



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

Oswaldo Rodrigues de Souza Neto

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADAMTS-1 E
PROTEOGLICANOS NO AMELOBLASTOMA E NO TUMOR
ODONTOGÊNICO CÍSTICO CALCIFICANTE

Belém-PA
2014

Oswaldo Rodrigues de Souza Neto

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADAMTS-1 E
PROTEOGLICANOS NO AMELOBLASTOMA E NO TUMOR
ODONTOGÊNICO CÍSTICO CALCIFICANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia, Clínica e Terapia

Orientador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

**Belém-PA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Souza Neto, Osvaldo Rodrigues, 1988-
Análise imunohistoquímica da adamts-1 e
proteoglicanos no ameloblastoma e no tumor
odontogênico cístico calcificante / Osvaldo
Rodrigues Souza Neto. - 2014.

Orientador: João de Jesus Viana Pinheiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Núcleo de Oncologia, Programa de
Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas,
Belém, 2014.

1. Tumores Odontogênicos. 2. Ameloblastoma.
3. Carcinogênese. I. Título.

CDD 23. ed. 616.994

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho”

ABRAHAM LINCOLN

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado e iluminado nessa caminhada.

Aos meus pais, NAZARÉ e IVAN, por serem a minha fonte de “inspiração”, a minha “fortaleza” na vida. Por me apoiarem e incentivarem na busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO, pela compreensão, paciência, confiança e conhecimento a mim dedicado. “O meu muito obrigado de coração” por me orientar no caminho da pesquisa.

À Profa. Dra. MARIA SUELI DA SILVA KATAOKA, por me auxiliar na elaboração da dissertação. Meu muito obrigado!!!

Aos meus irmãos, GIZELLE E GABRIEL, por me apoiarem e torcerem por mim nessa caminhada.

À minha sobrinha/afilhada, SOPHIA, que chegou há pouco tempo neste mundo, mas é responsável por tanta alegria e amor na minha vida.

À minha namorada, RAFAELLY, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando.

Ao ITENIR, técnico de laboratório, que me auxiliou no preparo de peças e materiais de laboratório.

A todos os familiares e amigos, que se não agradeço nominalmente, levo-os em meu coração, que sempre confiaram em mim.

E a CAPES pelo apoio financeiro.

SOUZA NETO OR. **Análise Imunohistoquímica da ADAMTS-1 e proteoglicanos no ameloblastoma e Tumor odontogênico calcificante.** 2014. Dissertação (Mestrado em Oncologia e Ciências Médicas) – Instituto de Ciências da Saúde, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

RESUMO

O ameloblastoma e o tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) são tumores odontogênicos que tem origem do epitélio odontogênico, porém ainda não é conhecido o estímulo ou gatilho que leva à transformação neoplásica desses tumores. O comportamento biológico das lesões é distinto, pois o ameloblastoma é um tumor mais agressivo e com taxa de recorrência significativa. Já o TOCC é um tumor menos agressivo e raramente há recorrência e por esse motivo foi utilizado como controle no estudo. Portanto, a elucidação completa dos mecanismos pelos quais esses tumores odontogênicos apresentam tais comportamentos biológicos continua sendo um desafio para os pesquisadores. As ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin) são metaloendopeptidases que são dependentes de zinco em seu domínio catalítico. Essas enzimas possuem ampla atividade catalítica contra uma variedade de substratos como os proteoglicanos (agrecan, brevican e versican), que são proteínas presente na matriz extracelular (MEC). As ADAMTS exibem características estruturais que lhes conferem um grande potencial para exibir múltiplas funções. Exibem função crucial em vários processos como proliferação, adesão, invasão e sinalização celular. As alterações nessas enzimas estão presentes em diversos tumores, o que sugere que estas proteínas podem estar envolvidas no processo carcinogênico em diferentes caminhos. Especificamente a ADAMTS-1 tem sido correlacionada com a tumorigênese de algumas neoplasias como no câncer de mama, pulmão e pâncreas. Assim como a ADAMTS, agrecan, brevican e versican são expressos em vários tumores e a regulação alterada desses proteoglicanos pode contribuir para o desenvolvimento da carcinogênese. Neste trabalho foram estudadas ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican no ameloblastoma e TOCC. Foram incluídos 20 casos de ameloblastoma e 6 casos de TOCC, utilizados como controle. A expressão de ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican foi avaliada por imunohistoquímica e as áreas de marcação foram mensuradas e analisadas. Para análise de correlação entre as proteínas estudadas utilizou-se o teste de Spearman. Todas as amostras de ameloblastoma expressaram ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican. Todas as amostras de TOCC também expressaram as mesmas proteínas, porém numa quantidade significativamente menor que no ameloblastoma. A diferença de expressão de ADAMTS-1 e brevican no epitélio do ameloblastoma e do TOCC foi significativa estatisticamente ($p < 0,0105$). Assim como a expressão de agrecan e versican, no epitélio do ameloblastoma e do TOCC, também foi estatisticamente significativa ($p < 0,0067$) e ($p < 0,0148$), respectivamente. Não houve correlação entre as proteínas estudadas.

PALAVRAS CHAVE: Tumores odontogênicos, ameloblastoma, Tumor odontogênico cístico calcificante, ADAMTS-1, proteoglicanos, agrecan, brevican e versican.

SOUZA NETO OR. **Immunohistochemistry analysis of ADAMTS-1 and proteoglycans in ameloblastoma and calcifying odontogenic tumor.** 2014. Dissertation (Master in Oncology and Medical Science) – Institute of Health Sciences, Center for Research in Oncology, Federal University of Pará, Belém, 2014.

ABSTRACT

Ameloblastoma and calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) are odontogenic tumors with origin odontogenic epithelium, but it is not yet known stimulus or trigger that lead to neoplastic transformation of tumors. The biological behavior of the lesions is distinct because the ameloblastoma is more aggressive and significant rate of tumor recurrence. CCOT is a less aggressive tumor and recurrence rarely there and therefore was used as a control in the study. Therefore, the complete elucidation of the mechanisms by which these odontogenic tumors show such biological behavior remains a challenge for researchers. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin) are metalloendopeptidases who are dependent on zinc in its catalytic domain. These enzymes have catalytic activity against a broad range of substrates including proteoglycans (aggrecan, brevican and versican), which are proteins present in the extracellular matrix (ECM). The ADAMTS exhibit structural features that confer great potential to display multiple functions. Exhibit crucial role in various processes such as proliferation, adhesion, invasion and cell signaling. Changes to these enzymes are present in various tumors, suggesting that these proteins may be involved in the carcinogenic process in different ways. Specifically, ADAMTS-1 has been correlated with tumorigenesis of some cancers such as in breast, lung and pancreatic cancer. Like ADAMTS, aggrecan, versican and brevican are expressed in various tumors and altered regulation of proteoglycans may contribute to the development of carcinogenesis. In this work ADAMTS-1, aggrecan, brevican and versican in ameloblastoma and CCOT were studied, 20 cases of ameloblastoma and 6 cases of TOCC, used as controls were included. We evaluated the expression of ADAMTS-1, aggrecan, brevican and versican by immunohistochemical study and the marking areas were measured and analyzed. To correlation analysis between the studied proteins used the Spearman test. All samples of ameloblastoma expressed ADAMTS-1, aggrecan, brevican and versican. All samples TOCC also expressed the same proteins, but in significantly less than the amount ameloblastoma. The difference in expression of ADAMTS-1 and brevican in the epithelium of ameloblastoma and of TOCC was statistically significant ($p < 0.0105$). As the expression of aggrecan and versican, between ameloblastoma and TOCC, in the epithelium was also statistically significant ($p < 0.0067$) and ($p < 0.0148$), respectively. There was no correlation between the proteins studied.

KEYWORDS: Odontogenic tumors, ameloblastoma, calcifying odontogenic cystic tumor, ADAMTS-1, proteoglycans, aggrecan, brevican and versican.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura organizacional e classificação da família ADAMTS.....	18
Figura 2-	Estrutura molecular de agrecan.....	23
Figura 3-	Estrutura molecular de brevican.....	25
Figura 4-	ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican estão expressas no ameloblastoma.....	39
Figura 5 A-	Comparação das áreas de marcação (AM) do ameloblastoma e do TOCC.....	40
Figura 5B-	Comparação das áreas de marcação (AM) do ameloblastoma e do TOCC.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Anticorpos utilizados e condições de reação.....	35
Tabela 2-	Teste de correlação da expressão da ADAMTS-1 com os proteoglicanos no epitélio do ameloblastoma.....	42
Tabela 3-	Teste de correlação das proteínas estudadas no tecido conjuntivo do ameloblastoma.....	42

LISTA DE ABREVIações

ADAMTS	do inglês “a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin”, traduzido como desintegrina e metaloprotease com motivos trombospondina.
AH	ácido hialurônico.
AP	adenoma pleomórfico de glândula salivar.
AR	anfirregulina.
BSA	do inglês “bovin serum albumin”, traduzido como soro albumina bovina.
CS	do inglês “condroitin sulfate”, traduzido como sulfato de condroitina.
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético.
EGF	do inglês “epidermal growth factor”, traduzido como fator de crescimento epidérmico.
EGFR	do inglês “epidermal growth factor receptor”, traduzido como receptor para o fator de crescimento epidérmico.
FGF2	do inglês “fibroblast growth factor”, traduzido como fator de crescimento do fibroblasto 2.
GAG	glicosaminoglicano.
GPI	glicosilfosfatidilinositol.
HCC	do inglês “hepatocellular carcinoma”, traduzido como carcinoma hepatocelular.
IL	interleucina.
MEC	matriz extracelular.
OMS	organização mundial de saúde.
P.A.	pró-análise.
PBS	do inglês “phosphate-buffered saline”, traduzido como tampão fosfato-salino.
PDGF	do inglês “platelet-derived growth factor”, traduzido como fator de crescimento derivado de plaquetas.
PG	proteoglicanos
PH	cologaritmo da concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico).
RNA	do inglês “ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucleico.
TDCF	tumor dentinogênico de células fantasmas
TEM	transição epitélio-mesênquima.
TGFβ	do inglês “transforming growth factor”, traduzido como fator de transformação do crescimento beta.
TNFα	do inglês “tumor necrosis factor”, traduzido como fator de necrose tumoral alfa.
TOs	tumores odontogênicos
TOCC	tumor odontogênico cístico calcificante.
TRIS	tri-hidroximetil-aminometano.
TS	trombospondina.
VEGF	do inglês “vascular endothelial growth factor”, traduzido como fator de crescimento vascular endotelial.

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
$^{\circ}$	graus
%	por cento
μm	micrômetro
kDa	kilodalton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
	2.1. Ameloblastoma.....	11
	2.2. Tumor odontogênico cístico calcificante.....	13
	2.3. Família ADAMTS.....	15
	2.3.1. Organização estrutural.....	15
	2.3.2. Funções biológicas.....	17
	2.3.3. ADAMTS-1.....	18
	2.4. Proteoglicanos.....	20
	2.4.1. Agrecan.....	22
	2.4.2. Brevican.....	25
	2.4.3. Versican.....	27
3	APLICABILIDADE DO ESTUDO	31
4	OBJETIVO	32
	4.1. Objetivo geral.....	32
	4.2. Objetivo específico.....	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
	5.1. Amostras de tecido.....	33
	5.2. Material de laboratório.....	33
	5.3. Método.....	34
	5.3.1. Corte das peças.....	34
	5.3.2. Imunohistoquímica.....	35
	5.3.3. Análise dos resultados.....	36
	5.3.4. Análise estatística.....	37
6	RESULTADOS	38
	6.1. Imunohistoquímica da ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican no ameloblastoma.....	38
	6.2. Expressão da ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican no ameloblastoma e TOCC.....	40
	6.3. Correlação entre as áreas de marcação no ameloblastoma.....	41
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÃO	47
9	REFERÊNCIAS	48
10	ANEXOS	56
	ANEXO A Parecer.....	56
	ANEXO B Tabela da média de expressão imunohistoquímica de ADAMTS-1 em tumores odontogênicos.....	58
	ANEXO C Tabela da média de expressão imunohistoquímica de agrecan em tumores odontogênicos.....	59
	ANEXO D Tabela da média de expressão imunohistoquímica de brevican em tumores odontogênicos.....	60
	ANEXO E Tabela da média de expressão imunohistoquímica de versican em tumores odontogênicos.....	61

1 INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos (TOs) constituem um grupo de lesões neoplásicas que acomete a região maxilofacial, e que podem apresentar comportamento heterogêneo, com características histopatológicas e manifestações clínicas diversas (LUO *et al.*, 2008). Tais lesões podem ser originadas de tecidos epiteliais, ectomesenquimais ou mesenquimais, derivados de células potencialmente capazes de indução na formação do tecido dental e de seus anexos (OSTERNE *et al.*, 2011).

Em 1971, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a primeira classificação dos TOs a ser adotada mundialmente: “Tipos histológicos dos tumores odontogênicos, cistos dos maxilares e lesões afins”. A última classificação publicada pela OMS foi a de 2005, atualizada em função dos novos conhecimentos moleculares e genéticos sobre esses tumores (BARNES *et al.*, 2005).

No estudo de Osterne *et al.* (2011) analisaram a frequência dos tumores odontogênicos em Fortaleza. Num total de 6231 lesões analisadas, 185 casos foram diagnosticados como tumores odontogênicos, cerca de 2.97%. Sendo que os TOs mais frequentes foram o ameloblastoma (29.19%), seguido pelo Tumor odontogênico ceratinizante (28.11%) e o odontoma (19.46%).

