FILIPPE MODOLO SIQUEIRA

**DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES NÃO COLÁGENOS DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM TUMORES ODONTOGÊNICOS**

São Paulo

2006

Filipe Modolo Siqueira

**Distribuição dos componentes não colágenos da matriz extracelular
em tumores odontogênicos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o título de
Doutor pelo Programa de Pós Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Ney Soares de Araújo

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Modelo F. Distribuição dos componentes não colágenos da matriz extracelular em tumores odontogênicos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____/____/____

Banca examinadora

1) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Tua Caminhada...

Tua caminhada ainda não terminou...

A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.

Se amanhã sentir saudades, lembra-te da fantasia e sonha com a tua próxima vitória. Vitórias que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.

Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti, é inútil buscá-lo acima das nuvens e ao lado das estrelas.

Por mais que tenhas errado e erres, para ti haverá sempre esperança, enquanto te envergonhares de teus erros.

Tu és jovem.

Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar à perfeição. A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã o sinónimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram.

Olhe para trás...Mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

MINHA FAMÍLIA:

“O verdadeiro amor não se conhece por aquilo que exige, mas por aquilo que oferece”.

Jacinto Benavente

Pai... A você que sonhou em fazer um curso superior e nunca pôde... Saiba que dedicarei minha vida para que as pessoas continuem sonhando o sonho que você nunca realizou. Saudades...

Mãe... Em você sinto o grande porto seguro da minha vida... Obrigado por estar a nosso lado em todas as horas... Obrigado por ser a pessoa mais forte que eu conheço... Nunca existirão minhas conquistas... Elas sempre serão nossas...

Fá... Obrigado pelo exemplo de determinação e dedicação que você me mostra em todos os momentos... Uma das razões de estar aqui hoje é o fato de me espelhar em você...

A você, com amor

*O amor é o murmúrio da terra
quando as estrelas se apagam
e os ventos da aurora vagam
no nascimento do dia...*

*O ridente abandono,
a rútila alegria
dos lábios, da fonte
e da onda que arremete
do mar...*

*O amor é a memória
que o tempo não mata,
a canção bem-amada
feliz e absurda...*

E a música inaudível...

*O silêncio que treme
e parece ocupar
o coração que freme
quando a melodia
do canto de um pássaro
parece ficar...*

*O amor é Deus em plenitude
a infinita medida
das dádivas que vêm
com o sol e com a chuva
seja na montanha
seja na planura
a chuva que corre
e o tesouro armazenado
no fim do arco-íris.*

Vinícius de Moraes

Mi

Gatinha...

Continuou remando mesmo quando larguei os remos...

Tu és o motivo de minha luta para tornar-me uma pessoa melhor...

Amo-te...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo, meu orientador, que com muita seriedade, competência e conhecimento ajudou a construir toda a estrutura que durante sete anos da minha vida foi minha segunda casa. Seu amor e dedicação à patologia fazem com ele seja um grande exemplo a ser seguido em nossa vida profissional. Seu exemplo de administração ajudou-me a voltar a crer que o caráter é a grande força que motiva o ser humano.

A Prof. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, minha eterna orientadora. No momento mais difícil da minha vida, quando lutava para que a ciência se tornasse apenas uma lembrança obscura em minha vida, a senhora pegou na minha mão e com sua competência e ternura me mostrou que na verdade eu pertencia à ciência e disso não poderia fugir. Obrigado por me mostrar como dentro da minha simplicidade e ignorância poderia me tornar digno dos seus ensinamentos. Obrigado pela grande oportunidade da minha vida.

A Prof. Dra. Marília Trierveiller Martins, professora e amiga, que enxergou meu potencial e, felizmente, nunca soube usar a palavra “não” comigo. Esteve sempre ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis e me proporcionou a primeira experiência na docência.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP: Suzana Catanhede Orsini Machado de Sousa, Marina Helena C. G. Magalhães, Décio dos Santos Pinto Júnior, Fabio Daumas Nunes, Andréa Mantesso e Karem Ortega meu sincero agradecimento pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável.

A todos meus prezados colegas de turma na pós-graduação e valiosos amigos: Alexander Salvoni, Alexandre Fraige, Adriana Neves, Aymman Nassif, Cristane Furuse, Elena Riet, Eveline Turatti, Flávia, Helder, Hu, Márcia, Cury, Camila, Katiucha, Marcelo Zamunaro, Márcia Gorish, Regina Dorta, Renata Tucci, Rogério Castilho, Vanessa Veltrini, Adriana Etges, Fabrício Bitu, Daniela Bueno, Fabrício Passador, Cláudia Cazal, Felipe Salles, Luciana Matizonkas, Nathalie Rezende, Cristiane Squarize, Juliana, Tatina, Karen, Kivia, Lineu, Marina, Michelly, Vanessa, Yonara, Carlos Barboza, Paulo, Paulo Braz, Patrícia, Rhoner, Thaís e em especial ao Arlindo, Serginho, Adriano e Carol pela amizade e confiança. O convívio com vocês todos fará parte dos bons momentos dos quais sempre me recordarei.

As amigas Edna e Elisa, técnicas do Laboratório de Patologia Bucal da FOU SP, pelo indispensável auxílio na confecção da parte experimental deste trabalho e pela amizade e cumplicidade compartilhada durante esses sete anos.

As funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP: Zilda, Néia, Nair, Bia, Patrícia, Gleyce e Graça, obrigado por tornar tão agradável nosso convívio e por toda disposição em colaborar. Agradecimento especial a Zilda e Néia pela paciência e orientações e a Bia e Nair pelas broncas.

As funcionárias da Comissão de Pós-Graduação da FOUSP: Cátia, Nair e Alessandra pelo auxílio prestado durante o curso.

