

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

Oswaldo Rodrigues de Souza Neto¹; João de Jesus Viana Pinheiro²

¹Mestre em Oncologia e Ciências Médicas; ²Pós-Doutor em Patologia Bucal

aquime00@hotmail.com

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: O ameloblastoma e o tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) são tumores odontogênicos (TO) benignos. Porém o comportamento biológico dessas lesões é distinto, pois o ameloblastoma é um tumor mais agressivo e com taxa de recorrência significativa, podendo chegar a 90% após o tratamento conservador. Já o TOCC é um tumor menos agressivo e raramente há recorrência. 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. Na literatura, não há um estudo caracterizando a expressão da ADAMTS-1 e seus substratos no ameloblastoma e no TOCC. Portanto esse estudo foi importante e inédito na literatura na busca de novas concepções em relação ao comportamento biológico desses tumores. **Objetivos:** Analisar a expressão da ADAMTS-1 e de seus substratos no ameloblastoma e no TOCC; verificar a diferença de expressão das proteínas estudadas entre o ameloblastoma e no TOCC e verificar se existe correlação entre a expressão da ADAMTS-1 e seus substratos. **Métodos:** O 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 parecer nº 409.790. As amostras de tecido foram coletadas nos arquivos do Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará – UFPA. 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. Foram realizados cortes seriados em blocos de parafina com três micrometros de espessura. Os cortes histológicos foram colhidos em lâminas tratadas com poly-D-lysin. 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. A técnica imunohistoquímica realizada foi da imunoperoxidase. 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 plugin” do programa Image J. Depois da segmentação da imagem, a área e a fração de coloração total foram medidas. As diferenças de imunoexpressão encontradas no ameloblastoma e no TOCC foram analisadas. Os dados obtidos a partir dos experimentos foram analisados usando o software GraphPad Prism 5. 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. **Resultados/Discussão:** Os resultados do estudo mostraram que todas as amostras de ameloblastoma e de TOCC expressaram ADAMTS-1, agrecan, brevican e versican. Sendo que as áreas de expressão dessas proteínas foram estatisticamente significativa no ameloblastoma comparada ao TOCC. Sendo que o valor de p para expressão da ADAMTS-1 e brevican foi significativo no epitélio do ameloblastoma foi ($p < 0,0105$). 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. Já brevican pode promover a ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), este por sua vez está relacionado com crescimento e migração de células. E para agrecan e versican o valor de p foi ($p < 0,0067$) e ($p < 0,0148$), respectivamente. Agrecan está altamente expresso em diversos tipos de câncer, podendo estar relacionado com a progressão das neoplasias. E a expressão de versican tem sido observada no epitélio do esmalte, 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. Estes resultados sugerem que as proteínas estudadas poderiam ter alguma participação no comportamento biológico do ameloblastoma. **Conclusão:** Conclui-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.

Referências:

NEVILLE, B. W.; DAMM D. D.; ALLEN C. M.; BOUQUOT J. E. **Patologia oral e maxillofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

PORTER, S.; CLARK I. M.; KEVORKIAN L.; EDWARDS D. R. **The ADAMTS metalloproteinase**. Biochem J. 2005 February 15, 386 (pt1): 15-27.

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

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS S. S.; TZANAKAKIS G. N.; KARAMANOS N. K. **Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting**. FERBS J. 2010 Oct.,277(19):3904-3923.