A maioria dos TOs é composta por lesões benignas, sendo caracterizadas por um crescimento expansivo e lento. Radiograficamente apresentam limites nítidos e definidos, acometem com maior frequência a região posterior da mandíbula e geralmente são assintomáticas, porém em alguns casos pode haver dor. De ocorrência mais rara, os tumores malignos podem ser gerados a partir da transformação de tumores benignos, sendo caracterizados por possuírem crescimento rápido, invasivo e destrutivo (NEVILLE *et al.*, 2004; TAWFIK *et al.*, 2009).

Como ocorre nas neoplasias em outros locais do corpo, os TOs tendem a mimetizar microscopicamente as células ou o tecido de origem. Histologicamente, podem se assemelhar aos tecidos moles do órgão do

esmalte ou da polpa dentária ou podem conter elementos mineralizados do esmalte, da dentina e/ou do cimento, ou todos eles misturados. Esta diversidade histopatológica é devido à natureza pluripotente e indutiva dos tecidos dentais (REGEZI *et al.*, 2008).

Os tumores são circundados por tecido conjuntivo que forma o estroma, constituído por células, que incluem fibroblastos e miofibroblastos, dispostos numa rede complexa e organizada de macromoléculas de suporte, conhecida como matriz extracelular (MEC). Durante a carcinogênese, a MEC pode interagir com diversos fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação, migração, e a invasão tumoral (SOUZA *et al.*, 2011; THEOCHARIS *et al.*, 2010). As ADAMTS (A Desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) são grupos de endopeptidases largamente estudadas na literatura, por terem a capacidade de proteólise da MEC e sua ação tem sido relacionada com o crescimento invasivo de uma variedade de tumores (ROCKS *et al.*, 2007).

A família das ADAMTS apresenta 19 membros. A ADAMTS-1 faz parte da subfamília agrecanases, que desempenha um papel crítico na tumorigênese, devido sua capacidade em degradar agrecan, brevican e versican (FREITAS *et al.*, 2013). Estes proteoglicanos são componentes da MEC e os primeiros obstáculos para as células tumorais causarem invasão e metástase (SOUZA *et al.*, 2011).

Além disso, as ADAMTS são proteínas que exibem características estruturais que lhes conferem grande potencial para exercer múltiplas funções, como proliferação celular, adesão e invasão, e sinalização celular (ROCKS *et al.*, 2008).

O ameloblastoma e o TOCC são tumores odontogênicos com comportamento biológico distinto, pois o ameloblastoma é um tumor mais agressivo e com taxa de recorrência significativa. Já o TOCC é um tumor menos agressivo e raramente há recorrência, e por esse motivo foi utilizado como controle nesse estudo (NEVILLE *et al.*, 2004; REGEZI *et al.*, 2008).

O presente estudo avaliou a expressão da ADAMTS-1 e seus substratos, que são superexpressos em diversos tumores. Essas enzimas podem produzir subprodutos que sinalizam para o recrutamento de fatores de crescimento tumoral, propiciando um estroma favorável para interações com o parênquima tumoral, promovendo o crescimento e invasão dos mesmos (PORTER *et al.*, 2005).

Na literatura, não há um estudo caracterizando a expressão da ADAMTS-1 no ameloblastoma e TOCC. Portanto esse estudo foi importante e inédito na literatura na busca de novas concepções em relação ao comportamento biológico desses tumores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMELOBLASTOMA

Esta lesão é uma neoplasia benigna, localmente invasiva, originada do epitélio odontogênico, com aspecto clínico patológico variável, elevada recidiva e eventualmente, sofre transformações malignas (BARNES *et al.*, 2005; AMZERIN *et al.*, 2011).

O ameloblastoma é classificado em três tipos clínicos: sólido ou multicístico, unicístico e periférico. A forma multicística representa 85% dos casos, possui um comportamento localmente invasivo, e alto índice de recidiva, se não for tratado corretamente. O ameloblastoma unicístico corresponde a 14% das ocorrências, possui uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso e baixo índice de recidiva. O ameloblastoma periférico é raro e corresponde a 1% dos casos que circundam a região dentária (NEVILLE *et al.*, 2004).

Clinicamente, o ameloblastoma convencional acomete mais os homens (53%) do que as mulheres (47%), porém no estudo de Osterne *et al.* (2011) houve uma leve prevalência em mulheres (53,7%). Esta neoplasia pode acometer indivíduos num intervalo entre a segunda e a quarta década de vida. As características clínicas do ameloblastoma podem estar associadas ao edema, dor facial, ulceração e mobilidade dentária. Em relação à localização da lesão há uma maior predisposição pela região posterior da mandíbula (REICHART *et al.*, 2005).

Radiograficamente, essa neoplasia pode apresentar uma imagem radiolúcida uni ou multilocular, com limites bem definidos. Quando multiloculada, essa imagem pode assemelhar-se a “favos de mel” (pequenos lóculos) ou “bolhas de sabão” (grandes lóculos). Apesar de ser benigno e não metastático, o tipo sólido pode comportar-se como alguns tumores malignos de baixo grau. Outros achados radiográficos encontrados são: reabsorção radicular, extrusão dentária e deslocamento dental (NEVILLE *et al.*, 2004; REGEZI *et al.*, 2008).

Reichart *et al.* (1995) verificaram que cerca de 24% da forma multilocular do ameloblastoma, resultava em recorrência da lesão, enquanto que apenas cerca de 16% da forma unilocular, resultava em recorrência.

Os padrões histológicos mais comuns entre os ameloblastomas do tipo sólido são o padrão folicular, o padrão plexiforme e o padrão acantomatoso (DANDRIYAL *et al.*, 2011). Na variante folicular observam-se ilhotas epiteliais que se encontram dispersas no estroma conjuntivo de densidade variável, constituídas por células colunares dispostas em paliçada, que se assemelham com ameloblastos. Essas células delimitam uma área central e formam arranjos semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte (NEVILLE *et al.*, 2004). No estudo de Reichart *et al.* (1995) esse padrão folicular do ameloblastoma acometeu mais pacientes jovens e com maior frequência a região posterior de mandíbula.

A variante plexiforme consiste de longos cordões ou placas de epitélio odontogênico anastomosados. Esses cordões ou placas são circundados por células colunares ou cúbicas que envolvem células epiteliais arranjadas frouxamente. O estroma de sustentação tende a ser vascularizado e arranjado frouxamente. A formação cística é rara nessa variedade (NEVILLE *et al.*, 2004). No estudo de Reichart *et al.* (1995) essa variante apresentou maior recorrência, também foi prevalente em pacientes jovens, e na região posterior da mandíbula.

O padrão acantomatoso ocorre quando há áreas de metaplasia escamosa, muitas vezes associadas com a formação de queratina, nas porções centrais das ilhas epiteliais de um ameloblastoma folicular (NEVILLE *et al.*, 2004). No estudo de Reichart *et al.* (1995) esse padrão de ameloblastoma foi mais frequente em pacientes idosos e no segmento anterior da mandíbula.

Ao planejar o tratamento do ameloblastoma é importante compreender as características do crescimento e a remoção de toda extensão do tumor, incluindo os tecidos circundantes. Caso contrário, as células tumorais remanescentes podem levar a morbidades múltiplas de recorrência. Os avanços recentes na compreensão do comportamento biológico do ameloblastoma revelaram que as lesões unicísticas são bem delimitadas pela

cápsula fibrosa do cisto, enquanto que as lesões multicísticas são caracterizadas por uma infiltração agressiva no tecido adjacente (DANDRIYAL *et al.*, 2011). Torres-Lagares *et al.* (2005) preconizam a ressecção da lesão com margem de segurança de 1 a 2 cm e nos casos em que os dentes estão próximos ou adjacentes à lesão, é indicada a extração dos mesmos por se encontrarem dentro das margens de segurança de ressecção da lesão.

Porém, existem controvérsias no que diz respeito à extensão da margem cirúrgica da lesão. Outros autores adotam margem de segurança de 1-1,5 cm. No entanto, em pacientes cuja lesão não pode ser removida por intervenção cirúrgica, ou que não é possível adotar a margem de segurança, podem ser tratados com radiação e/ou quimioterapia para o controle da lesão (AMZERIN *et al.*, 2011; KOUKOURAKIS *et al.*, 2011).

2.2. TUMOR ODONTOGÊNICO CÍSTICO CALCIFICANTE (TOCC)

O Cisto de Gorlim ou Cisto Odontogênico Calcificante foi descrito como uma entidade com duas características básicas: tumor cístico e neoplasia sólida. Em todos estes anos, várias classificações foram propostas com o objetivo de esclarecer a natureza dessa lesão, considerando as características clínicas e histopatológicas. Assim, este tumor odontogênico foi distinguido do ameloblastoma com base nas características histopatológicas e por ter, geralmente, natureza menos agressiva (BARNES *et al.*, 2005).

Em 2005, este grupo foi reclassificado como duas variantes benignas distintas: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC) e Tumor Dentinogênico de Células Fantasmas (TDCF). O TOCC foi definido como uma neoplasia cística benigna de origem odontogênica, caracterizada por um epitélio semelhante ao ameloblastoma com células fantasmas calcificadas e o TDCF foi definido como uma neoplasia sólida, localmente invasiva, caracterizada por ilhas epiteliais semelhantes ao ameloblastoma no tecido conjuntivo. Aberrante queratinização pode ser achada na forma de células fantasmas associadas com diferentes quantidades de dentina displásica. A

forma maligna destas variantes foi descrita como carcinoma odontogênico de células-fantasma (BARNES *et al.*, 2005; THINAKARAN *et al.*, 2012).

Clinicamente, o TOCC corresponde a 2% dos tumores odontogênicos. Acomete paciente com idades entre 5 a 92 anos, com um pico de incidência na sexta e sétima década de vida, tendo uma maior prevalência em homens. Em relação à localização do TOCC, pode ser intra ou extraósseo, sendo que nos estudos de Jing *et al.* (2007) houve maior frequência na maxila, particularmente na região de pré-molares e região anterior, enquanto que nos estudos de Tawfik *et al.* (2010) houve maior predileção pela mandíbula. As lesões extraósseas são bem definidas, a mucosa apresenta coloração rosa lisa, e o tamanho da lesão é de 4 centímetros de diâmetro em média. Por outro lado, as lesões intraósseas produzem expansão da cortical, cujo sinal mais frequente é uma tumefação de consistência variável, indolor à palpação (KLER *et al.*, 2009).

Radiograficamente, o TOCC não tem aspectos característicos. O cisto intraósseo é uma lesão essencialmente destrutiva, produzindo uma imagem radiolúcida unilocular ou multilocular que pode conter áreas radiopacas irregulares. Em pacientes mais jovens as lesões podem ser confundidas com um odontoma em desenvolvimento ou um fibro-odontoma ameloblástico. As placas corticais de osso são frequentemente finas e expandidas, podendo se tornar perfuradas pela lesão, que usualmente causa deslocamento e reabsorção do dente adjacente (REYES *et al.*, 2007).

Microscopicamente, o TOCC é na maioria dos casos (86 a 98%) uma lesão cística bem definida com uma cápsula fibrosa e um limitante epitelial de 4 a 10 células. As células basais do revestimento epitelial podem ser colunares ou cuboidais, lembrando ameloblastos e as camadas do epitélio arranjadas frouxamente, que lembram o retículo estrelado do órgão do esmalte (NEVILLE *et al.*, 2004). A presença das chamadas células fantasmas, que provavelmente representam a forma anormal de queratinização, é uma das características dessa lesão. Entretanto, sua mera presença não justifica um diagnóstico de TOCC, pois outras lesões também mostram a sua formação. Outras características observadas incluem a presença de dentina displásica, que pode

estar localizada perto da camada basal do epitélio, estando em conexão com as massas de células fantasmas (KLER *et al.*, 2009).

Em relação ao tratamento, pode ser realizado de maneira conservadora por meio de enucleação ou ressecção local. A recorrência do TOCC é rara, somente oito casos de recidiva foram relatados na literatura, a falta de recorrência depende da excisão completa da lesão (KLER *et al.*, 2009).

2.3. FAMÍLIA DAS ADAMTS

As ADAMTS (A Desintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs) são um grupo de proteases identificadas em mamíferos e invertebrados. Após a publicação do primeiro membro da família, ADAMTS-1, em 1997, a sequenciação completa do genoma humano apresentou 19 membros desta família de proteases. Estas enzimas são metaloendopeptidases, pois em seu domínio catalítico são dependentes de zinco para efetuar sua atividade proteolítica (PORTER *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2011).

As ADAMTS agrupam-se em pequenas classes e estas são organizadas de acordo com a sua estrutura molecular, sequência proteica, estrutura do gene e preferência por determinados substratos (PAULISSEN *et al.*, 2008).