Ao pesquisador Larry W. Fisher (NIH, Bethesda, MD, USA), por ceder gentilmente parte dos anticorpos utilizados neste trabalho.

Ao “Sr. Wilson”, que mesmo sem ter escolha, compartilhou boa parte das alegrias e agruras da nossa “vida patológica” e também da minha vida pessoal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão d Bolsa PICDT.

A FOUSP pelos nove inesquecíveis anos aqui passados. E por tudo que esses anos me proporcionarão no futuro.

A todos que diretamente ou indiretamente participaram da elaboração desse trabalho.

Modolo F. Distribuição dos componentes não colágenos da matriz extracelular em tumores odontogênicos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como um complexo de proteínas e glicoproteínas que envolve as células nos mais diversos tecidos e tem papel importante na diferenciação e atividade celular, bem como no processo de mineralização e nos processos neoplásicos. Os componentes não colágenos da MEC têm sido abundantemente estudados, visando conhecer os minuciosos detalhes da biologia dos tecidos e assim entender os mecanismos envolvidos em suas patologias. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a expressão e distribuição dos seguintes componentes não colágenos da MEC dos tecidos dentais: biglican, decorin, fibromodulin, osteonectina (ONC), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCC) no ameloblastoma e no tumor odontogênico cístico calcificante (cisto de Gorlin). Para tanto foi utilizada a técnica da imunoistoquímica, com o método da estreptavidina-biotina-peroxidase, e anticorpos contra as proteínas anteriormente citadas. Os resultados mostraram que o biglican, o decorin e a BSP foram expressos somente nas células epiteliais metaplásicas, nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação, no estroma dos ameloblastomas e no ectomesênquima neoplásico do tumor odontogênico cístico calcificante. Já o fibromodulin e a OCC foram predominantemente negativos no componente epitelial e no mesenquimal, com

exceção para as células fantasmas, células fantasmas em processo de calcificação e áreas de hialinização próximas ao epitélio. A ONC foi positiva na maioria das células epiteliais, com exceção das células estrelárias dos ameloblastomas folicular e acantomatoso, e também no componente mesenquimal de ambas neoplasias. Já a OPN apresentou positividade somente nos focos de calcificação presentes no tumor odontogênico cístico calcificante. As proteínas estudadas apresentaram distribuição semelhante em neoplasias caracterizadas por padrões de crescimento diferentes, levando a crer que, apesar de participarem ativamente do mecanismo de crescimento neoplásico intra-ósseo, isoladamente não exercem papel decisivo na determinação do tipo de padrão de crescimento. Outro fato digno de relevância é a baixa expressão dessas proteínas nas células epiteliais neoplásicas quando comparada com a expressão no estroma e ectomesênquima, levando-nos a crer que as células epiteliais atuem principalmente como estimuladores da expressão dessas proteínas, que, por sua vez, podem atuar de forma agonista ou antagonista ao crescimento neoplásico.

Palavras-chave: Proteoglicanos – Glicoproteínas – Ameloblastoma - Tumor odontogênico cístico calcificante - Imunoistoquímica.

Modolo F. Distribution of the non-collagenous components of extracellular matrix in odontogenic tumours [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) can be defined as a complex of proteins and glycoproteins that involves the cells in all tissues. It has a key role in cell differentiation and activity, as well as in mineralization and neoplastic processes. The non-collagenous components of the ECM have been abundantly studied to know the details of the biology of tissues and thus to understand the mechanisms involved in its pathologies. The aim of the present work is to study the expression and distribution of the following non-collagenous components of the ECM of dental tissues: biglycan, decorin, fibromodulin, osteonectin (ONC), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OC) in ameloblastoma and the calcifying cystic odontogenic tumour. The streptavidin-biotin-peroxidase method of immunohistochemistry was used with antibodies against the antigens previously cited. The results show that biglycan, decorin and BSP had been expressed only in metaplastic epithelial cells, in ghost cells and ghost cells in calcification process, stroma of ameloblastomas and neoplastic ectomesenchyma of the calcifying cystic odontogenic tumour. The fibromodulin and the OC showed predominantly negative expression in the epithelial and mesenchymal components, with exception for the ghost cells, ghost cells in calcification process and hyalinization areas next to the epithelium. The ONC was positive in the majority of the epithelial cells, with

exception of the central cells of follicular and acanthomatous ameloblastomas, and also in the mesenchymal component of both tumours. OPN presented positivity only in the calcification focus of the calcifying cystic odontogenic tumour. The proteins studied presented similar distribution in tumours characterized by different patterns of growth, leading to believe that although they participate actively of the mechanism of intra-osseous growth, separately they do not exert a key role in the determination of the type of growth pattern. Another relevance fact is the low expression of these proteins in the neoplastic epithelial cells when compared to the expression in stroma and ectomesenchyma, which make us believe that the epithelial cells act mainly as stimulators of the expression of these proteins, which in turn can act as agonist or antagonist to the tumour growth.

