

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA TKS-5 EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO CÍSTICO CALCIFICANTE

Moema Ferreira dos Reis Horta¹; Natacha Malu Miranda da Costa¹; 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

moemafreis@hotmail.com

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Introdução: Os tumores odontogênicos compreendem uma gama de desordens de crescimento desde neoplasias benignas e malignas até má formações dos tecidos dentários. Dentre estes tumores o ameloblastoma é o mais prevalente e apesar de ser classificado como um tumor benigno pela OMS, apresenta comportamento localmente invasivo e recidivante, no entanto raramente sofrem metástase. São mais frequentes na mandíbula do que na maxila, podendo ou não atingir tecidos moles adjacentes, além de exibirem muitas variações histológicas. O ameloblastoma é originado no epitélio odontogênico e apresenta crescimento lento e contínuo. Tem sido relatado como sendo o tumor odontogênico de maior importância clínica principalmente por causa da morbidade causada por seu comportamento biológico. Atualmente, vários pesquisadores tem voltado sua atenção para entender quais moléculas estão envolvidas nas vias de sinalização que regulam o início e a progressão tumoral, a remodelação da matriz extracelular (MEC), das interações celulares e destas com a MEC, além de tentar-se compreender como estas participam nos processos relacionados ao comportamento invasivo. O microambiente tumoral é um importante regulador do comportamento invasivo e pode auxiliar na compreensão destes mecanismos moleculares e determinar marcadores que auxiliem em um melhor diagnóstico e melhor delineamento no tratamento destes tumores. Atualmente a proteína adaptadora TKs-5 tem sido associada a formação de invadopódio, projeção celular responsável pela lise pericelular da MEC, que tem papel importante nos mecanismos de invasão celular. A TKs-5 é um substrato de Tirosina-Quinase com um domínio Px e 5 domínios SH3. Está localizada na face citosólica da membrana celular, e se liga aos lipídios por meio de outras proteínas, participando então da conformação e estrutura celular, bem como na sinalização celular. Essa molécula tem sido largamente expressa em tumores e relacionada ao comportamento biológico dos mesmos. **Objetivos:** O objetivo deste estudo é verificar a imunexpressão da proteína TKs-5 no Ameloblastoma e no Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC), a fim de verificar se há diferença na imunexpressão de TKs-5 entre esses dois tumores, para um melhor delineamento da etapa inicial dos mecanismos de invasão celular relacionados a esta neoplasia. **Métodos:** Esta pesquisa foi realizada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências em Saúde (ICS) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Após aprovação pelo comitê de ética, 20 casos de ameloblastoma (Tissue Microarray) e 7 de TOCC foram utilizados para verificar a expressão de TKs-5. Os casos de TOCC foram obtidos nos arquivos do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia do Centro Universitário do Pará (CESUPA). Imunohistoquímica foi utilizada para avaliar a expressão da TKs-5 nas amostras teciduais, sendo realizada a 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-TKs-5 (Abcam, Cambridge, MA, EUA, 1:100). 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 imunomarcação foi realizada pelas medidas de área (μm^2) e de fração (%) de marcação de TKs-5 no ameloblastoma e no TOCC. Imagens de campo claro de pelo menos 6 áreas selecionadas aleatoriamente foram adquiridas em microscópio Axio Scope equipado com uma câmara CCD a cores Axiocam HRC (Carl Zeiss, Alemanha), com objetiva de 40x. Para quantificar a imunomarcação da proteína foi utilizado o software de domínio público ImageJ. As áreas coradas pela diaminobenzidina foram segmentadas usando o plug-in “colour 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 não paramétrico de Mann-Whitney. **Resultados/Discussão:** Todos os tumores estudados revelaram a expressão de TKs-5. No ameloblastoma a expressão desta proteína ocorreu predominantemente no citoplasma e de forma granular, tanto nas células centrais das ilhas formadas pelo parênquima tumoral, quanto nas células colunares na periferia dos cordões epiteliais, assim como no estroma tumoral. Os resultados evidenciaram uma elevada expressão de TKs-5 nas células neoplásicas do ameloblastoma em relação as do TOCC ($p < 0,05$), assim como uma maior expressão nas células tumorais em relação ao estroma do ameloblastoma ($p < 0,001$). A descoberta de proteínas relacionadas a formação do invadopódio, dentre elas a TKs-5, estão associadas a invasão e metástase tumoral, aumentando o nosso interesse para tentar desvendar proteínas que estejam envolvidas no mecanismos de invasão do ameloblastoma. Achados recentes do nosso grupo de pesquisa sugeriram que a cortactina e a MT1-MMP, principais componentes do invadopódio, podem ter influência no comportamento localmente agressivo do ameloblastoma. Vários autores tem enfatizado que o recrutamento de cortactina e TKs-5 são os primeiros eventos na formação de invadopódios. Observa-se na literatura vários estudos que investigam a presença dessa molécula em invadopódios de tumores de mama, prostata, glioblastomas, entre outros. Além disso nenhum dado foi encontrado na literatura até a presente data sobre a investigação de proteínas adaptadoras no mecanismo de invasão celular do ameloblastoma. A alta expressão de TKs-5 nessa lesão sugere que essa proteína tem um papel importante na formação de invadopódios e por seguinte no comportamento biológico do ameloblastoma. **Conclusão/Considerações Finais:** Nossos resultados revelaram uma alta expressão de TKs-5 no ameloblastoma, indicando um possível papel da TKs-5 no comportamento biológico do Ameloblastoma. Mesmo com o conhecimento atual sobre invadopódios e mecanismos de invasão celular, ainda existem lacunas a serem preenchidas para que se possa entender melhor os mecanismos que levam neoplasias benignas a possuírem comportamento agressivo e elevada taxa recidivante, como o ameloblastoma. Estes achados podem contribuir para a realização de tratamentos mais eficazes e diminuir a morbidade dessa neoplasia com o avanço de novos recursos terapêuticos.

Referências:

Blouw, B. et al. A role for podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol*, v.87, n. 8/9, p. 555-567, Set. 2008.

Courtneidge, S.A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochem Soc Trans*, v.40, n.1, p. 129-132, Fev. 2012.

Clark, E.S.; Weaver, A.M. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol*, v. 87, n. 8/9, p. 581-590, Set. 2008.

Pinheiro, J.J.V. et al. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology*, v.45, n.1, p.65-72, Jul. 2004.

Pinheiro J.J.V. et al. Invadopodia proteins, cortactin and membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are expressed en ameloblastoma. *Histopathology*, v.59, n.6, p.1266-9, Jul. 2011.