2.3.1. Organização estrutural

No que diz respeito à sua organização estrutural, as ADAMTS apresentam uma organização comum, a qual compreende um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio semelhante à disintegrina, uma repetição central de trombospondina, uma região rica em cisteína e um domínio separador. Com exceção da ADAMTS-4, todas as outras enzimas ADAMTS tem uma adicional trombospondina repetida (TS) e mais um domínio auxiliar C-terminal. Então, a estrutura molecular dessas enzimas de N-terminal para o C-terminal dos domínios e motifs das ADAMTS é:

- (I) Pró-domínio: varia geralmente de 220-300 aminoácidos, exceto no caso de ADAMTS-13, que é pequeno (74 aminoácidos). Contém 1-3 resíduos de cisteína e pelo menos um motif de

consenso de clivagem da furina. Esse domínio mantém as ADAMTS em latência, ou seja, essas proteínas necessitam de enzimas para torná-las ativas. As pró-proteínas convertases, irão ativá-las clivando-as em sítios específicos para efetuar sua atividade catalítica, como por exemplo, a furina. Além disso, o pró-domínio possui outra função que é a correta conformação das ADAMTS para a sua secreção;

- (II) Domínio catalítico: possui um elevado grau de homologia entre as diferentes ADAMTS e contém a sequência de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH, onde o zinco desse domínio é coordenado por três resíduos de histidina;
- (III) Domínio semelhante à desintegrina: é constituído por 60-90 aminoácidos com 25-45% de similaridade com as desintegrinas do veneno de cobra, no entanto, sem seu arranjo de cisteína canônico;
- (IV) Trombospondina repetida (TSR): O TSR central é muito semelhante em todas as ADAMTS e compreende 48-54 aminoácidos;
- (V) Domínio rico em cisteína (DRC): constitui uma sequência bem conservada entre as ADAMTS, contendo 10 resíduos de cisteína. Este domínio pode estar associado à adesão e migração das células.
- (VI) Domínio Espaçador: um domínio de tamanho variável que pode ser dividido em uma metade N-terminal em que vários aminoácidos hidrofóbicos são conservados e em uma metade C-terminal extremamente variável. Este é o domínio das ADAMTS que apresenta menor homologia;
- (VII) Um ou mais TSRs C-terminal: possuem uma sequência muito mais variável que o TSR central. Alguns TSR em determinadas ADAMTS podem ainda conter um motif BBXB que liga a heparina ou um motif CVSTCG que liga o receptor de superfície celular CD36.
- (VIII) Domínios C-terminal: existem quatro tipos de domínios C-terminal nas ADAMTS. Um domínio semelhante à mucina presente nas

ADAMTS-12 e 7, este domínio está associado ao evento de clivagem da ADAMTS-12. O domínio GON-1 está presente nas ADAMTS-9 e 20, este domínio contém 10 cisteínas conservadas e vários outros aminoácidos conservados. Já o domínio PLAC é encontrado nas ADAMTS 2, 3, 6, 10, 14, 16, 17, 18 e 19, e também é encontrado em algumas convertases pró-proteínas. Finalmente a ADAMTS-13 é o único membro desta família que contém domínios CUB, existindo dois localizados no seu C-terminal (NAGASE *et al.*, 2008; PORTER *et al.*, 2005; PAULISSEN *et al.*, 2008; ROCKS *et al.*, 2008).

2.3.2. Funções biológicas

Com base nas suas funções biológicas, as ADAMTS podem ser classificadas nos seguintes grupos: (I) Aminopeptidases pró-colágenos, que estão envolvidas no processamento dos pró-colágenos a colágenos; (II) Agrecanases, clivam o agrecan em ligações específicas; (III) Antiangiogênicas, possuem a capacidade de inibir a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) e suprimir a vascularização induzida pelo FGF-2; (IV) Gon-ADAMTS, relacionadas com o gene GON-1, que tem um papel essencial no desenvolvimento gonodal em *C. elegans*, e por fim; (V) ADAMTS-13, o membro isolado desta família que cliva o fator de Von Willebrand, este por sua vez irá interagir com fragmentos de células das plaquetas, que circulam na corrente sanguínea e são essenciais para a coagulação sanguínea (APTE, 2009; PORTER *et al.*, 2005; ROCKS *et al.*, 2008).

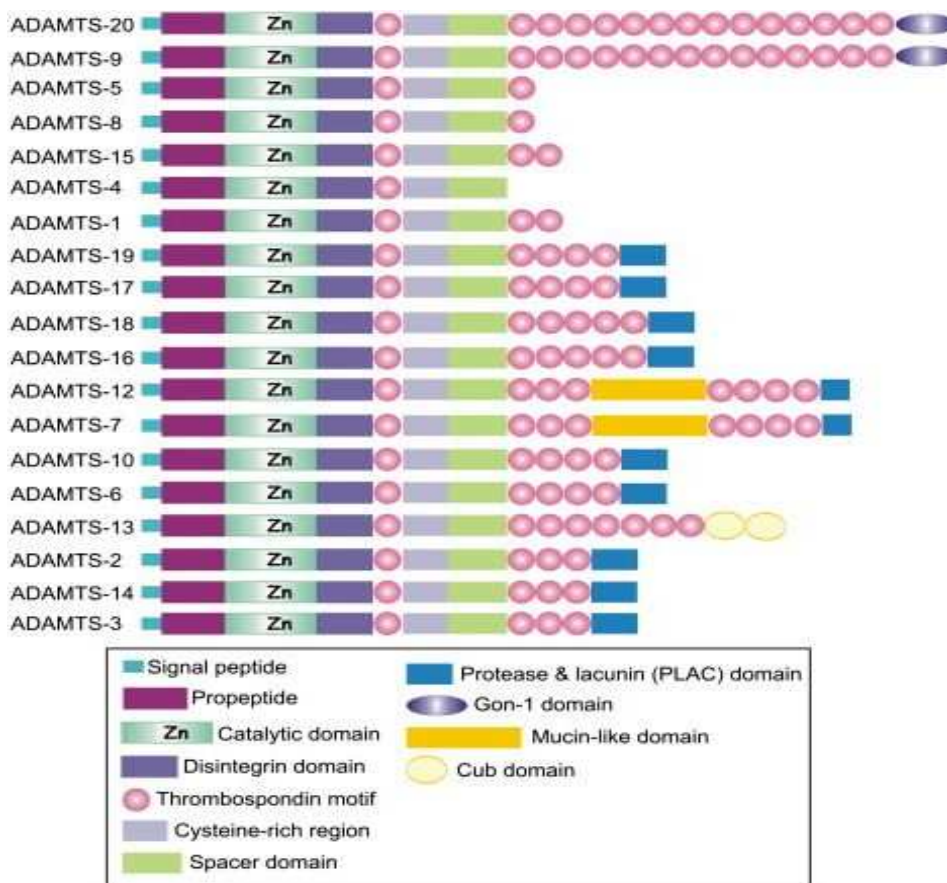


Figura 1. Estrutura organizacional e classificação da família ADAMTS.

Tradução: ■ peptídeo sinal; ■ pró-domínio; ■ Zn domínio catalítico; ■ domínio semelhante à desintegrina; ● motivo trombospodina; ■ região rica em cisteína; ■ domínio espaçador; ■ domínio protease & lacunina; ● domínio Gon-1; ■ domínio semelhante à mucina e ● domínio cub.

Fonte: STANTON *et al.*, 2011.

2.3.3. ADAMTS-1

A ADAMTS-1 é expressa fisiologicamente em cada organismo, participando de vários processos biológicos, como por exemplo, na ovulação. Essa proteína é bastante importante na ruptura do folículo ovariano e na liberação do ovócito maduro. Além disso, essa enzima é essencial para morfologia de órgãos, como no sistema urogenital (SHINDO *et al.*, 2000).

A ADAMTS-1 tem ampla atividade catalítica contra uma variedade de substratos, podendo fazer a degradação de proteoglicanos, como agregan, brevican e versican. Estes estão presentes na MEC de quase todos os

eucariotos e têm uma ampla função podendo interagir com diversas moléculas (FREITAS *et al.*, 2013; ROCKS *et al.*, 2008).

Dentre as atividades catalíticas das ADAMTS está a degradação de componentes da MEC como, por exemplo, proteoglicanos, os quais podem lançar fatores de crescimento e citocinas, contribuindo no caminho da proliferação celular, migração e angiogênese. Tem sido mostrado em alguns estudos que a adesão e migração das células podem ser reguladas pela desintegrina ou pelo domínio rico em cisteína. Então essa enzima é uma proteína multifuncional e sugere-se que ela sirva como reguladora de eventos proteolítico e não-proteolítico durante a progressão tumoral (ROCKS *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2006) demonstraram que a ADAMTS-1 pode sofrer clivagem auto-proteolítica, gerando a ADAMTS-1_{NTF} (término-NH₂ de ADAMTS-1 fragmentada) e a ADAMTS-1_{CTF} (término-COOH de ADAMTS-1 fragmentada). Foi mostrado que existem dois tipos de ADAMTS-1 uma com comprimento total e outra que é fragmentada, que irão exibir atividade pró e anti-tumoral, respectivamente. Foi demonstrado que o domínio catalítico de ADAMTS-1 é necessário para a atividade pró-tumoral e que ADAMTS-1 fragmentada requer a trombospondina-1 (TSP-1) para atividade anti-tumoral. Além disso, a clivagem auto-proteolítica de ADAMTS-1 ocorre na região rica em cisteína/domínio espaçador por metaloproteinases (MMP- 2 / 8 / 15) e essa clivagem pode ser inibida pelo sulfato de heparina (HS), sugerindo que o nível de proteoglicano sulfato de heparina (HSPGs) no microambiente regula a forma de ADAMTS (comprimento total ou fragmentada), a qual irão exercer sua atividade pró ou anti-tumoral, respectivamente.

ADAMTS-1 pode clivar precursores da família transmembrana de EGF que se liga à heparina, que são anfirregulina (AR) e ao fator de crescimento tipo epidérmico para ligação à heparina (HB-EGF). Estes irão ativar o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), o qual promove a proliferação e invasão tumoral no processo de carcinogênese (LIU *et al.*, 2006).

No estudo de Rocks *et al.* (2008) foi feita uma transfecção de ADAMTS-1 em uma linhagem de células tumoral epitelial brônquica (BZR) em ratos imunodeficientes e foi realizada uma investigação para verificar o potencial de ADAMTS-1 na modulação do desenvolvimento tumoral. Os autores verificaram que a superexpressão de ADAMTS-1, acelerou o desenvolvimento de células tumorais após injeção subcutânea em ratos imunodeficientes. Este efeito de ADAMTS-1 na promoção tumoral está associado com uma reação do estroma evidenciado pela infiltração de miofibroblastos, por um aumento na deposição de fibroblastos e pela presença de um domínio catalítico ativo. Além disso, foi verificado que a alta expressão de ADAMTS-1 ocasionou um aumento da secreção de TGF- β e IL-1 β , e em seguida induziu o recrutamento de fibroblastos e/ou a sua diferenciação em miofibroblastos. A fibronectina secretada exageradamente por ADAMTS-1 expressa sobre o tumor, pode contribuir para a diferenciação de miofibroblastos.

As ADAMTS são proteínas que exibem características estruturais que lhes conferem um grande potencial para exibir múltiplas funções. Estas enzimas exibem função crucial em vários processos como proliferação celular, adesão, invasão e sinalização celular, entre outras. As alterações das ADAMTS estão presentes em diversos tumores de diferentes tipos o que sugere que estas proteínas estão envolvidas no processo carcinogênico em diferentes caminhos (ROCKS *et al.*, 2007). Especificamente a ADAMTS-1 tem sido correlacionada com a tumorigênese de algumas neoplasias como no câncer de mama, pulmão e pâncreas e tem como principais substratos os proteoglicanos: agrecan, brevican, neurocan e versican (FREITAS *et al.*, 2013; ROCKS *et al.*, 2008).

2.4 PROTEOGLICANOS

A matriz extracelular (MEC) não é apenas uma estrutura passiva. Nos últimos anos, verificou-se que a MEC é uma zona de ação dinâmica que funciona para instruir o fenótipo celular. Proteínas da MEC interagem diretamente com os receptores de superfície celular para iniciar vias de transdução de sinal e modular diferentes processos. Nessa interação molecular

teremos os proteoglicanos (PGs) apresentando papel fundamental nos mais variados processos, por apresentarem grande afinidade com uma variedade de ligantes, incluindo fatores de crescimento, moléculas de adesão, componentes da matriz, enzimas e inibidores de enzimas (SOUZA *et al.*, 2011).

Proteoglicanos são estruturas formadas por uma proteína principal (*core protein*) a qual está ligada covalentemente a diversas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) na MEC. Os GAGs são cadeias de carbonos lineares carregados negativamente, que compreendem unidades de repetição de dissacarídeo que são classificados de acordo com a presença ou ausência de sulfato e grupos carboxilato. As cadeias sulfatadas podem ser sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatano (DS), sulfato de queratano (KS), sulfato de heparano (HS) ou heparina, com as combinações múltiplas possíveis para cada tipo de cadeia. Praticamente todas as células dos mamíferos produzem proteoglicanos, estando localizados principalmente na MEC, na membrana plasmática, ou em grânulos secretores (GUPTA *et al.*, 2012).

Por serem carregadas negativamente, as cadeias de GAGs atraem moléculas de água e com isso podem regular o equilíbrio osmótico da MEC, mantendo-a hidratada. Isto aumenta a concentração de macromoléculas na matriz e pode influenciar as reações e interações moleculares que são dependentes da concentração do meio em que ocorrem (GUPTA *et al.*, 2012).