Key words: Proteoglycans - Glycoproteins - Ameloblastoma - calcifying cystic odontogenic tumour - Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Expressão dos proteoglicanos biglican, decorin e fibromodulin no ameloblastoma.....	56
Figura 5.2 – Expressão da osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina no ameloblastoma.....	59
Figura 5.3 – Expressão dos proteoglicanos biglican, decorin e fibromodulin no tumor odontogênico cístico calcificante.....	65
Figura 5.4 – Expressão da osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina no tumor odontogênico cístico calcificante.....	69

LISTA DE TABELAS

Quadro 2.1 - Classificação dos tumores odontogênicos segundo a OMS (2005).....	25
Tabela 4.1 - Clone, título e tempo de incubação dos anticorpos primários e tratamento enzimático utilizado.....	49
Tabela 5.1 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo biglican, decorin, fibromodulin, osteonctina (ONC), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCC) no ameloblastoma.....	53
Tabela 5.2 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelo biglican, decorin, fibromodulin, osteonctina (ONC), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCC) no tumor odontogênico calcificante cístico.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aV β 3	Integrina composta pelas subunidades alfaV e beta3
BSA	Sigla em inglês para albumina de soro bovino
BSP	Sigla em inglês para a sialoproteína óssea
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucléico
ECM	Extracellular matrix
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicano
HCl	Ácido clorídrico
LF100	Anticorpo anti-sialoproteína óssea humana
LF136	Anticorpo anti-decorin humano
LF166	Anticorpo anti-osteopontina humana
LF32	Anticorpo anti-osteocalcina bovina
LF37	Anticorpo anti-osteonectina humana
LF51	Anticorpo anti-biglican humano
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
OCC	Osteocalcina
ONC	Ostionectina
OPN	Osteopontina
OMS	Organização Mundial da Saúde

PG	Proteoglicano
RGD	Seqüência tripeptídica arg-gly-asp (arginina-glicina-ácido aspártico)
RNA	Sigla em inglês para ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SIBLING	Sigla em inglês para glicoproteína pequena ligante de integrina ligada ao N
SLRP	Sigla em inglês para pequenos proteoglicanos ricos em leucina
SPARC	Sigla em inglês para proteína secretada, acídica, rica em cisteína (osteonectina)
TBST	Solução salina tamponada TRIS-HCl acrescida de tween
TEM	Transição epitélio mesênquima
TGF- β	Sigla em inglês para fator de crescimento transformador beta
TRIS	Hidroximetilamino-metano
VEGF	Sigla em inglês para fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Valores percentuais
KDa	KiloDaltons
α	Alfa
β	Beta
Ca^{2+}	Íon cálcio
μm	Micrometros
pH	Medida do potencial hidrogeniônico
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
M	Medida de molaridade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Tumores odontogênicos.....	24
2.1.1 Ameloblastoma.....	26
2.1.2 Tumor odontogênico cístico calcificante (cisto de Gorlin).....	30
2.2 Componentes não colágenos da MEC.....	33
2.2.1 Proteoglicanos.....	34
2.2.1.1 <i>biglican</i>	35
2.2.1.2 <i>decorin</i>	36
2.2.1.3 <i>fibromodulin</i>	38
2.2.2 Glicoproteínas.....	39
2.2.2.1 <i>osteonectina</i>	39
2.2.2.2 <i>osteopontina</i>	40
2.2.2.3 <i>sialoproteína óssea</i>	42
2.2.2.4 <i>osteocalcina</i>	44
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Amostra de tecido.....	47
4.2 Técnica imunoistoquímica.....	47
4.3 Método de análise do material.....	51

5 RESULTADOS	52
5.1 Ameloblastoma	52
5.1.1 Biglican	53
5.1.2 Decorin	54
5.1.3 Fibromodulin	54
5.1.4 Osteonectina	57
5.1.5 Osteopontina	57
5.1.6 Sialoproteína óssea	58
5.1.7 Osteocalcina	58
5.2 Tumor odontogênico cístico calcificante	60
5.2.1 Biglican	62
5.2.2 Decorin	63
5.2.3 Fibromodulin	64
5.2.4 Osteonectina	66
5.2.5 Osteopontina	66
5.2.6 Sialoproteína óssea	67
5.2.7 Osteocalcina	67
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXO	100

1 INTRODUÇÃO

As diferentes atividades biológicas em seres vivos são consequência de um conjunto de eventos provenientes de interações complexas das células entre si e com a matriz extracelular (MEC), classicamente conhecidas como sinalização. Nos últimos anos a caracterização de várias moléculas constituintes da MEC tornou evidente a sua importância, não apenas como componente estrutural dos tecidos, mas também como moléculas mediadoras no processo de sinalização (TENÓRIO, 2003).

A MEC pode ser definida como um complexo de proteínas e glicoproteínas que envolve as células e pode ser abundante em algumas estruturas como no tecido conjuntivo, cartilagem e também tecidos mineralizados como osso e dentina (HALL; EMBERY, 1997). Seus maiores constituintes incluem os colágenos, os proteoglicanos (PGs) e as glicoproteínas, cada um desses grupos apresentando grande diversidade (HALL; EMBERY, 1997).

A MEC não serve apenas como uma rede que estabiliza a estrutura física dos tecidos (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004), mas também tem papel ativo no desenvolvimento, já que a expressão de moléculas desta pode afetar processos fundamentais na organogênese (TENÓRIO, 2003), migração, proliferação, forma e função das células (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004). Segundo Ingram et al. (1993) os componentes não colágenos da MEC participam de todos os mecanismos regulatórios que requerem interferência da matriz sobre a dinâmica celular. Sendo assim, alterações nas relações das células com a MEC podem interferir na integridade dos tecidos (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004).

Acredita-se ainda que os componentes não colágenos sejam os responsáveis pelas propriedades exclusivas que distinguem os vários tecidos mineralizados entre si (SOMMER et al., 1996). Além disso, sabe-se que as moléculas da MEC produzidas por células neoplásicas podem executar papéis importantes na modulação do crescimento e diferenciação, influenciando no comportamento biológico das neoplasias (ZHAO et al., 1999). Neste contexto os componentes não colágenos dos tecidos têm sido cada vez mais estudados, objetivando conhecer os minuciosos detalhes da biologia dos tecidos e assim entender os mecanismos envolvidos em suas patologias.

