

IMUNOEXPRESSION DE ADAM-12 NO AMELOBLASTOMA

Natacha Malu Miranda da Costa¹; Lara Carolina D Araújo Pinto¹; Maria Sueli da Silva Kataoka²; Sérgio Melo de Alves-Júnior³; João de Jesus Viana Pinheiro³

¹Mestranda em Odontologia; ²Doutora em Ciências Morfológicas; ³Doutor em Patologia Bucal

natacha_malu@hotmail.com

Universidade Federal Do Pará (UFPA)

Introdução: O ameloblastoma é uma neoplasia benigna que se caracteriza pela invasividade local e pelas altas taxas de recorrência. O microambiente tumoral é um importante regulador do comportamento invasivo e seu estudo pode auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares que permeiam a progressão das neoplasias e na determinação de marcadores que permitam um melhor delineamento no tratamento de tumores. Sabe-se que a concentração de oxigênio no microambiente em torno das células neoplásicas é reduzida, resultando em hipóxia intratumoral. A hipóxia foi associada ao aumento de metástase e invasão neoplásica, além de potencializar a formação de invadopódios, que são protrusões de membrana celular ricas em actina e dotadas de atividade proteolítica intrínseca. Em condições de hipóxia, a proteína ADAM-12 (*A Disintegrin And Metalloproteinase 12*) têm sido relacionada com a formação de invadopódios. Nessa condição, os níveis de HIF-1 α são estabilizados e a sinalização de NOTCH1 é ativada pelo aumento do nível do ligante JAG2, recrutando a γ -secretase que irá clivar NOTCH1 e liberar o seu domínio intracelular. Este domínio intracelular, translocado para o núcleo, irá aumentar os níveis de ADAM-12, cuja atividade promove a clivagem do domínio pró-HB-EGF, lançando HB-EGF na região extracelular. O HB-EGF irá se ligar ao EGFR, localizado na membrana plasmática tanto da célula que o liberou quanto das células adjacentes. Essas sinalizações autócrina e parácrina levam à formação de invadopódios, podendo adicionalmente estimular invadopódios em células localizadas em regiões normóxicas, o que sugere sinalização cruzada entre as áreas de normóxia e hipóxia dos tumores. Em relação a ADAM-12, um estudo reforça que esta proteína influencia na formação dos invadopódios na hipóxia. Neste, os autores ilustraram que após o silenciamento da ADAM-12 o aumento na formação de invadopódios induzido pela hipóxia foi anulado. **Objetivos:** O objetivo desta pesquisa é analisar a expressão da proteína ADAM-12 no ameloblastoma, utilizando imunohistoquímica, para um melhor esclarecimento da fase inicial da cascata de invasão, correlacionando com a hipóxia. **Métodos:** Foram utilizados 20 casos de ameloblastoma (Tissue Microarray) e 7 casos de Tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) como controle. Os casos de TOCC foram retirados dos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará (CESUPA). Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Utilizou-se a imunohistoquímica para avaliar a expressão da ADAM-12 nas amostras teciduais, pela técnica da imunoperoxidase. Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em sequência decrescente de etanol. As secções foram então imersas em solução de H₂O₂ a 3% em metanol, proporção 1:1, durante 20 minutos para inibição da atividade da peroxidase endógena. Após esta etapa, recuperação antigênica foi efetuada em tampão citrato (pH 6,0) em câmara Pascal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 segundos. Sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA, Sigma®) a 1% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-ADAM-12 (Abcam. AB28747, Cambridge, MA, USA – diluição 1:150). Em seguida, os cortes

foram incubados durante 30 minutos com o sistema de detecção EnVision Plus (Dako®). Diaminobenzidina (Dako®) foi utilizada como cromógeno e, em seguida, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer (Sigma®) e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA). A avaliação da imunomarcagem foi realizada pela medida da área (μm) e da fração (%) de marcação de ADAM-12 no ameloblastoma e no TOCC. Imagens de campo claro de pelo menos cinco áreas de cada amostra, aleatoriamente selecionadas, foram obtidas utilizando o microscópio Axio Scope A1 equipado com uma câmera CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com objetiva de 40x. Para quantificar a imunomarcagem da proteína foi utilizado o software de domínio público ImageJ. As áreas coradas com diaminobenzidina foram segmentadas pelo plug-in “color deconvolution”. Após a segmentação das imagens, as áreas marcadas nas células do ameloblastoma e do TOCC foram então avaliadas. Para realizar a estatística, inserimos os dados no software GraphPad Prism 5. As diferenças entre as áreas marcadas de ameloblastoma e TOCC foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. **Resultados/Discussão:** Todas as amostras de ameloblastoma revelaram a expressão de ADAM-12. A expressão se apresentou de forma densa e uniforme no parênquima tumoral (epitélio tumoral), enquanto no estroma observou-se expressão puntiforme, especialmente localizada no citoplasma de fibroblastos. No epitélio tumoral foi visível a marcação citoplasmática e na membrana celular de forma uniforme, não estando presente no núcleo. As amostras de TOCC também expressaram ADAM-12, ilustrando leve marcação no parênquima e estroma tumoral, com maior predominância no epitélio. Ao comparar as duas lesões, houve uma maior expressão de ADAM-12 ($p = 0,0007$; $p < 0,001$) no epitélio tumoral do ameloblastoma, enquanto que no tecido conjuntivo não foi detectada diferença ($p = 0,1068$; $p > 0,05$). Sabe-se que o ADAM-12 é uma metaloprotease envolvida na miogênese e adipogênese em ratos, e sua superexpressão está envolvida com o crescimento tumoral nesses animais. Estudos mostram a interligação direta desta proteína no processo de formação de invadopódios na hipóxia. Além disso, um dos papéis mais bem estabelecidos da ADAM-12 é a liberação de ligantes biologicamente importantes, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador- α (TGF- α) e o fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF), mostrando seu papel importante no crescimento tumoral. Apesar do ameloblastoma tratar-se de uma neoplasia benigna, é localmente agressivo, sendo capaz de destruir tecidos moles e ósseos. A alta expressão de ADAM-12 nesta lesão sugere que essa proteína pode ter um papel importante na formação de invadopódios em condições de hipóxia. Estes resultados sugerem que se pode correlacionar diretamente a ADAM-12 com a patofisiologia do ameloblastoma. **Conclusão:** Embora melhorias significativas tenham sido obtidas no tratamento do ameloblastoma, a ocorrência de recidivas por invasividade local ainda é a principal causa de morbidade. A invasividade tumoral envolve múltiplas etapas e diferentes moléculas. A partir destes achados, conclui-se que a ADAM-12 encontra-se superexpressa no ameloblastoma e possivelmente influenciando no comportamento biológico desta neoplasia.

Referências:

ASAKURA, M. et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* v. 8, n. 1, p. 35–40, jan. 2002.

BASELGA, J.; ARTEAGA, C. L. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol.* v. 23, n. 11, p. 2445–49, abr. 2005.

BUCCIONE, R.; CALDIERI, G.; AVALA, I. Invadopodia: specialized tumor cells structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev.* v. 28, n. 1-2, p. 137–49, jun. 2009.

DÍAZ, B. et al. Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J Cell Biol.* v. 15, n. 2, p. 279–92, abr. 2013.