Os proteoglicanos podem se ligar a várias moléculas e controlar a atividade de proteínas secretadas. A atividade de enzimas proteolíticas (ADAMTS) ou catepsinas pode ser regulada pela interação com proteoglicanos. A regulação de mecanismos de transdução de sinal também pode ser mediada por proteoglicanos quando tais compostos interagem com fatores de crescimento, como TGF- β (Fator de crescimento transformante β), sinalizando para a proliferação celular. Nem todos os PGs são sintetizados e liberados para o meio extracelular, alguns são componentes da membrana plasmática como a família dos sindecans e glicans. Nas superfícies celulares, os sindecans podem servir como receptores propriamente ditos ou como correceptores, ligando-se a moléculas. A apresentação do fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF-2), ao seu respectivo receptor, pela interação com cadeias

específicas do proteoglicano sulfato de heparina, é o exemplo mais característico de correceptor. A ligação dos fatores de crescimento às cadeias de GAGs dos proteoglicanos pode servir para a apresentação de tais fatores ou como forma de proteção contra a degradação destes pela ação de proteases da MEC, tornando tais compostos mais concentrados, aumentando assim a atividade desencadeada pela ligação de tais fatores aos seus respectivos receptores (SOUZA *et al.*, 2011).

Durante a carcinogênese, as células malignas secretam fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e ativam células do estroma, que por sua vez estimulam os fatores de crescimento tumorais, facilitando assim a migração celular, o crescimento e a invasão tumoral. Portanto, a alteração da expressão de proteoglicanos modifica a estrutura da MEC, e com isso pode haver a facilitação do desenvolvimento de tumores benignos ou malignos (THEOCHARIS *et al.*, 2010).

Agrecan, brevican e versican são proteoglicanos do grupo de sulfato de condroitina, e estão envolvidos tanto no crescimento celular normal quanto no neoplásico e serão abordados em seguida (THEOCHARIS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2013).

2.4.1 Agrecan

O agrecan é o principal proteoglicano (PG) que compõe a cartilagem. Apresenta uma estrutura multimolecular que consiste de um eixo proteico de 210 kDa ligado aproximadamente a 130 cadeias de GAGs (sulfato de condroitina e sulfato de queratano). Esse PG possui três domínios (G1, G2 e G3). O domínio G1 da região N-terminal forma uma região globular de 60 a 70 kDa que se liga não covalentemente ao ácido hialurônico (AH). Essa ligação é estabilizada por uma proteína de ligação, de 40 a 60 kDa, cuja sequência é semelhante ao domínio N-terminal de agrecan. Além disso, o domínio G1 possui módulo imunoglobulina e dois módulos repetições em “tandem”, onde se encontram sítios específicos para AH. O domínio inter-globular (IGD) conecta os domínios G1 e G2. Já o domínio G2 possui dois módulos de repetições em

“tandem” que são homólogos ao do G1. Fazendo a ligação entre G2 e G3, há um domínio central de GAG que é ligado covalentemente a uma série de polissacarídeos que compreendem quase 90% da massa de agregan. E no domínio G3, há quatro domínios: dois domínios semelhantes ao EGF, um domínio semelhante à lectina e um módulo de proteínas reguladoras de complemento (KIANI *et al.*, 2002).

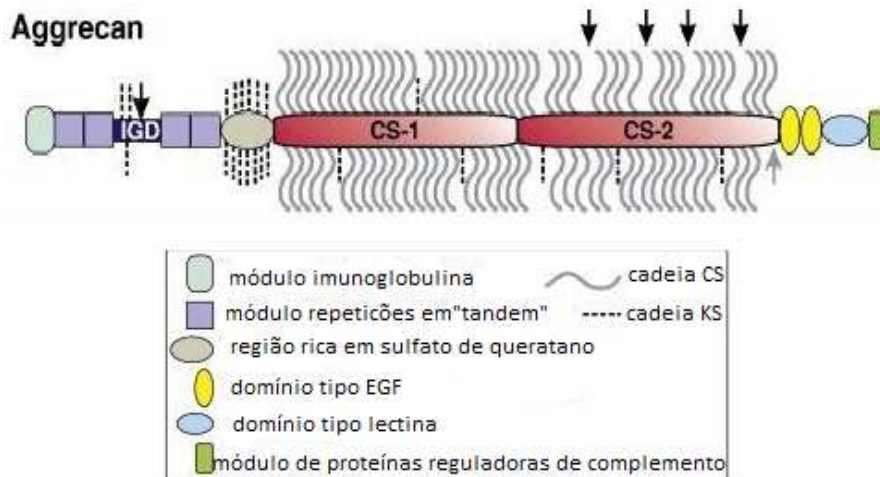


FIGURA 2. Estrutura molecular de agregan. As setas indicam o local onde o proteoglicano pode ser clivado. Abreviações: Sulfato de condroitina (CS), sulfato de queratano (KS), domínio interglobular (IGD) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Adaptado: de Stanton *et al.*, 2011.

Agrecan desempenha um papel importante na mediação de condrócitos-condrócitos e condrócitos-matriz por meio da sua capacidade de se ligar ao ácido hialurônico. Além disso, este proteoglicano fornece às cartilagens capacidade para resistir às cargas de compressão, pois possui propriedades osmóticas necessárias para a função normal do tecido (KIANI *et al.*, 2002).

Além disso, Zhao *et al.* (1999) verificaram a expressão imunohistoquímica de agregan, em tecidos mesenquimais, na papila dental de germes dentários.

Durante a carcinogênese, a expressão de agregan é aumentada em diferentes tumores da cartilagem incluindo: condroblastoma, condroma e condrosarcoma. Além disso, esse proteoglicano está expresso no

osteosarcoma, no adenoma pleomórfico de glândula salivar, câncer de fígado e de mama entre outros (WEGROWSKI et al., 2004; JIA et al., 2012).

Muratsu *et al.* (2009) analisaram a ultraestrutura das áreas do estroma em 10 espécies de Adenoma pleomórfico de glândula salivar (AP). O AP é o tumor epitelial mais comum nas glândulas salivares, mas frequentemente mostra um tipo histológico semelhante ao mesênquima, incluindo a presença de áreas mixoides e condroides. O agrecan estava presente no estroma mixoide e condroides do AP. Observações ultraestruturais revelaram a presença de núcleos de proteoglicanos e fibrilas no estroma mixoide e algumas células mioepiteliais neoplásicas fusiformes com vacúolos e filamentos de actina nas áreas mixoide. Por microscopia imunoeletrônica e imunohistoquímica, houve uma positividade para agrecan nos vacúolos das células mioepiteliais neoplásicas e no estroma mixoide. Estes resultados sugerem que as células mioepiteliais neoplásicas produzem agrecan e o liberam em vacúolos e o agrecan fica depositado no estroma mixoide. Portanto, a sua deposição é considerada bastante importante na formação do mesênquima tumoral.

Já Kusafuka *et al.* (2008) verificaram a presença de agrecan na matriz do carcinoma de produção da matriz da mama, que é um subtipo de carcinoma metaplásico definido como um carcinoma de mama invasivo. Foram encontrados no estroma mixocondroide a presença de agrecan, que estava difusamente nessa matriz, além de colágeno e numerosas fibras de proteoglicanos. Já no estudo de Suhovskih *et al.* (2013) o agrecan não foi expresso no tecido da próstata normal, porém esse proteoglicano foi expresso em alguns tumores de próstata.

Jia et al. (2012) verificaram a imunoexpressão para agrecan em modelo de ratos que tinham carcinoma hepatocelular (HCC) e um grupo controle. No grupo controle, agrecan foi expresso principalmente na membrana celular e/ou na matriz pericelular. Já nos modelos de ratos com HCC, o agrecan marcou intensamente no citoplasma, na membrana celular e/ou matriz pericelular. Nesse estudo foi realizada uma análise semi-quantitativa, que indicou maior expressão de agrecan no grupo de ratos com HCC do que no grupo controle.

2.4.2. Brevican

Este proteoglicano pertencente à família dos proteoglicanos ligantes ao ácido hialurônico (AH), como o agrecan e versican. O brevican é expresso no sistema nervoso central. Apresentando em sua estrutura uma parte N-terminal, com domínio globular G1, que se liga ao AH. Este por sua vez está anexado no centro a uma região de sulfato condroitina (CS) e uma parte C-terminal de domínio globular G3. O domínio G1 consiste num módulo semelhante a imunoglobulina seguido por duas proteínas de ligação. Já o domínio G3 é constituído por um domínio semelhante EGF, um domínio semelhante à lectina tipo C e um domínio de proteínas reguladoras de complemento (FRISCHKNECHT *et al.*, 2012).

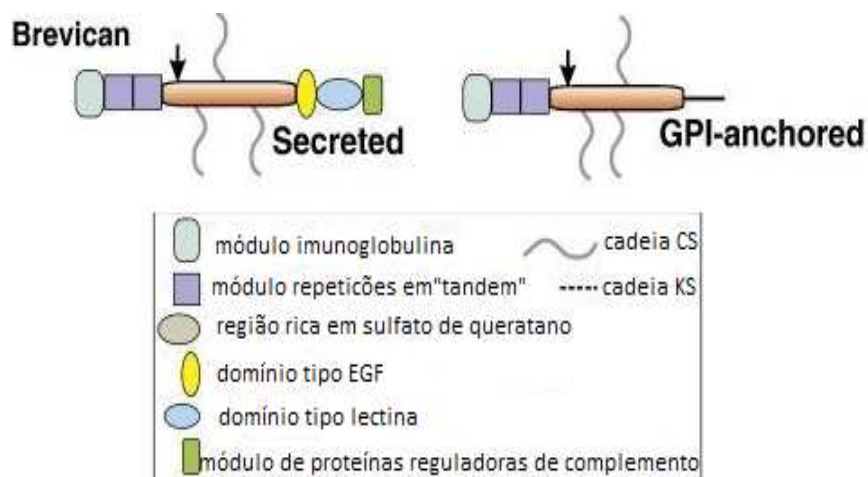


FIGURA 3. Estrutura molecular de brevican. As setas mostram os locais onde esse proteoglicano pode ser clivado. Abreviações: Sulfato de condroitina (CS), sulfato de queratano (KS), glicosilfosfatidilinositol (GPI) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Adaptado: de Stanton *et al.*, 2011.

O brevican apresenta duas isoformas, uma secretada e a outra ancorada à membrana plasmática, via um glicosilfosfatidilinositol (GPI). As isoformas de brevican são decorrentes do "splicing" alternativo de seu RNAm. A forma secretada parece ter uma origem neuronal, e faz parte da MEC do sistema nervoso. Enquanto a isoforma ancorada é sintetizada por células gliais e age como um receptor celular para a MEC (HU *et al.*, 2008).

A expressão de brevican em gliomas altamente invasivos é alta e na clivagem proteolítica de brevican por ADAMTS-4 foi mostrado que há um aumento da agressividade e invasão de linhagens de células de glioma. Estes estudos sugerem que tanto o aumento da regulação quanto a clivagem proteolítica de brevican são elementos críticos para a invasão do glioma. Estudos mais recentes têm mostrado que o brevican secretado por células de glioma são capazes de melhorar a adesão celular e a motilidade, apenas após a clivagem proteolítica. Estes resultados resultam em implicações funcionais importantes do processamento de brevican na progressão tumoral (RICCIARDELLI *et al.*, 2009).

Além disso, o brevican promove a ativação do EGFR, aumentando a expressão de moléculas de adesão celular e promove a secreção de fibronectina e o acúmulo de microfibrilas de fibronectina na superfície celular. A expressão da isoforma específica de brevican no tumor, ancorada na membrana celular, tem sido encontrada em todos os gliomas de alto grau e é sugerido que desempenhe um papel importante na progressão do glioma. Além disso, foi observado que em gliomas benignos há ausência de brevican. Portanto, a utilização de marcadores de diagnóstico para brevican é muito importante para distinguir os tumores cerebrais primários, de histologia semelhante, mas com curso patológico diferente. A inibição da expressão e da clivagem de brevican pode ser alvo potencial farmacológico para o tratamento de tumores cerebrais (THEOCHARIS *et al.*, 2010).

Outros estudos já verificaram a presença desse proteoglicano em outros tecidos. Yamada *et al.* (1997) verificaram a expressão imunohistoquímica desse proteoglicano em germes dentários em humano. Foi utilizado um anticorpo monoclonal, 5D5, que é derivado de esclera bovina e reconhece especificamente os proteoglicanos como brevican, versican e neurocan. E nesse estudo houve uma forte marcação do anticorpo no folículo dental e na papila dental. Além dessa região foi expresso na lâmina basal, em grânulos de secreção de ameloblastos e na matriz do esmalte formado. Estes resultados indicam que um aumento acentuado na expressão dos proteoglicanos foi associado com ameloblastos secretores e que podem estar associados com a diferenciação celular e a biossíntese da matriz do esmalte.

2.4.3 Versican

O versican possui 4 isoformas: V0, V1, V2, e V3. A isoforma V0 é particularmente prevalente no início desenvolvimento embrionário, e bem menos presente em tecidos adultos. Já a isoforma V1 aumenta a proliferação celular e protege os fibroblastos NIH-3T3 de apoptose. Porém, a expressão da isoforma V2 exibe uma atividade biológica de oposição, por inibir a proliferação celular e sem qualquer associação com a resistência à apoptose. As isoformas V1 e V2 também podem ter funções distintas no cérebro. Yang *et al.* (2013) observaram em linhagem celular de glioblastoma (U87), que a isoforma V2 desempenha um papel muito importante no desenvolvimento da angiogênese tumoral, estimulando a interação entre as células endoteliais, e verificaram que a fibronectina liga-se à isoforma V2 pelo domínio G3, aumentando a interação das células tumorais com as células endoteliais, aumentando assim a angiogênese. V0 e V1 são as isoformas de versican mais predominantes em câncer. Quanto à isoforma V3, foi observado que ela é superexpressa em células de melanoma, porém reduz o crescimento celular *in vitro* e *in vivo*, já no pulmão essa isoforma promove metástase. Portanto, estes resultados sugerem que a isoforma V3 pode ter dupla função, como um inibidor do crescimento do tumor e um estimulador de metástases (RICCIARDELLI *et al.*, 2009).