Os tumores odontogênicos são neoplasias relacionadas com o aparato odontogênico (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a) e, da mesma forma que na odontogênese normal, dependem de interações indutivas variadas entre o epitélio e o ectomesênquima odontogênico (WALDRON, 2004) mediadas pela MEC. Constituem um grupo heterogêneo de neoplasias que ocorrem nos ossos maxilares e nos tecidos moles adjacentes aos dentes (PAPAGERAKIS et al., 1999) e possuem comportamentos biológicos diferentes (WALDRON, 2004). Em sua maioria são benignos, com uma pequena porcentagem demonstrando invasão celular local. Em alguns casos, transformações malignas seguidas por metástases têm sido descritas (PAPAGERAKIS et al., 1999).

Os tumores odontogênicos exibem diferentes padrões de crescimento. Há o padrão de crescimento predominantemente invasivo, no qual a neoplasia invade as estruturas ósseas adjacentes e apresenta comportamento clínico mais agressivo, como o ameloblastoma, e o padrão de crescimento predominantemente expansivo, onde a lesão apresenta cápsula fibrosa e, portanto, expande as estruturas ósseas

adjacentes, apresentando comportamento clínico menos severo, como é o caso do tumor odontogênico cístico calcificante (cisto de Gorlin).

Por ser um grupo heterogêneo de neoplasias existe grande variedade histopatológica entre os tumores odontogênicos, muitos deles apresentando áreas de calcificação distrófica e outros apresentando diferenciação óssea ou cementóide (CHEN et al., 1998b). A presença dessas estruturas calcificadas com determinadas características individuais freqüentemente serve como critério histopatológico para o diagnóstico diferencial e definitivo. Entretanto mecanismos de formação dessas calcificações ainda são pouco conhecidos (CHEN et al., 1998b).

A determinação dos padrões de expressão dos componentes não colágenos da MEC nos tumores odontogênicos pode ajudar a entender seu papel funcional nessas neoplasias. Poucos estudos abordam esse tema (ITO et al., 2002) e diversas questões ainda permanecem não esclarecidas, questionando-se, por exemplo, se a patogênese dos tumores odontogênicos está relacionada com a expressão alterada das proteínas da MEC e qual seria seu papel no desenvolvimento dessas lesões. Um bom exemplo é o gene da sialoproteína óssea (BSP) que originalmente não se expressa em tecido ósseo adulto normal, mas que pode ser ativado em processos neoplásicos (CHEN et al., 1998b).

A MEC da dentina é constituída por colágeno (90%), principalmente o colágeno tipo I (85%) e os tipos III e V (5%), e pelos componentes não colágenos (10%) (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). De forma semelhante, as principais macromoléculas da MEC que compõe a polpa dental humana são as proteínas colágenas (tipo I, III e IV), e os componentes não colágenos, entre eles a osteonectina, osteopontina e osteocalcina, os proteoglicanos e os fosfolipídios (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004). Embora em pequenas quantidades, esses

componentes não colágenos são muito importantes para fisiologia tecidual, influenciando na sua forma e função, seja através do controle da proliferação celular e morfogênese tecidual, seja participando ativamente da organização do colágeno. Além disso, são os principais responsáveis pela promoção e controle da mineralização das fibras colágenas na dentina.

Entre os principais grupos de componentes não colágenos da MEC encontra-se o grupo dos proteoglicanos (PGs), que são observados em tecidos mineralizados e não mineralizados, e o grupo das glicoproteínas específicas de tecido mineralizado (SEPTIER et al., 2001). Considerando-se que os tumores odontogênicos são originários dos tecidos formadores dos dentes, optamos por estudar a expressão de alguns dos principais componentes não colágenos da MEC dos tecidos dentais (os proteoglicanos: biglican, decorin e fibromodulin e as glicoproteínas: osteonectina, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina) nos seguintes tumores odontogênicos: ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante (cisto de Gorlin).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tumores odontogênicos

No decorrer dos tempos numerosos pesquisadores sugeriram diversas classificações histológicas para os tumores odontogênicos com o objetivo de ajudar a compreender este complexo grupo de lesões (PHILLIPSEN; REICHART, 2002). Em 1971 foi publicado o primeiro consenso na taxonomia dos cistos, tumores odontogênicos e lesões associadas, sob o título de “Histological Typing of Odontogenic Tumours, Jaw Cysts and Allied Lesions” (“Classificação Histológica dos Tumores Odontogênicos, Cistos Maxilares e Lesões Associadas”) que dividiu os tumores odontogênicos de acordo com o comportamento biológico em neoplasias benignas e malignas (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992b; PINDBORG; KRAMER, 1971).

Na segunda classificação da OMS, Kramer et al. (1992a) subdividiram a categoria das neoplasias benignas em três grupos de acordo com os tipos de tecido odontogênicos envolvidos: **tumores do epitélio odontogênico sem ectomesênquima odontogênico; tumores do epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem a formação de tecidos dentais duros e tumores do ectomesênquima odontogênico com ou sem a inclusão do epitélio odontogênico** (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a). Embora os **tumores do ectomesênquima odontogênico** possam apresentar epitélio odontogênico, este não parece ser essencial na sua patogênese (WALDRON, 2004).

Em 2005, na recente classificação dos tumores odontogênicos divulgada pela OMS, a classificação anteriormente citada foi consolidada (Quadro 2.1) e os tumores odontogênicos foram definidos como

grupo de doenças heterogêneas que variam desde proliferações teciduais hamartomatosas ou não-neoplásicas até neoplasias benignas e malignas com potencial metastático. São derivados dos elementos epiteliais e/ou ectomesenquimais do aparato de formação dos dentes. Os tumores odontogênicos são raros, alguns extremamente raros, mas podem representar um significativo desafio diagnóstico e terapêutico (BARNES et al., 2005).

