, Vasconcelos MG, Galvão HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112(4):468-75.
- 25- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral & maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

- 26- Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:313–7.
- 27- Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdy´ P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006;35:75–80.
- 28- Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - an overview. *Oral Oncol* 2010;46(1):19-24.
- 29- Bornstein MM, Filippi A, Altermatt HJ, Lambrecht JT, Buser D. The odontogenic keratocyst-odontogenic cyst or benign tumor?. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2005;115(2):110-28.
- 30- Colić S, Jurisić M, Jurisić V. Pathophysiological mechanism of the developing radicular cyst of the jaw. *Acta Chir Iugosl* 2008;55(1):87-92.
- 31- Gomes CC, Gomez RS. Odontogenic keratocyst: A benign cystic neoplasm? *Oral Oncol* 2007;43(6):619-620.
- 32- Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. *Oral Oncol* 2002;38(3):219-26.
- 33- Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol* 2002;38(4):323-31.

- 34- Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. *Oral Oncol* 2002;38(5):407-15.
- 35- Manekar VS. Large odontogenic keratocyst: conservative verses aggressive management. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36(11):1036.
- 36- Pogrel MA, Jordan RC. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(6):651-5
- 37- Pogrel MA. Decompression and marsupialization as definitive treatment for keratocysts—a partial retraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(2):362-363.
- 38- Blanas N, Freund B, Schwartz M, Furst IM. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(5):553-558.
- 39- Oliver R, Sweet C, Sharif FNJ, Sharif MO. Interventions for the treatment of keratocystic odontogenic tumours (KCOT, odontogenic keratocysts (OKC)). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010;4. DOI: 10.1002/14651858.CD008464.
- 40- Okamoto E, Kikuchi K, Miyazaki Y, González-Alva P, Oku Y, Tanaka A, Yoshida N, Fujinami M, Ide F, Sakashita H, Kusama K. Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med* 2010;39(1):110-4.
- 41- Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34:280–6.

- 42- Meghji S, Henderson B, Bando Y, Harris M. Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts Arch Oral Biol 1992;37:935–43.
- 43-Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas RA. Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts. Pesq Odontol Bras 2002;16:157–62.
- 44- Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. J Dent Res 2002;81:23–7.
- 45- Siriwardena BS, Tennakoon TM, Tilakaratne WM. Relative frequency of odontogenic tumors in Sri Lanka: Analysis of 1677 cases. Pathol Res Pract 2012;208(4):225-30.
- 46- 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.
- 47- Ribeiro AL, Nobre RM, Rocha GC, de Souza Lobato IH, de Melo Alves Junior S, Jaeger RG, et al. Expression of metallothionein in ameloblastoma. A regulatory molecule? J Oral Pathol Med 2011;40(6):516-9.
- 48- Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. J Mol Med 1998;76(3-4):253-65.
- 49- Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol 2004;20:255-84.

- 50- Borg, TK. It's the matrix! ECM, proteases, and cancer. *Am. J. Pathol* 2004;164(4):1141-2.
- 51- Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(5):526-32.
- 52- Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* 2003;13(7):366-75.
- 53- Bosman FT, Havenith MG, Visser R, Cleutjens JP. Basement membranes in neoplasia. *Prog Histochem Cytochem* 1992;24(4):1-92.
- 54- Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 2004;22(7):521-38.
- 55- Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basement membrane assembly. *Methods Enzymol* 1994;245:489-518.
- 56- Timpl R, Aumailley M. Biochemistry of basement membranes. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1989;18:59-76.
- 57- Alberts B, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p.1463, 2004.
- 58- Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol* 2003;200(4):423-8.
- 59- Sasaki T, Fässler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 2004;164(7):959-63.

60- Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(17):2879-95.

61- Sado Y, Kagawa M, Naito I, Ueki Y, Seki T, Momota R, et al. Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders. *J Biochem* 1998;123(5):767-76.

62- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005;85:979-1000.

63- Kimura N, Toyoshima T, Kojima T, Shimane M. Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp Cell Res* 1998;241:36-45.

64- Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1291-1306.

65- Bose K, Nischt R, Page A, Bader BL, Paulsson M, Smyth N. Loss of nidogen-1 and 2 results in syndactyly and changes in limb development. *J Biol Chem* 2006;281:39620-39629.

66- French MM, Smith SE, Akanbi K, Sanford T, Hecht J, Farach-Carson MC, et al. Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J Cell Biol* 1999;145:1103-1115.

67- Naka T, Kuester D, Boltze C, Schulz TO, Samii A, Herold C, et al. Expression of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1

and -2; cathepsin B; urokinase plasminogen activator; and plasminogen activator inhibitor, type I in skull base chordoma. *Hum Pathol* 2008;39(2):217-223.

68- Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2003;32(2):114 - 120.

69- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(5):558-564.

70- Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H. Interleukin-1 β and transforming growth factor- α /epidermal growth factor induce expression of M 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 1993;268(25):1943-1951.

71- Nagase H, Woessner JR, JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-21494.

72- Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(9):1087-1097.

73- Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med* 1999;31(1): 34-45.

74- Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 15(8): 2145-2154.

- 75- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8): 827–839.
- 76- Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor-kappa B site. *Biochemical J* 2004;38:413-422.
- 77- Kim JH, Choi C, Benveniste EN, Kwon D. TRAIL induces MMP-9 expression via ERK activation in human astrocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(1):195-9.
- 78- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner Jr DE. Extracellular matrix: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7(15): 1434-1441.
- 79- Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases inhibitor. From de Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878(30): 388-403.
- 80- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803(1):55-71
- 81- Willenbrock F, Murphy G: Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;150:165–170.
- 82- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997;15(1):61-75.
- 83- Fingleton B. MMPs as therapeutic targets—Still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):61-68.

- 84- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010;20(3):161-8.
- 85- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 86- Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 1990; 265(14): 7709-7712.
- 87- Kumar V, Bustin SA, McKay IA. Transforming Growth Factor alpha. *Cell Biol Int* 1995;19(5):373-388.
- 88- Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(7): 314 - 317.
- 89- Stoscheck CM, King Jr LE. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res* 1986; 46(3): 1030-1037.
- 90- Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 2000; 19(8): 1085-1091.
- 91- Mulet A, Garrido G, Alvarez A, Menendez T, Bohmer FD, Perez R, et al. The enlargement of the hormone immune deprivation concept to the blocking of 108 TGFA-autocrine loop: EGFR signaling inhibition. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(6): 628-638.
- 92- Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(6):637-43.

- 93- Howe AK, Aplin AE, Juliano RL Anchorage-dependent ERK signaling-mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(1):30-5.
- 94- El-Rayes BF, Lorusso PM. Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 2004; 91(3): 418-424.
- 95- Boulougouris P, Elder J. Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signalling and effects of activation. *Anticancer Res* 2001; 21:2769-2776.
- 96- Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1299-310.
- 97- Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1213-26.
- 98- Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Role of matrix metalloproteinases in the etiopathogeny of odontogenic cysts. *J Bras Patol Med Lab* 2007;43:203-9.
- 99- de Andrade Santos PP, de Aquino AR, Oliveira Barreto A, de Almeida Freitas R, Galvão HC, de Souza LB. Immunohistochemical expression of nuclear factor κ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112(4):476-83.
- 100- Li T, Browne RM, Matthews JB. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. *Mol Pathol* 1997;50(1):21-7.

101- Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci* 2010;15;17:10.

102- Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, Galvão HC, Medeiros AM, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis* 2009;15(7):472-7.

103- Teronen O, Salo T, Kontinen YT, Rifkin B, Vernillo A, Ramamurthy NS, Kjeldsen L, Borregaard N, Hietanen J, Sorsa TJ. Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. *Oral Pathol Med* 1995;24(2):78-84.

104- Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. *J Dent Res* 2002;81(1):23-7.

105- Wang A, Zhang B, Huang H, Zhang L, Zeng D, Tao Q, Wang J, Pan C. Suppression of local invasion of ameloblastoma by inhibition of matrix metalloproteinase-2 in vitro. *BMC Cancer* 2008;30;8:182.

106- Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 2004;35(5):1107-19.

107- Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:333-9.

108- 41. Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg* 2012;28:49-55.

109- Sharifi-Sistani N, Zartab H, Babakoochi S, Saghravarian N, Jamshidi S, Esmaili H, et al. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Craniofac Surg* 2011;22:1652-6.

110- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncol* 1998;34:408-12.

111- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26(22):3279-90.

112- Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Han EH, Kim HG, Song GY, et al. Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(4):594-605.

113- Campbell L, Nuttall R, Griffiths D, Gumbleton M. Activated extracellular signal-regulated kinase is an independent prognostic factor in clinically confined renal cell carcinoma. *Cancer* 2009;115(15):3457-67.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa.



Universidade Federal do Pará

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



Carta Provisória: 163/10 CEP-ICS/UFPA

Belém, 19 de novembro de 2010.

Profº. André Luis Ribeiro Ribeiro

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa "AVALIAÇÃO DAS IMUNOEXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ, SEUS INIBIDORES, FATORES DE CRESCIMENTO, PROTEÍNAS DO INVADOPÓDIO, METALOTIONEINA E PROTÍNAS DE SUPRESSÃO TUMORAL NO TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCISTICO" de CAAE 0084.0.073.000-10 e parecer nº124/10 - CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 13 de Outubro de 2010.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 27 de agosto de 2011, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,

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