Um grande número de estudos têm-se centrado nos domínios globulares de versican. Os domínios G1 e G3 promovem a proliferação de fibroblastos NIH-3T3 de células tumorais. Estudos em linhagem celular de astrocitoma demonstraram que o domínio G1 aumenta a migração celular. Já a superexpressão de G3 em astrocitoma aumenta o crescimento de tumores e a formação de vasos sanguíneos em ratos. No osteossarcoma os domínios G1 e G3 exibiram um aumento de células tumorais *in vitro*, resistentes à apoptose (RICCIARDELLI *et al.*, 2009).

As funções biológicas de versican na progressão do câncer dependem da interação entre as células tumorais e as células do estroma tumoral, onde promoverão uma alta regulação da expressão de um número de citocinas, incluindo PDGF, TGF- β , IL-1 β e TNF- α , hormônios esteroides e gonadotrofinas. A baixa regulação de microRNAs, que podem regular negativamente a

transcrição gênica de versican, e a expressão ectópica de um RNA endógeno concorrente, versican 3'UTR, irão promover a alta expressão de versican no tumor e no estroma, já que a regulação de microRNAs é baixa e ainda haverá a competição entre o microRNA e o versican 3'UTR. A expressão de versican reprime a adesão e a apoptose de células tumorais, enquanto que aumenta a sobrevivência, o crescimento, migração, invasão, angiogênese, resistência à droga e metástase de células tumorais. A alta regulação da expressão do fragmento G3 de versican tem propriedade pró-angiogênica, pois o fragmento G3 estimula a proliferação e migração de células do músculo liso arterial e estas células contribuem para a angiogênese. O fragmento G3 pode também se ligar diretamente à fibronectina e formar um complexo em conjunto com o fator de crescimento vascular (VEGF) aumentando a angiogênese. Versican parece regular a transformação do fenótipo da transição epitélio-mesênquima (TEM) em vários estágios do desenvolvimento, o que pode favorecer o crescimento, migração, invasão, angiogênese e metástase das células tumorais. Além disso, o versican pode aumentar o crescimento do câncer metastático por ativar receptores do tipo toll (TLR2/TLR), ocasionando a ativação de diversos fatores de crescimento, podendo desencadear a secreção de citocinas inflamatórias, proporcionando uma ligação entre a inflamação e a metástase do câncer. O aumento da atividade de MMPs e ADAMTS é capaz de gerar os fragmentos proteolíticos de versican que desempenham um papel importante na progressão tumoral. O fragmento G1 é conhecido por melhorar a motilidade das células cancerígenas e reduzir a adesão celular, enquanto o fragmento G3 aumenta a proliferação, migração e a invasão tumoral pela regulação da sinalização EGFR/ERK, aumentando a sobrevivência e resistência às drogas, através da via EGFR/AKT. A expressão do fragmento G3 também intensifica a apoptose de osteoblastos, quando cultivados em meio contendo TGF- β ou TNF- α , contribuindo para metástase em tecido ósseo (DU *et al.*, 2013).

O versican tem sido associado ao TGF- β 2 (Fator transformador de crescimento beta 2). Em gliomas, por exemplo, a expressão de versican foi regulada por TGF- β 2. Este fator sinaliza para inúmeras vias e moléculas que influenciam a expressão de RNAm de versican, dentre essas moléculas estão o

p53, PDGF, IL-1 β e β -catenina. A interação de todos esses fatores resulta na regulação da expressão de versican e instabilidade tumoral (WIT *et al.*, 2012).

Zhang *et al.* (2012) verificaram uma elevada expressão de versican em carcinomas gástricos em humanos em relação à mucosa gástrica normal. Versican medeia a interação célula-MEC e a interação com integrina β 1 e a fibronectina, ocasionando a proliferação, diferenciação, adesão e metástase no carcinoma gástrico.

O conjunto de matriz pericelular rico em hialurano (AH) e versican é um pré-requisito para a proliferação e migração de células mesenquimais e foi recentemente mostrado que promovem motilidade no câncer de próstata. Ween *et al.* (2011) sugeriram que a formação do complexo macromolecular CD44/AH/versican promove a motilidade e invasão de células do câncer de ovário. A dependência de CD44 para os efeitos de versican e AH foi confirmada pela inibição da formação da matriz pericelular, bem como a motilidade mediada por versican e a invasão das células do câncer de ovário com o tratamento com anticorpos neutralizantes de CD44.

Versican apresenta um local de ligação para p53, no primeiro íntron, e é um alvo reconhecido por p53. Uma análise de sequência de oligonucleotídeos revelou que a expressão de versican correlaciona-se com a dosagem de p53. Além disso, o uso de vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, demonstrou que versican pode ser ativado diretamente pelo supressor tumoral, p53. (RICCIARDELLI *et al.*, 2009).

Curiosamente, a síntese de versican é regulada por microRNAs (miRNA), miR-199a, funcionando como uma molécula guia no silenciamento pós-transcricional do gene e pela ligação com a região 3'UTR de versican (RNAm), levando a uma repressão translacional. miR-199a é considerado como sendo um oncosupressor direcionando moléculas criticamente envolvidas na promoção de tumores e muitas vezes reprimidos em malignidades (THEOCHRIS *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2013) observaram que no tumor de ovário as células tumorais produzem versican V1, este ativa macrófagos no microambiente, o que leva a

ativação de TLR2/6 (receptores do tipo toll). Estes receptores por sua vez induzem o CYP27B1, que é um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. Esta enzima irá converter hidroxila 25-hidroxitamina D3 na posição 1alfa em 1alfa, 25-hidroxitamina D3, que é a forma ativa da vitamina D3. Após a conversão a forma ativa da vitamina irá se ligar ao receptor VDR, resultando no aumento de macrófagos e na expressão de HCAP18/LL37, que é uma proteína antimicrobiana catiônica humana, produzida por diversas células como macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. O HCAP18/LL37 possui uma região do peptídeo de sinal N-terminal com o domínio altamente conservado, cathelin-like e a região C-terminal denominada peptídeo LL-37. Esse peptídeo LL-37 quando clivado exerce várias funções diferentes como reações imunes incluindo a modulação imune, reação inflamatória, proliferação celular, angiogênese e a atividade anti-apoptótica. Portanto no câncer de ovário, o LL-37, contribui efetivamente para a proliferação, invasão e progressão tumoral.

Estudos mostraram que versican pode impedir a adesão celular e esta atividade parece residir no domínio G1 de versican. No entanto, o domínio carboxi-terminal de versican interage com a integrina β -1 de células de glioma, ativando a quinase de adesão focal (FAK), promovendo a adesão celular e prevenindo a apoptose neste tipo de células (WIGHT, 2002).

A expressão de versican está associada com um fenótipo de célula proliferativa e é frequentemente encontrada em tecidos que apresentam proliferação elevada, tais como em tecidos embrionários, e em uma variedade de tumores, incluindo da mama, cérebro, próstata e melanoma (WIGHT, 2002).

Portanto, os proteoglicanos como agrecan, brevican e versican são macromoléculas que exibem características estruturais que lhes conferem um grande potencial para exibir múltiplas funções e que participam no processo fisiológico e na homeostasia do organismo. Porém, a expressão dessas macromoléculas é essencial para o microambiente tumoral, e a sua regulação alterada no mesênquima tumoral, pode afetar o desenvolvimento da carcinogênese em diversos tumores, de diferentes tipos. Então é necessária a melhor compreensão da regulação do metabolismo e do envolvimento desses proteoglicanos na progressão tumoral (THEOCHARIS *et al.*, 2010).

3 APLICABILIDADE DO ESTUDO

Vários estudos foram realizados na tentativa de compreender melhor os mecanismos pelos quais o ameloblastoma e o TOCC apresentam comportamentos biológicos tão distintos. O ameloblastoma é mais agressivo e com taxa de recorrência significativa. Já o TOCC é menos agressivo e raramente há recorrência. Assim, torna-se essencial a elucidação dos mecanismos pelos quais os tumores apresentam tais comportamentos.

Este estudo avaliou a expressão da ADAMTS-1 em tumores odontogênicos. Esta é uma proteína que é superexpressa em diversos tumores. Essa enzima pode degradar componentes da MEC como, por exemplo, os proteoglicanos (agrecan, brevican e versican). Pode interagir com fatores de crescimento e citocinas, contribuindo para a proliferação, migração celular e angiogênese. Além disso, as ADAMTS exibem características estruturais que lhes conferem um grande potencial para exibir múltiplas funções. Sugere-se que ela atue como reguladora de evento proteolítico e não-proteolítico durante a progressão tumoral.

Assim como a ADAMTS-1, os proteoglicanos (agrecan, brevican e versican) são macromoléculas que podem interagir diretamente com receptores de superfície celular para iniciar vias de transdução de sinal e modular diferentes processos. Durante a carcinogênese, a expressão dessas macromoléculas é essencial para o microambiente tumoral e a sua regulação alterada pode afetar o desenvolvimento da tumorigênese.

Na literatura, não há um estudo caracterizando a expressão da ADAMTS-1 no ameloblastoma ou no TOCC. Portanto, faz-se necessária a investigação da expressão dessa enzima nos tumores odontogênicos, podendo proporcionar novas perspectivas sobre o comportamento biológico desses tumores.

4 OBJETIVO

4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de ADAMTS-1 e seus substratos na matriz extracelular de tumores odontogênicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão da ADAMTS-1 no ameloblastoma e no TOCC.
- Analisar a expressão dos substratos da ADAMTS-1 no ameloblastoma e no TOCC.
- Verificar a diferença na expressão das proteínas estudadas entre ameloblastoma e TOCC.
- Verificar se existe correlação entre a expressão da ADAMTS-1 e seus substratos.

5 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 20815813.0. 0000.0018 e parecer nº 409.790–CEP-ICS/UFPA.

5.1. AMOSTRAS DE TECIDO

As amostras de tecido foram coletadas nos arquivos do Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará – UFPA (Belém, PA, Brasil). Foi composta por vinte blocos de parafina (correspondentes às amostras de 20 indivíduos) contendo fragmentos de tecido obtido de biópsia, diagnosticados microscopicamente como ameloblastoma. Como critério de inclusão, foram selecionados todos os casos diagnosticados e confirmados histologicamente como ameloblastoma. 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. Seis casos de TOCC foram estudados como controle.

5.2. MATERIAL DE LABORATÓRIO

- Ácido Cítrico (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Álcool metílico PA (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Anticorpos para imunohistoquímica: anti-ADAMTS-1, anti-agrecan, anti-brevican (Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA) e versican (Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA)
- Anticorpos secundário e terciário – (REVEAL, Spring, Pleasanton, CA, USA)
- Câmara pascal (DAKO Corporation, Carpinteria CA, EUA)
- Computador para trabalhar imagens e dados estatísticos
- Diaminobenzidina (DAKO Corporation, Carpinteria CA, EUA)
- Diluente de anticorpo (DAKO Corporation, Carpinteria CA, EUA)
- Etanol (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- EDTA – sal dissódico (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

- Hidróxido de amônia a 10% (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Hematoxilina de Mayer (Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA)
- Lâminas imersas em poly-D-lysin (Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA)
- Microscópio de luz com câmera Axioskop 40 (Carl Zeiss, Germany)
- Micrótomo de parafina (LUPETEC LTDA, São Paulo, Brasil)
- Permunt (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, EUA)
- Peróxido de hidrogênio a 3% (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, EUA)
- Programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad software, Inc., San Diego, CA, USA)
- Programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)
- Solução de BSA (tampão bloqueador) (REVEAL, Spring, Pleasanton, CA, USA)
- Solução de recuperação antigênica tampão citrato (DAKO, Carpinteria, CA, USA)
- Tampão PBS (tampão fosfato-salino) (REVEAL, Spring, Pleasanton, CA, USA)
- Tris 99% (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany)
- Tween 20 (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany)
- Vidrarias de Laboratório (lamínulas, tubos de ensaio, entre outros)
- Xilol (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

5.3. MÉTODO

5.3.1. Cortes das peças

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

5.3.2. Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram colhidos em lâminas tratadas com poly-D-lysine. 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-ADAMTS-1, anti-agrecan, anti-brevican e anti-versican. Esses anticorpos primários foram diluídos em diluente de anticorpo e incubados por uma hora em temperatura ambiente em câmara escura e úmida.

Após lavagem em 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.

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

TABELA 1. Anticorpos utilizados e condições de reação

Anticorpo	Fabricante	Diluição
Anti-ADAMTS-1*	Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA	1:600
Anti-agrecan**	Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA	1:200
Anti-brevican***	Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA	1:50
Anti-versivan****	Sigma Chemical Corp, St Louis MO, USA	1:50

Abreviação:

ADAMTS (A Desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs)

*Código do produto: ab28284

** Código do produto: ab3778

*** Código do produto: ab111719

**** Código do produto: 4pa004726

A técnica de imunohistoquímica realizada foi a da imunoperoxidase consistindo de:

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

- b) Remoção de pigmento formólico (Hidróxido de amônio a 10% em etanol, 10 minutos).
- c) Recuperação antigênica feita com tampão citrato (pH 6,0) em câmara pascal em solução específica para cada anticorpo (Tabela 1) por 30 segundos a 125 °C.
- d) Bloqueio da peroxidase endógena (álcool metílico PA, peróxido de hidrogênio por 30 minutos realizando-se duas trocas. Proporção de 1:1).
- e) Bloqueio de anticorpos inespecíficos (incubação com BSA e soro fetal bovino por 1 hora).
- f) Incubação do anticorpo primário durante 1 hora.
- g) Incubação dos anticorpos secundário e terciário para o método estreptoavidina por 30 minutos.
- h) Lavagem em água destilada para remoção do excesso dos anticorpos secundário e terciário.
- i) Revelação com diaminobenzidina por 2 minutos.
- 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.