1. TUMORES MALIGNOS
1.1. Carcinomas odontogênicos
1.1.1. Ameloblastoma metastatizante (maligno)
1.1.2. Carcinoma ameloblástico – tipo primário
1.1.3. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (desdiferenciado), intra-ósseo
1.1.4. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (desdiferenciado), periférico
1.1.5. Carcinoma epidermóide intra-ósseo primário – tipo sólido
1.1.6. Carcinoma epidermóide intra-ósseo primário derivado do tumor odontogênico queratocístico
1.1.7. Carcinoma epidermóide intra-ósseo primário derivado dos cistos odontogênicos
1.1.8. Carcinoma odontogênico de células claras
1.1.9. Carcinoma odontogênico de células fantasmas
1.2. Sarcomas odontogênicos
1.2.1. Fibrossarcoma ameloblástico
1.2.2. Fibrodentino- e fibro-odontossarcoma ameloblástico
2. TUMORES BENIGNOS
2.1. Tumores de epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro sem ectomesênquima odontogênico
2.1.1. Ameloblastoma, tipo sólido / multicístico
2.1.2. Ameloblastoma, tipo extra-ósseo / periférico
2.1.3. Ameloblastoma, tipo desmoplásico
2.1.4. Ameloblastoma, tipo unicístico

continua

Quadro 2.1- Classificação dos tumores odontogênicos segundo a OMS (2005).

conclusão

2.1.5. Tumor odontogênico escamoso
2.1.6. Tumor odontogênico epitelial calcificante
2.1.7. Tumor odontogênico adenomatóide
2.1.8. Tumor odontogênico queratocístico
2.2. Tumores de epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido duro
2.2.1. Fibroma ameloblástico
2.2.2. Fibrodentinoma ameloblástico
2.2.3. Fibro-odontoma ameloblástico
2.2.4. Odontoma <ul style="list-style-type: none"> 2.2.4.1. Odontoma, tipo complexo 2.2.4.2. Odontoma, tipo composto
2.2.5. Odontoameloblastoma
2.2.6. Tumor odontogênico calcificante cístico
2.2.7. Tumor dentinogênico de células fantasmas
2.3. Tumores de mesênquima e/ou ectomesênquima odontogênico, com ou sem epitélio odontogênico
2.3.1. Fibroma odontogênico
2.3.2. Mixoma / mixofibroma odontogênico
2.3.2. Cementoblastoma

Quadro 2.1- Classificação dos tumores odontogênicos segundo a OMS (2005)

Dentro do grupo dos tumores odontogênicos este estudo dedica especial atenção à distribuição dos componentes não colágenos da MEC no ameloblastoma e tumor odontogênico calcificante cístico.

2.1.1 Ameloblastoma

A classificação da OMS de 1971 definiu o ameloblastoma como uma “neoplasia benigna, mas localmente invasiva consistindo da proliferação de epitélio odontogênico em meio a um estroma fibroso” (PINDBORG; KRAMER, 1971). Já a classificação de 1992 mostrou a seguinte definição

Uma neoplasia polimórfica benigna, mas localmente invasiva consistindo da proliferação de epitélio odontogênico, que usualmente tem um padrão folicular ou plexiforme, em meio a um estroma fibroso (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a).

A última classificação (2005) não mostra grandes mudanças na definição do ameloblastoma

O ameloblastoma sólido/multicístico é um tumor odontogênico epitelial dos ossos maxilares de crescimento lento, localmente invasivo com uma alta taxa de recorrência se não removido adequadamente, mas com virtualmente nenhuma tendência a metastatizar (GARDNER et al., 2005).

Podemos observar que o potencial de invasividade local, traço marcante do comportamento do ameloblastoma, já havia sido estabelecido desde a primeira classificação, embora ainda hoje permaneçam muitas dúvidas sobre os mecanismos exatos que propiciam esse potencial.

O ameloblastoma é o segundo tumor odontogênico mais comum dos ossos maxilares (GARDNER et al., 2005), e sua frequência relativa se iguala à de todos os outros tumores odontogênicos juntos, excluindo os odontomas (WALDRON, 2004). Constitui aproximadamente 1% de todos os cistos e tumores maxilares (SMALL; WALDRON, 1955) e representa cerca de 0,7% de todas as lesões de boca encaminhadas ao Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP (ARAÚJO; ARAÚJO, 1984). Não apresenta predileção por sexo, acometendo igualmente homens e mulheres, e a maioria dos casos é diagnosticada entre 30 e 60 anos de idade (GARDNER, 1984; GARDNER et al., 2005). Diferenças geográficas e raciais têm sido descritas (GARDNER et al., 2005).

O ameloblastoma origina-se de remanescentes do epitélio odontogênico, principalmente da lâmina dentária e do epitélio reduzido do órgão do esmalte (WALDRON, 2004), e sua causa é desconhecida. Desregulação de vários genes no desenvolvimento normal do dente podem exercer um papel importante na sua histogênese (GARDNER et al., 2005). Ocorre exclusivamente nos ossos maxilares, tendo predileção por regiões posteriores de mandíbula (GARDNER et al., 2005). Clinicamente está associado com expansão de tamanho variável do osso cortical, normalmente assintomática, podendo perfurar as paredes ósseas e invadir tecidos moles (BATAINEH, 2000). Acontece em três situações clínicas diferentes: sólido (86%), unicístico (13%) e periférico (1%) (GARDNER, 1984). Por representar a maioria dos casos, o ameloblastoma sólido é o foco deste estudo.

Radiograficamente, o ameloblastoma pode mostrar variação considerável. O quadro típico é uma destruição multilocular do osso, lembrando o aspecto de bolhas de sabão ou favo de mel e apresentando margens festonadas, mas ameloblastomas uniloculares podem acontecer (GARDNER et al., 2005; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a; WALDRON, 2004). É comum tanto a reabsorção das raízes de dentes adjacentes à lesão, quanto a associação de dentes inclusos à mesma (GARDNER et al., 2005; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a; WALDRON, 2004).

Os padrões histológicos mais comuns entre os ameloblastomas sólidos são: o padrão folicular, o padrão acantomatoso e o padrão plexiforme (WALDRON, 2004) e sua diferenciação histopatológica não apresenta relevância clínica (GARDNER et al., 2005). O padrão folicular é o mais comum e conhecido e, do ponto de vista histopatológico, apresenta ilhas de epitélio odontogênico que lembram o epitélio do órgão do esmalte, em um estroma de tecido conjuntivo denso maduro (CHEN et al., 1998b; GARDNER et al., 2005; SALO et al., 1999). As ilhas de epitélio consistem em

um centro composto de células arranjadas frouxamente, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte, circundadas por uma camada única de células colunares alongadas, com núcleos hipercromáticos localizados em oposição à membrana basal e distribuídas em forma de paliçada, a semelhança de pré-ameloblastos ou ameloblastos (CHEN et al., 1998b; GARDNER et al., 2005; SALO et al., 1999). Em outras áreas, as células periféricas podem ser mais cubóides e lembrar células basais. A formação cística é comum e pode variar de microcistos – que se formam nas ilhas epiteliais – a grandes cistos macroscópicos, que podem variar de alguns a muitos milímetros em diâmetro (WALDRON, 2004).

O padrão acantomatoso é caracterizado pela presença de áreas de metaplasia escamosa, muitas vezes associada com a formação de queratina, nas porções centrais das ilhas epiteliais de um ameloblastoma folicular (SHAFER et al., 1987).

O padrão plexiforme consiste em longos cordões ou placas de epitélio odontogênico anastomosados. Os cordões ou placas são circundados por células colunares ou cúbicas semelhantes a ameloblastos, envolvendo células epiteliais arranjadas frouxamente semelhantes às do retículo estrelado. O estroma de sustentação é usualmente delicado (GARDNER et al., 2005). A formação cística é rara nessa variedade (SHAFER et al., 1987).

Circundado as ilhas e cordões epiteliais pode haver áreas de hialinização do tecido conjuntivo, compostas por substâncias amorfas, que segundo Chen et al. (1998a) são produtos do epitélio odontogênico.

Como enfatizado anteriormente, a principal preocupação que o ameloblastoma impõe ao cirurgião dentista é seu potencial de invasividade local. As

células neoplásicas disseminam-se vagarosamente infiltrando os espaços medulares e podem também causar erosão do osso cortical (GARDNER, 1984; GARDNER et al., 2005). Os mecanismos pelo qual essa invasão acontece, bem como o papel dos componentes da MEC neste mecanismo, ainda não foi totalmente elucidado.

2.1.2 Tumor odontogênico cístico calcificante (cisto de Gorlin)

A classificação da OMS de 1971 denominou o tumor odontogênico cístico calcificante de cisto odontogênico calcificante e o definia como

Uma lesão cística não neoplásica na qual o revestimento epitelial mostra uma camada basal de células colunares bem definida, camada superior freqüentemente espessa que lembra o retículo estrelado do órgão do esmalte e massas de células fantasmas, que podem estar no revestimento epitelial ou na cápsula fibrosa. As células fantasmas podem calcificar. Dentina displásica pode ser encontrada perto da camada basal do epitélio (PINDBORG; KRAMER, 1971).

A segunda classificação da OMS (1992) além de manter a denominação de cisto odontogênico calcificante trouxe uma definição bastante semelhante, diferindo somente na omissão da expressão “não-neoplásica”, ou seja, admitindo o caráter neoplásico dessa entidade, e complementada com a seguinte frase: “em algumas instâncias o cisto é associado com uma área de extensa formação de tecido dental duro lembrando um odontoma complexo ou composto” (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a).

Praetórius e Ledesma-Montes (2005), na recente classificação da OMS, modificaram com muita propriedade sua denominação para tumor odontogênico cístico calcificante e definiram-no como: “Neoplasia cística benigna de origem

odontogênica, caracterizada por um epitélio semelhante ao ameloblastoma com células fantasmas que podem calcificar”.

Comparando-se as classificações podemos observar que apesar da primeira classificação já mostrar essa lesão no grupo dos tumores odontogênicos, sua natureza neoplásica foi realmente reconhecida a partir da classificação de 1992 onde o mesmo, com todas as suas variantes, foi colocado no grupo dos tumores de epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com formação de tecido duro (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a), grupo onde permanece na classificação de 2005 (BARNES et al., 2005).

Primeiramente descrito por Gorlin et al. (1962), o tumor odontogênico cístico calcificante é uma lesão incomum, representando apenas 1% dos cistos dos maxilares, e por possuir comportamento clínico variável e grande diversidade histopatológica, anteriormente à classificação da OMS de 2005, era considerada uma lesão que ocupava um espaço entre os cistos e as neoplasias (AITHAL et al., 2003; SHEAR, 1994; WALDRON, 2004). Realmente alguns casos do tumor odontogênico calcificante cístico pareciam ser cistos não neoplásicos devido a seu comportamento pouco agressivo; porém outros casos não apresentavam características císticas, podendo ser infiltrativos ou até malignos, sendo considerados como neoplasias e recentemente classificados pela OMS (2005) como tumor odontogênico de células fantasmas (PRAETÓRIUS; LEDESMA-MONTES, 2005).