5.3.3. Análise dos Resultados

A avaliação imunohistoquímica foi realizada pela medida da área (μm) e da fração (%) de marcação das proteínas ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican, no ameloblastoma e no TOCC. Imagens de campo claro de pelo menos 6 áreas selecionadas aleatoriamente a partir de cada amostra, foram adquiridas em microscópio Axio Scope (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma câmera CCD a cores AxioCam HRC (Carl Zeiss). As imagens foram

adquiridas com a mesma objetiva (40x). Áreas coradas pela diaminobenzidina foram separadas e segmentadas usando o “deconvolution color plug-in” (<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) do programa Image J (software de domínio público, desenvolvido por Wayne Rasband (NIMH, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsweb.nih.gov/ij/>).

Depois da segmentação da imagem, a área e a fração de coloração total foram medidas. As diferenças de imunexpressão encontradas no ameloblastoma e no TOCC foram analisadas.

5.3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O teste t de Student foi utilizado para avaliar diferenças entre dois grupos. Diferenças entre três ou mais grupos foram estimados por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para verificar se havia correlação entre a expressão das proteínas estudadas utilizou-se o teste de Pearson para amostras que apresentaram distribuição normal e teste de Spearman para amostras com distribuição anormal. Na análise estatística realizada no estudo o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1. IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADAMTS-1, AGRECAN, BREVICAN E VERSICAN NO AMELOBLASTOMA.

Todas as amostras de ameloblastoma mostraram marcação para ADAMTS-1. Nas células neoplásicas do ameloblastoma, ADAMTS-1 foi expressa na área central e periférica, tanto no núcleo quanto no citoplasma. A imunoexpressão foi mais proeminente nas ilhas epiteliais do que no tecido conjuntivo (Figura 4A). Já o TOCC, também expressou ADAMTS-1, porém obteve fraca marcação, apenas na camada basal do tumor (Figura 4E).

Agrecan também foi expressa no ameloblastoma, principalmente nas células colunares do epitélio dispostas em paliçada (Figura 4B). A marcação para agrecan foi mais intensa nas células do epitélio do que no tecido conjuntivo. Já no TOCC houve uma marcação em apenas algumas células das camadas mais altas do tumor (Figura 4F).

Brevican estava presente em todas as amostras de ameloblastoma. Nesse tumor, a imunoexpressão foi observada nas células epiteliais, principalmente nas células periféricas das ilhas epiteliais que estavam dispersas no estroma tumoral e no próprio estroma (Figura 4C). O TOCC também expressou brevican nas células da camada basal e em células das camadas mais altas, porém obteve fraca marcação.

Versican também estava presente em todas as amostras de ameloblastoma. Houve marcação nas células neoplásicas no epitélio e no estroma. Porém a expressão foi mais proeminente nas células do epitélio tumoral, com marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 4D). Enquanto no TOCC houve baixa expressão desse proteoglicano nas células neoplásicas.

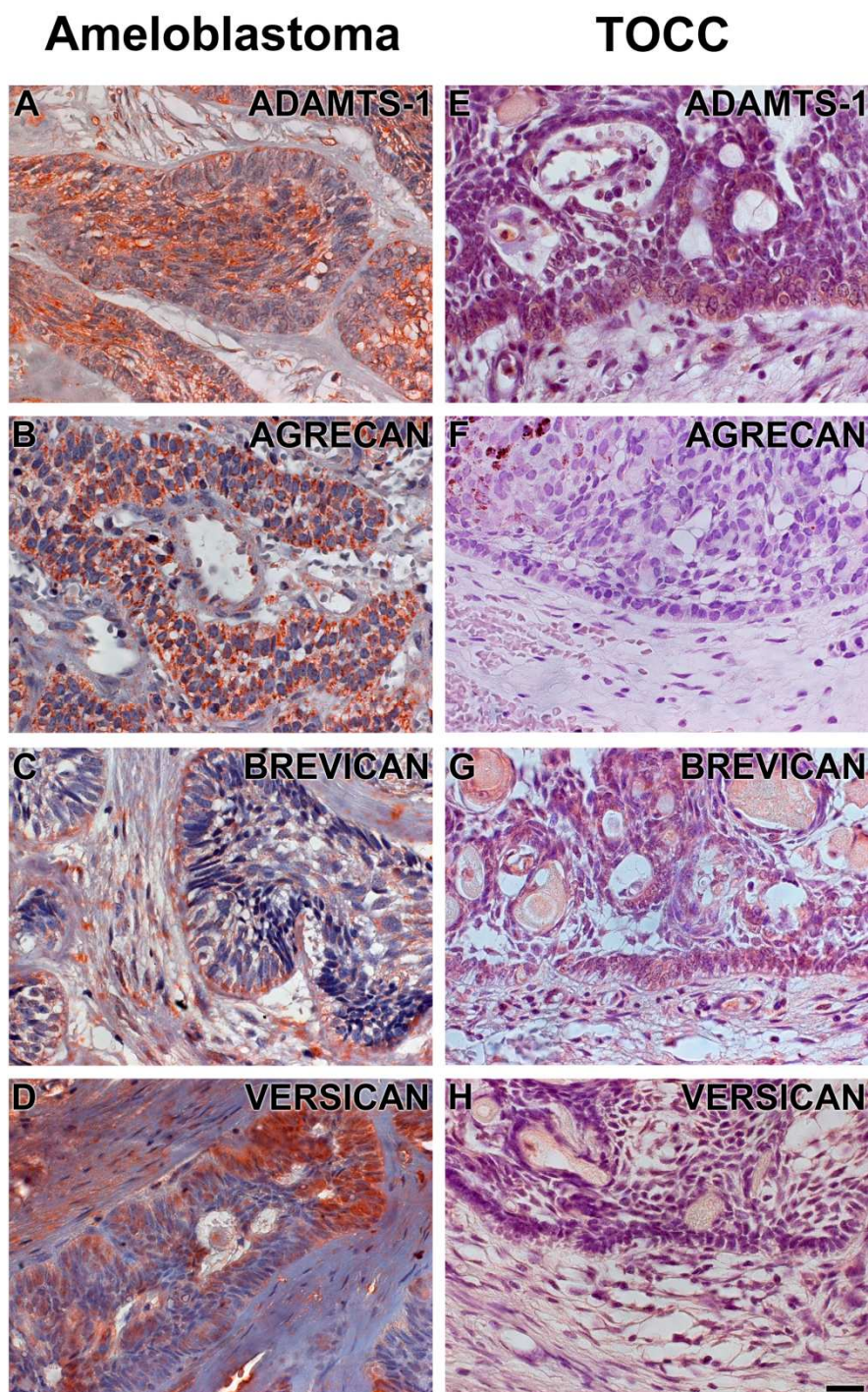


FIGURA 4. Expressão de ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican no ameloblastoma e no TOCC. No ameloblastoma a expressão de ADAMTS-1 foi mais proeminentemente nas ilhas epiteliais (A). Agrecan foi expressa, nas células colunares do epitélio (B). Brevican estava presente nas células periféricas do epitélio e no estroma (C). Versican estava presente nas células neoplásicas do epitélio (D). O TOCC expressou ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican, entretanto a marcação foi mais fraca (E-H).

6.2. EXPRESSÃO DE ADAMTS-1, AGRECAN, BREVICAN E VERSICAN NO AMELOBLASTOMA QUANDO COMPARADA COM O TOCC.

As áreas de marcação da ADAMTS-1 e seus substratos no ameloblastoma e no TOCC são mostrados na figura 5 A-B. A área de marcação da ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican foi estatisticamente significativa no ameloblastoma comparada com o TOCC. Sendo que o valor de p para expressão da ADAMTS-1 e brevican no epitélio do ameloblastoma foi ($p < 0,0105$) e para agrecan e versican foi ($p < 0,0067$) e ($p < 0,0148$), respectivamente. Estes resultados sugerem que nossos achados no ameloblastoma estejam relacionados ao crescimento invasivo do tumor.

A Ameloblastoma e TOCC: ADAMTS-1 e agrecan.

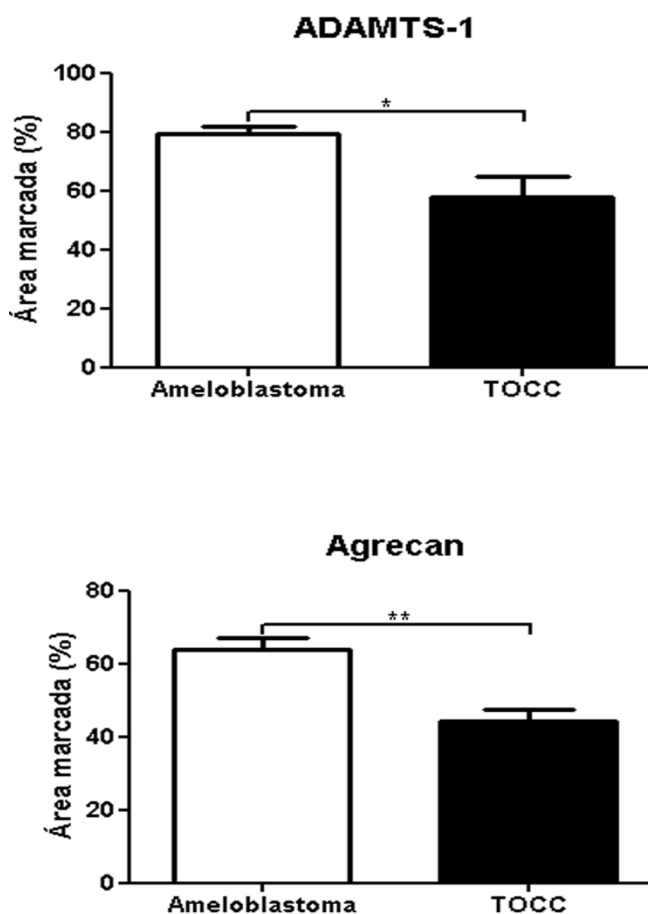


Figura 5A. Comparação da área de marcação no ameloblastoma e no TOCC.

A área de marcação de ADAMTS-1 e de agrecan é maior no ameloblastoma comparada com a do TOCC. Este aumento é observado nas células neoplásicas. * $p < 0,05$.

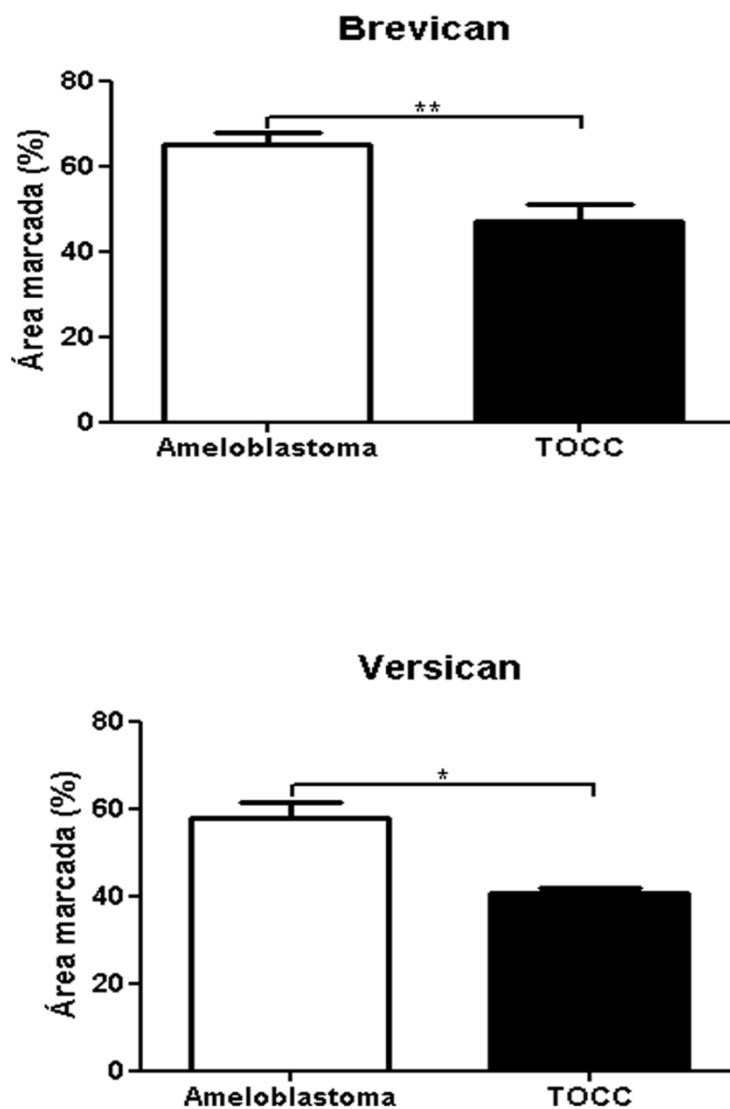
B Ameloblastoma e TOCC: brevican e versican

Figura 5B. Comparação da área de marcação no ameloblastoma e no TOCC. A área de marcação de brevican e de versican é maior no ameloblastoma comparada com a do TOCC. Este aumento é observado nas células neoplásicas. * $p < 0,05$.