As origens prováveis do tumor odontogênico cístico calcificante são os remanescentes da lâmina dentária, remanescentes da bainha epitelial de Hertwig e epitélio reduzido do órgão do esmalte (PRAETÓRIUS et al., 1981). Clinicamente apresenta-se predominantemente como lesão intra-óssea expansiva, sendo apenas

13 a 21% extra-ósseas (periféricos), distribuindo-se igualmente pela mandíbula e maxila, principalmente em região de incisivos e caninos (65%) e sem predileção por sexo (ARAÚJO; ARAÚJO, 1984; PRAETÓRIUS; LEDESMA-MONTES, 2005). Manifesta-se como aumento de volume assintomático, atingindo desde a infância até idades avançadas (média 33 anos) (JOHNSON 3rd et al., 1997; WALDRON, 2004).

Radiograficamente caracteriza-se como lesão radiolúcida unilocular com limites definidos, muitas vezes apresentando estruturas radiopacas (irregulares ou semelhantes a dentes) (ARAÚJO; ARAÚJO, 1984; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a; WALDRON, 2004). Em 1/3 dos casos está associado a dente incluso (principalmente os caninos), podendo também causar reabsorção radicular ou divergência de raízes (PRAETÓRIUS; LEDESMA-MONTES, 2005; WALDRON, 2004).

O aspecto histológico mostra um cisto bem definido, com uma cápsula fibrosa composta por ectomesênquima odontogênico apresentando revestimento epitelial delgado, constituído de 4 a 10 camadas de células. As células basais do revestimento epitelial podem ser cúbicas ou colunares, e são semelhantes a ameloblastos. As células das camadas superiores apresentam arranjos mais frouxos, lembrando as células centrais das ilhotas do ameloblastoma folicular (WALDRON, 2004) esse revestimento epitelial é chamado também de epitélio ameloblastomatoso (PRAETÓRIUS; LEDESMA-MONTES, 2005). Além disso, observam-se as células fantasmas no componente epitelial, células epiteliais alteradas, claras e aumentadas, com perda do núcleo e preservação do contorno citoplasmático (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992a; WALDRON, 2004).

A natureza da alteração das células fantasmas é discutida. Alguns autores acreditam que ela ocorra por necrose de coagulação; outros afirmam que é uma

forma de queratinização normal ou aberrante do epitélio odontogênico (WALDRON, 2004). Takada et al. (2000) relatam a presença de proteínas do esmalte nas células fantasmas, e sugeriram que o acúmulo de proteínas do esmalte pode ser um dos fatores que colaboram para a formação das células fantasmas, ou seja, levanta a hipótese que essas células não estejam somente envolvidas em um processo degenerativo, mas também numa eventual formação de matriz de esmalte.

Massas de células fantasmas podem se fundir e formar extenso material acelular amorfo (WALDRON, 2004). Segundo Praetórius e Ledesma-Montes (2005) proliferação do epitélio odontogênico no tecido conjuntivo e dentina displásica em regiões adjacentes ao epitélio podem ser observados.

As células fantasmas apresentam afinidade por cálcio e sua calcificação é um achado comum. Os focos de calcificação inicialmente aparecem como grânulos basófilos dentro das células fantasmas que podem aumentar em número e tamanho, formando extensas áreas de material calcificado (PRAETÓRIUS et al., 1981; WALDRON, 2004). Acredita-se que a presença da dentina displásica em meio ao tecido conjuntivo possa ser resultado de um efeito indutivo do epitélio odontogênico sobre o tecido mesenquimal adjacente (WALDRON, 2004). Na cápsula cística podem também estar presentes focos de calcificação distrófica, ilhotas de epitélio odontogênico, cristais de colesterol e por vezes pigmento melânico (ARAÚJO; ARAÚJO, 1984), além de células gigantes multinucleadas.

2.2 Componentes não colágenos da MEC

2.2.1 Proteoglicanos (PGs)

Os PGs são um grupo de componentes da MEC (HALL; EMBERY, 1997) encontrados no espaço extracelular, na superfície celular ou em grânulos citoplasmáticos. A superfamília dos PGs abrange mais de 30 moléculas que executam diversas funções biológicas (IOZZO, 1998). Estruturalmente são macromoléculas complexas, constituídas de um eixo central protéico ao qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) se ligam covalentemente e encontram-se distribuídas na MEC de tecidos mineralizados e não mineralizados (HALL; EMBERY, 1997). A densidade, tamanho e carga dos PGs estão relacionados à manutenção e regulação das funções teciduais (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003).

Os PGs são classificados com base no seu tamanho e nas características do seu eixo central protéico. Neste estudo dedica-se especial atenção ao grupo dos pequenos PGs ricos em leucina (SLRPs, do inglês: small leucine rich proteoglycans), composto por quatro membros principais: decorin, biglican, fibromodulin e lumican. Diversos estudos sugerem que a maioria dos PGs presentes nos dentes sejam os SLRPs biglican e decorin (WADDINGTON et al., 2003). Além disso, lumican e fibromodulin são componentes importantes das matrizes pré-dentinária e dentinária (GOLDBERG et al., 2003).

Os SLRPs compartilham de algumas características comuns como abundante número de moléculas de leucina em seu eixo central protéico, que confere a maioria das suas funções biológicas (HALL; EMBERY, 1997).

Estima-se que a presença dos SLRPs no tecido conjuntivo limita o crescimento das fibras colágenas em diâmetro e influencia sua interação com outros

componentes da matriz, participando não somente da construção da MEC, mas também do controle da proliferação celular e morfogênese tecidual (SCOTT, 1988). Os SLRPs têm sido identificados interagindo com colágenos do tipo I, II, e IV, fibronectina e TGF- β (SCHONHERR et al., 1995). A seguir os principais proteoglicanos presentes nos tecidos dentais serão analisados separadamente.