6.3. Correlação entre as áreas de marcação no ameloblastoma

O teste de Spearman demonstrou que não houve correlação entre as proteínas expressas no ameloblastoma no presente estudo (Tabela 2).

TABELA 2. Teste de correlação da expressão da ADAMTS-1 com os proteoglicanos no epitélio do ameloblastoma.

Proteína 1	Proteína 2	Teste de Spearman r	Valor de p
ADAMTS-1	Agrecan	0,18199549	0,4426211
	Brevican	-0,2140451	0,3557364
	Versican	-0,2451128	0,2976005

Abreviação: ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thromboSpondin).

TABELA 3. Teste de correlação das proteínas estudadas no tecido conjuntivo do ameloblastoma.

Proteína 1	Proteína 2	Teste de Spearman r	Valor de p
ADAMTS-1	Agrecan	0,3428572	0,13891000
	Brevican	0,350376	0,12989410
	Versican	0,206015	0,38353260
Agrecan	Brevican	0,3789474	0,09941288
	Versican	0,4030075	0,07809346
Brevican	Versican	0,1984962	0,40150360

Abreviação: ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thromboSpondin).

7 DISCUSSÃO

Os resultados de nosso estudo mostram que o ameloblastoma expressa ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican. A expressão dessas proteínas foi significativamente maior no ameloblastoma comparada com o TOCC.

ADAMTS-1 é uma proteína cada vez mais estudada em diversos tipos de tumores e vem ganhando um importante status de marcador prognóstico (PORTER *et al.*, 2005). Porém não há estudo na literatura sobre a expressão desta proteína nos tumores de origem odontogênica. O presente estudo mostrou a expressão da ADAMTS-1 maior no epitélio do ameloblastoma em relação ao TOCC. Houve forte marcação dessa proteína nas ilhas epiteliais dispersa no tecido conjuntivo. Sone *et al.* (2005) verificaram forte imunoexpressão de ADAMTS-1, 4 e 5 durante a erupção de dentes em ratos durante a 3ª e 4ª semana da erupção. A expressão das ADAMTS localizou-se na região de formação do osso alveolar e do ligamento periodontal, onde essas enzimas fazem a remodelação da MEC.

Lu *et al.* (2009) verificaram que ADAMTS-1 foi expressa em 39,7% dos tumores de mama e demonstraram que a superexpressão dessa enzima estava associada com o aumento do risco de metástase óssea.

Além disso, ADAMTS-1 foi associada com expressão significativa em pacientes com câncer de pâncreas metastático e estes apresentaram pior prognóstico após a cirurgia curativa, o que sugere que ADAMTS-1 tenha um papel fundamental na progressão do câncer de pâncreas (PORTER *et al.*, 2005).

A alta expressão de ADAMTS-1 no ameloblastoma pode sugerir que esta enzima pode participar do mecanismo de invasão tumoral desta neoplasia, principalmente pela degradação de seus substratos presentes na MEC.

Nossos resultados mostram que o ameloblastoma apresentou expressão para agrecan. Embora o agrecan seja um proteoglicano (PG) específico de cartilagem, esse PG tem sido relatado em outros tecidos como o cérebro, o

fígado (JIA *et al.*, 2012, THEOCHARIS *et al.*, 2010) e em diversos tumores como no adenoma pleomórfico de glândula salivar, câncer de mama, de fígado e de próstata (KUSAFUKA *et al.*, 2008; SUHOVSKIH *et al.*, 2013). No presente estudo a expressão de agrecan foi mais intensa no epitélio do ameloblastoma quando comparado com o TOCC. A expressão de agrecan também foi observada no estroma do ameloblastoma. Resultados semelhantes foram relatados por Zhao *et al.* (1999) que analisaram por imunohistoquímica a alta expressão de agrecan e glicosaminoglicanos em células do adenoma pleomórfico de glândula salivar (AP). Maratsu *et al.* (2009) sugeriram que as células mioepiteliais neoplásicas produzem agrecan e o liberem em vacúolos sendo depositado no estroma mixóide.

Meng *et al.* (2001) analisaram a expressão gênica em 30 pacientes com câncer de endométrio por microarray. Foram encontrados 588 genes expressos nesse tipo de câncer. Posteriormente foram selecionados os genes que obtiveram alta expressão e dentre esses genes, agrecan estava superexpresso. Agrecan pode estar associado com a progressão desta neoplasia.

Alguns estudos mostraram que a expressão de brevican é restrita ao sistema nervoso central, e está ausente em órgãos extracraniais tais como o coração, músculo, fígado, rim e pulmão, entre outros (LU *et al.*, 2012). Porém, neste estudo observou-se expressão para brevican tanto no epitélio quanto no estroma tumoral, sendo que tal expressão foi maior no epitélio do ameloblastoma quando comparado ao TOCC. Houve marcação nas células neoplásicas do epitélio do tumor, principalmente nas células periféricas. Kuribayashi *et al.* (2009) analisaram a expressão gênica em leucoplasias orais, que são tipos de lesões pré-cancerosas. Foi feita uma análise gênica em 10 pacientes que apresentavam essas lesões, sendo que os casos classificavam-se de displasia leve à displasia severa. Foram comparadas as diferentes expressões gênicas entre os casos de displasia, onde 96 genes foram expressos. Posteriormente, foram selecionados os genes que obtiveram uma alta expressão para displasia severa e cerca de 16 genes foram encontrados nesses tipos de leucoplasias. Dentre os genes, brevican estava superexpresso

na displasia severa, porém, ainda é desconhecida qual a participação desse gene nas leucoplasias.

Além disso, no estudo de Ribeiro et al. (2012) observaram a expressão de metaloproteinases em células do tumor odontogênico ceratinizante, na qual estas enzimas irão promover a reabsorção e a solubilização óssea. A matriz óssea é rica em citocinas e fatores de crescimento como EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF- α (fator de crescimento transformante alfa). Estes mitógenos irão ser lançados da matriz óssea e poderão ligar-se ao EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico). Assim como esses mitógenos, o brevican pode se ligar ao EGFR, promovendo a fosforilação na porção intracelular do receptor, o que leva à ativação e fosforilação de ERK (cinases reguladas por sinais extracelulares), onde pERK é translocado para o núcleo onde ativa fatores de transcrição relacionados com o crescimento e migração de células (TEHEOCHARIS et al., 2010).

Provavelmente a expressão de brevican no ameloblastoma possa estar relacionada ao comportamento biológico desta neoplasia, no entanto faltam estudos na literatura que apontem de forma mais clara a participação desta proteína em neoplasias.

No presente estudo, o ameloblastoma apresentou expressão para versican no epitélio e no estroma tumoral, sendo que esta expressão foi mais intensa no epitélio do ameloblastoma em comparação ao TOCC. Wit *et al.* (2013) verificaram a expressão de versican nas células epiteliais de câncer de colón, principalmente nas células neoplásicas periféricas do tumor. Abiko *et al.* (1999) verificaram forte imunoexpressão de versican no epitélio na região periférica do adenoma pleomórfico de glândula salivar (AP). No estudo de Zhao *et al.* (1999) houve uma intensa expressão imunohistoquímica para versican em todas as espécies de mixoma odontogênico. Já nos achados de Ito *et al.* (2002) houve uma positividade da expressão para versican no estroma de tumores odontogênicos .

A expressão de versican tem sido observada, principalmente, em tecidos mesenquimais, tais como papila dental, polpa dentária em bovinos e no periodonto em ratos. Com relação ao epitélio dental, alguns estudos relataram

a expressão de RNAm de versican no exterior do epitélio do esmalte na fase inicial do germe dentário de ratos (HIKAKE *et al.*, 2003), o que poderia sugerir que o versican poderia ter alguma participação na tumorigênese do ameloblastoma, onde no presente estudo foi bastante expresso, haja vista que a origem desse tumor também é o epitélio odontogênico ainda indiferenciado.

Portanto, o presente estudo demonstrou que a imunoexpressão de ADAMTS-1 e seus substratos (agrecan, brevican e versican) são expressos no ameloblastoma e no TOCC, sendo significativamente maior no ameloblastoma. Estes resultados sugerem que as proteínas estudadas poderiam ter alguma participação no comportamento biológico do ameloblastoma.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados oriundos do estudo imunohistoquímico dos tumores odontogênicos. Concluí-se, que no presente estudo houve expressão de ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican tanto no ameloblastoma quanto no TOCC, sendo significativamente maior no ameloblastoma. Não houve correlação entre as expressões das proteínas estudadas. Portanto, estes resultados sugerem que as proteínas estudadas podem estar atuando isoladamente e possivelmente relacionadas com o crescimento invasivo desta neoplasia.

9 REFERÊNCIA

ABIKO Y, NISHIMURA M, MITAMURA J, RAHEMTULLA F, SASANO Y, KUWABARA M, SATOH S, SAITOH S, HATAKEYAMAY, KAGAYAMA M, MITANI H. An Immunohistochemical localization of biglycan, decorin and large chondroitin sulphate proteoglycan in pleomorphic adenoma. **Acta Histochem. Cytochem.**, 32 (6): 459-463, 1999.

AMZERIN M, FADOUKHAIR Z, BELBARAKA R, IRAQUI M, BOUTAYEB S, M'RABTI H, KEBDANI T, HASSOUNI K, BENJAAFAR N, EL GUEDDARI B K, ERRIHANI H. Metastatic ameloblastoma responding to combination chemotherapy: case report and review of the literature. **J Med. Case Rep.** 2011 Oct 3;5:491.

APTE SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. **J. Bio. Chem.** 2009 Nov13, 284(46): 31493-7.

BARNES L, EVESON JW, REICHAART PA, SIDRANSKY D, editors. World Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: **IARC**; 2005.

DANDRIYAL R, GUPTA A, PANT S, BAWEJA HH. Surgical management of ameloblastoma: Conservative or radical approach. **Natl J. Maxillofac. Surg.** 2011 Jan;2(1):22-7.

DU WW, YANG W, YEE AJ. Roles of versican in cancer biology-tumorigenesis, progression and metastasis. **Histol Histopathol.** 2013 Jun; 28(6):701-13.

FRISCHKNECHT R, SEIDENBECHER CI. Brevican a key proteoglycan in the perynaptic extracellular matrix of the brain. **Int. J. Bioch. Cell Biolog.** 2012 Jul; 44(7): 1051-4.

FREITAS VM, DO AMARAL JB, SILVA TA, SANTOS ES, MANGONE FR, PINHEIRO JJV, JAEGER RG, NAGAI MA, MACHADO-SANTELLI GM. Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion. **Mol. Cancer.** 2013 Jan5; 12:2.

GUPTA GS, GUPTA A, GUPTA RK. **Animal lectins: form, finction and clinical applications.** Editora: Springer, 2012.

HIKAKE T, MORI T, ISEKI K, HAGINO S, ZHANG Y, TAKAQI H, YOKOYA S, WANAKA A. Comparison of expression patterns between CREB family transcription factor OASIS and proteoglycan core protein genes during murine tooth development. **Anat. Embryol.** 2003; 206:373-80.

HOLLIDAY S, SCHNEIDER B, GALANG MTS, FUKUI T, YAMANE A, LUAN X, DIEKWISCH. Bones, teeth and genes: a genomic homage to Harry Sichers "Axial movement of teeth". **World J. Orthod.** 2005, 6 (1): 61-70.

HU B, KONG LL, MATTHEWAS RT, VIAPIANO MS. The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promoter glioma cell motility. **J. Biol Chem.** 2008 Sep 5, 283(36):244848-59.

HU B, KONG LL, MATTHEWAS RT, VIAPIANO MS. The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promoter glioma cell motility. **J. Biol Chem.** 2008 Sep 5, 283(36):244848-59.

ITO Y, ABIKO Y, TANAKA Y, KAKU T. Immunohistochemical localization of large chondroitin sulfate proteoglycan in odontogenic tumour. **Med Electron Microsc.** 2002 Sep; 35: 173-177.

JIA XL, LI SY, DANG SS, CHENG YA, ZHANG X, WANG WJ, CLARE E HUGHES, CATERSON B. Increased expression of chondroitin sulphate ptoteoglycans in rat hepatocellular carcinoma tissues. **World J. Gastroenterol.** 2012. August 14; 18 (30): 3962-3976.

JIANG BZ, TAMAKI-YKUHMA T, WANG ZL, OBARA N, SHIBATA S. Expression, localization and synthesis of versican by the enamel organ of developing mouse molar tooth germ: in vivo and in vitro study. **Arch. Oral Biol.** 2010 Dec; 55(12): 995-1006.

JING W, XUAN M, LIN L, WU L, LIU X, ZHENG W, TANG W, TIAN W. Odontogenic tumors: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. **Inter J. Oral Maxillofac. Surg.** 2007 Jan; 36(1): 20-25.

KIANI C, CHEN L, WU YJ, JYEE A, YANG BB. Structure and function of aggrecan. **Cell res.** 2002 Mar; 12 (1): 19-32.

KLER S, PALASKAR S, SHETTY VP, BHUSHAN A. Intraosseous calcifying cystic odontogenic tumor. **J Oral Maxillofac. Pathol.** 2009 Jan; 13(1): 27-29.

KOUKOURAKIS GU, MLLIADOU A, LONTOU-SOTIROPOULOU A. Ameloblastoma, a rare benign odontogenic tumour: an interesting tumour review targeting the role of radiation therapy. **Clin. Transl. Oncol.** 2011 Nov., 13(11): 793-797.

KURIBAYASHI Y, MORITA KI, TOMIOKA H, UEKUSA M, ITO D, OMURA K. Gene expression analysis by oligonucleotide microarray in oral leukoplakia. **J. Oral Pathol. Med.** 2009 Apr. 38(4): 356-361.

KUSAFUKA K, MURAMATSU K, KASAMI M, KURIKI k, HIROBE k, HAYASHI I, WATANABE H, HIRAKI Y, SHUKUNAMI C, MOCHIZUKI T, KAMEYA T. Cartilaginous features in matrix-producing carcinoma of breast: four cases report with histochemical and immunohistochemical analysis of matrix molecules. **Modern. Pathol.** 2008 Oct 21(10), 1282-1292.

LI D, WANG X, WU JL, QUAN WQ, MA L, YANG F, WU KY, WAN HY. Tumor-produced versican v1 enhances hcap18/IL37 expression in macrophages through activation of tlr2 and vitamin d3 signaling to promote ovarian cancer progression in vitro. **PloS One.** 2013;8(2):e56616.

LIU YJ, XU Y, YU Q. Full-length ADAMTS-1 and ADAMTS-1 fragments display pró and antimetastatic activity, respectively. **Oncogene**. 2006 Apr20; 25 (17): 2452-67.

LU R, WU C, GUO L, LIU Y, MO W, WANG H, DING J, WONG ET, YU M. The role of brevican in glioma: promoting tumor cell motility in vitro and in vivo. **BMC cancer**, 2012 Dec19; 12:607.

LU X, WANG Q, HU G, VAN POZNAK C, FLEISHER M, REISS M, MASSAQUÉ J, KANG Y. ADAMTS-1 and MMP-1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. **Genes Dev**. 2009 Aug.15, 23: 1882-1894.

LUO HY, Li TJ. Odontogenic tumours: a study of 1309 cases in a chinese population. **Oral Oncol**. 2009 Aug; 45(8): 706-11.

MENG Y, WEI L, WANG J, Monitoring gene expression profile changes in endometrial cancer using cDNA microarray technology. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. 2001 Jun.10, 81 (11): 665-8. Chinese.

MURAMATSU K, KUSAFUKA K, WATANABE H, MOCHIZUKI T, NAKAJIMA T. Ultrastructural immunolocalization of a cartilage-specific proteoglycan, aggrecan, in salivary pleomorphic adenomas. **Med Mol Morphol**. 2009 Mar;42(1):47-54.

NAGASE H, FUSHIMI K. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases. **Connect. tissue Res**. 2008; 49(3): 169-174.

NEVILLE B. W, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. **Patologia oral e maxillofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

OSTERNE RLV, BRITO RGM, ALVES APN, CAVALCANTE RB, SOUSA FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** 2011 Apr; 111(4): 474-81.

PAULISSEN G, ROCKS N, GUEDERS MM, CRAHAY C, QUESADA-CALVO F, BEKAERT S, HACHA J, ELHOUR M. Role of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in airway diseases. **Respir Res.** 2009 Dec 24; 10 (1): 127.

PORTER S, CLARK IM, KEVORKIAN L, EDWARDS DR. The ADAMTS metalloproteinase. **Biochem J.** 2005 February 15, 386 (pt1): 15-27.

REYES D, VILLANUEVA J, ESPINOSA S, CORNEJO M. Odontogenic calcific cystic tumor: A report of two clinical cases. **Med. Oral Patol. Cir. Bucal** 2007 Mar.1; 12(2): E126-9.

REGEZI JA, SCIUBBA JJ, JORDAN RCK. **Patologia oral.** 5° Ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.

REICHART PA, PHILIPSEN HP, SONNER S. Ameloblastoma: Biological profile of 3677 cases. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.** 1995 Mar, 31B(2): 86-89.

RIBEIRO ALR, NOBRE RM, ALVES-JUNIOR SM, KATAOKA MSS, BARROSO RFF, JAEGER RG, PINHEIRO JV. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and growth factors regulate the aggressiveness and proliferative activity of keratocystic odontogenic tumors. **Oral Sur Oral Pathol Oral Radiol.** 2012 Oct; 114(4): 487-96.

RICCIARDELLI C, SAKKO AJ, WEEN MP, RUSELL DL, HORSFALL DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. **Cancer Metastasis Rev.** 2009 Jun, 28(1-2): 233-245.

ROCKS N, PAULISSEN G, HOUR ME, QUESADA F, CRAHAY C, GUEDERS M, FOIDART JM, NOEL A, CATALDO D. Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. **Biochem.** 2008 Feb; 90(2): 36-79.

ROCKS N, PAULISSEN G, CALVO FQ, MUNAUT CM, GONZALEZ MLA, GUEDERS M, HACHA J, GILLES C, FOIDART JM, NOEL A, CATALDO D D. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. **J. Cancer Res.** 2008 Nov. 15, 68(22): 9541- 50.

SHINDO T, KURIHARA H, KUNO K, YOKOYAMA H, WADA T, KURIHARA Y, IMAI T, WANG Y, OGATA M, NISHIMATSU H, MORIYAMA N, OH-HASHI Y, MORITA H, ISHIKAWA T, NAGAI R, YAZAKI Y, MATSUHIMA K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility and organ morphology and function. **J. Clin. Invest.** 2000 May, 105(10): 1345-1352.

SONE S, NAKAMURA N, MARUYA Y, TAKAHASHI I, MIZOGUCHI I, MAYANAGI H, SASANO Y. Expression of versican and ADAMTS during rat tooth eruption. **J. Mol. Histolog.** 2005 May, 36(4): 281-288.

SOUZA RS, PINHAL MAS. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arq. Bras. Ciênc. Saúde**, v. 36, n-1, p.48-54, jan./abr. 2011.

STANTON H, MELROSE J, CHRISTOPHER BL, FOSANG AJ. Proteoglycan degradation by the Adamts family of proteinase. **Biochem. Biophys Acta.** 2011 Dec; 1812(12):1616-29.

SUHOVSKIH AV, MOSTOVICH LA, KUNIN IS, BOBOEV MM, NEPOMNYASHCHIKH GI, AIDAGULOVA SV, GRIGORIEVA EV. Proteoglycans expression in normal human prostate tissue and prostate cancer. **ISRN Oncol.** 2013 Apr. 18; 2013:10680136.

TAWFIK MA, ZYADA MM., Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** 2010 Feb; 109(2):e67-e73.

THEOCHARIS AD, SKANDALIS SS, TZANAKAKIS GN, KARAMANOS NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FERBS J.** 2010 Oct.,277(19) 3904-3923.

THINAKARAN M, SIVAKUMAR P, RAMALINGAM S, JEDDY N, BALAGUHAN S. Calcifying ghost cell odontogenic cyst: A review on terminologies and classifications. **J Oral Maxillofac. Pathol.** 2012 Sep; 16(3): 450-453.

TORRES-LAGARES D, INFANTE-COSSÌO P, HERNÁNDEZ-GUISADO JM, GUTIÉRREZ-PÉREZ JL. Mandibular ameloblastoma. A review of the literature and presentation of six cases. **Med. Oral Patol. Cir. Bucal.** 2005 May-Jul;10(3):231-8.

WEEN MP, OEHLER MK, RICCIARDELLI C. Role of versican, hyaluronan and cd44 in ovarian cancer metastasis. **Int. J. Sci.** 2011 Jan 31, 12(2): 1009-1029.

WEGROWSKI Y, MAQUART FX. Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 2004 Mar.,49(3): 259-68.

WIGHT TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. **Curr. Opin. in cell Biol.** 2002 Oct; 14(5):617-623.

WIT M, BELT EJ, DELIS-VAN DIEMEN PM, CARVALHO B, COUPÉ VM, STOCKMANN HB, BRIL H, BELIEN JA, FIJNEMAN RJ, MEIJER GA. Lumican and versican are associated with good outcome in stage II and III colon cancer. **Ann Sur Oncol.** 2013 Dec, 20 Supl 3:S348-59.

YAMADA K, YAMADA T, SASAKI T, RAHEMTULLA F, TAKAGI M. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of large proteoglycans in human tooth germs at the bell stage. **Histochem J.** 1997 Feb, 29(2): 167-175

YANG W, YEE AJ. Versican V2 isoform enhances angiogenesis by regulating endothelial cell activities and fibronectin expression. **FEBS Lett.** 2013 Jan 16;587(2):185-92.

ZHAO M, LU Y, TAKATA T, OGAWA I, MIYAUCHI M, MOCK D, NIKAI H. Immunohistochemical and histochemical characterization of the mucosubstances of odontogenic myxoma: Histogenesis and differential diagnosis. **Pathol. Res. Pract.** 1999, 195(6): 391-397.

ZHAO M, TAKATA T, KUDO Y, SATO S, OGAWA I, WAKIDA T, NIKAI H. Biosynthesis of glycosaminoglycans and aggrecan by tumor cells in salivary pleomorphic adenoma: ultrastructural evidence. **J. Oral Pathol. Med.** 1999 Nov; 28(10):442-50.

ZHANG Z, ZHANG J, MIAO L, LIU K, YANG S, PAN C, JIAO B. Interleukin-11 promotes the progress of gastric carcinoma via abnormally expressed versican. **Int. J. Biol. Sci.** 2012,8(3): 383-93.

10 ANEXOS

ANEXO A

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA ADAMTS-1 E PROTEOGLICANOS NO AMELOBLASTOMA, CISTO DE GORLIN E QUERATOCISTO

Pesquisador: JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20815813.0.0000.0018

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 409.790

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto pretende estudar os tumores odontogênicos que apesar de serem tumores benignos são localmente invasivos apresentando taxas altas de recorrência e morbidade. Por sua vez o tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) é considerado um tumor pouco invasivo apresentando taxas baixas de recorrência. A proteína ADAMTS-1 e seus substratos (proteoglicanos) têm sido relacionados a uma maior invasividade tumoral e a um pior prognóstico. Para tal utilizarão imunohistoquímica com o intuito de verificar as possíveis diferenças entre a expressão dessas proteínas e apontar o provável papel das mesmas nos tumores estudados.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é avaliar a imunexpressão da ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican no ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico e TOCC que utilizaremos como controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como serão incluídas amostras de ameloblastoma, TOC e TOCC incluídos em parafina e arquivados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Os riscos para os pacientes serão mínimos uma vez que serão utilizados blocos de parafina arquivados no Laboratório de Patologia Bucal da UFPA.

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

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 409.790

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A tema é de extrema relevância e pertinente ao enfrentamento do câncer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos estão corretos e pertinentes aos objetivos dos pesquisadores.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do expostos somos pala aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELEM, 30 de Setembro de 2013

Assinador por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)

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

ANEXO B

Tabela da média de expressão imunohistoquímica de ADAMTS-1 em tumores odontogênicos.

N° de casos	Ameloblastoma		TOCC	
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
1	84%	24%	41%	30%
2	68%	25%	53%	20%
3	84%	68%	85%	34%
4	71%	22%	65%	30%
5	92%	33%	62%	15%
6	81%	42%	41%	15%
7	71%	30%		
8	86%	46%		
9	83%	21%		
10	85%	71%		
11	75%	43%		
12	58%	26%		
13	83%	27%		
14	80%	22%		
15	90%	22%		
16	87%	36%		
17	87%	41%		
18	57%	31%		
19	78%	25%		
20	91%	37%		

ANEXO C

Tabela da média de expressão imunohistoquímica de agreca em tumores odontogênicos.

Nº de casos	Ameloblastoma		TOCC	
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
1	37%	24%	40%	16%
2	78%	38%	33%	40%
3	70%	34%	53%	8%
4	84%	22%	49%	14%
5	37%	34%	48%	27%
6	82%	18%	43%	16%
7	61%	26%		
8	65%	27%		
9	70%	34%		
10	37%	31%		
11	62%	19%		
12	54%	9%		
13	60%	43%		
14	67%	22%		
15	66%	21%		
16	58%	19%		
17	60%	23%		
18	85%	21%		
19	78%	46%		
20	65%	43%		

ANEXO D

Tabela da média de expressão imunohistoquímica de brevican em tumores odontogênicos.

Nº de casos	Ameloblastoma		TOCC	
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
1	78%	43%	41%	29%
2	76%	40%	39%	47%
3	72%	40%	57%	44%
4	53%	78%	61%	63%
5	64%	29%	45%	29%
6	49%	37%	39%	29%
7	59%	43%		
8	60%	30%		
9	85%	46%		
10	59%	48%		
11	47%	55%		
12	58%	27%		
13	51%	47%		
14	54%	61%		
15	69%	61%		
16	53%	38%		
17	72%	63%		
18	84%	38%		
19	89%	63%		
20	70%	51%		

ANEXO E

Tabela da média de expressão imunohistoquímica de versican em tumores odontogênicos.

Nº de casos	Ameloblastoma		TOCC	
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
1	52%	42%	44%	24%
2	35%	30%	36%	55%
3	41%	40%	41%	46%
4	83%	45%	43%	53%
5	57%	47%	38%	20%
6	38%	48%	42%	37%
7	47%	63%		
8	66%	30%		
9	36%	32%		
10	45%	29%		
11	57%	32%		
12	48%	51%		
13	48%	31%		
14	76%	34%		
15	76%	58%		
16	66%	37%		
17	72%	39%		
18	68%	45%		
19	76%	37%		
20	73%	55%		