2.2.1.1 biglican

O biglican, um PG de 40 kDa, tem papel sugerido nos processos de diferenciação, provavelmente pela interação com TGF- β , fixação e proliferação celular, eventos que ocorrem durante o desenvolvimento dental (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Além disso, exerce papel importante durante o processo de diferenciação de odontoblastos e ameloblastos e formação do esmalte em camundongos (MATSUURA et al., 2001). Em tecidos humanos em desenvolvimento o biglican é associado com tipos celulares mais especializados (BIANCO et al., 1990) e encontra-se localizado na região da MEC próxima as células (ZANOTTI et al., 2005).

Numerosas funções do biglican tem sido documentadas, incluindo interações proteína-proteína, adesão celular, transdução de sinais, reparo de DNA e processamento do RNA (ZANOTTI et al., 2005). Tenório, Santos e Zorn (2003) sugerem também um papel estrutural para o biglican devido à sua interação com as fibras colágenas, principalmente as fibras do tipo I e VI (ZANOTTI et al., 2005), e conseqüente expressão na pré-dentina.

Segundo Goldberg et al. (2002) o biglican exerce papel de regulador da organização da MEC e parece também ser um regulador da mineralização, uma vez que o aumento da sua concentração facilita a iniciação da formação de hidroxiapatita, enquanto a diminuição inibe o crescimento dos cristais de hidroxiapatita em sistema de gel de gelatina (BOSKEY et al., 1997). Estudos em ratos *null* para o gene do biglican levam a um fenótipo que simula a osteoporose (MATSUURA et al., 2001) com falha no crescimento e formação reduzida de osso (ZANOTTI et al., 2005).

Segundo Matsuura et al. (2001) estudos de hibridização *in situ* em camundongos recém-nascidos revelaram a intensa expressão do RNAm do biglican nos ameloblastos pré-secretores e discreta expressão nos odontoblastos secretores. *In vivo* o biglican inibiu o crescimento de células de câncer pancreático (VUILLERMOZ et al., 2004). Também foi verificado o gene do biglican superexpresso em carcinomas originados de glândulas salivares sugerindo um eventual papel na supressão tumoral (LEIVO et al., 2005). Zhao et al. (1999), observaram através da imunoistoquímica, presença focal de biglican na MEC de mixomas odontogênicos.

2.2.1.2 decorin

O decorin, um PG de 40 kDa, é preferencialmente localizado, durante o desenvolvimento humano, em tecidos ricos em colágeno fibrilar (BIANCO et al., 1990), principalmente no “corpo” da MEC (ZANOTTI et al., 2005), e provavelmente

está envolvido na formação da dentina (MATSUURA et al., 2001). Numerosas funções do decorin têm sido documentadas, incluindo interações proteína-proteína, adesão celular, transdução de sinais, reparo de DNA e processamento do RNA (ZANOTTI et al., 2005).

O decorin liga-se com colágenos tipo I, II, III e IV (ZANOTTI et al., 2005). Essa ligação ocorre através do seu eixo central protéico, uma propriedade estrutural que pode contribuir para a reunião e agregação do colágeno bem como vários outros componentes da MEC (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003).

O decorin é sintetizado por odontoblastos e secretado para o meio ambiente pericelular. Pode estar envolvido na formação da dentina via associação específica com fibras de colágeno tipo I, demonstrando papel na construção e crescimento das fibras (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Estudos com ratos *null* para o gene do decorin resultaram em fragilidade na pele devido à morfologia anormal das fibras de colágeno (MATSUURA et al., 2001).

Estudos sugerem que o decorin tenha papel inibitório na mineralização, devido a três razões: primeiro, o decorin liga-se especificamente aos sítios de mineralização do colágeno, bloqueando a sua interação com as moléculas que iniciam a mineralização, regulando então o padrão de mineralização do colágeno (EMBERY et al., 2001); segundo, a ausência de decorin ligado aos sítios de mineralização do colágeno na matriz óssea; e terceiro, sua presença em tecidos não mineralizados (YOSHIBA et al., 1996).

Segundo Matsuura et al. (2001) estudos de hibridização *in situ* em camundongos recém-nascidos revelaram a intensa expressão do RNAm do decorin em odontoblastos e fraca em ameloblastos pré-secretores. *In vivo* o decorin mostrou inibir o crescimento de diferentes neoplasias implantadas em ratos *nude*

(VUILLERMOZ et al., 2004). Zhao et al. (1999), observaram através da imunoistoquímica, presença focal de decorin na MEC de mixomas odontogênicos.

Interesse especial tem sido dedicado ao decorin devido a sua habilidade recentemente descrita de inibir o crescimento tumoral (KÖNINGER et al., 2004a). Embora a maioria das células dos carcinomas não produza decorin, a expressão ectópica desse PG leva a uma inibição do crescimento de células do câncer de colo de útero, câncer de ovário e glioma, mas o mecanismo dessa inibição ainda não foi totalmente elucidado (KÖNINGER et al., 2004a). Portanto é proposto que o decorin seja um supressor tumoral que é inativado nas células cancerígenas durante a transformação maligna, e a superexpressão desse gene na MEC dos tumores, provavelmente por miofibroblastos, possa representar uma resposta do hospedeiro a invasão das células tumorais na tentativa de prevenir a difusão do tumor (KÖNINGER et al., 2004a).

2.2.1.3 fibromodulin

O fibromodulin é um PG de 42 kDa associado à fibrillogênese do colágeno (PROVENZANO et al., 2005), inibindo a formação de fibras *in vitro*. Acredita-se que exerça essa função pela regulação do espaçamento e espessura das fibras colágenas. Esse PG é predominantemente produzido por fibroblastos e condrócitos, sendo detectável na maioria dos tecidos conjuntivos (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003).

O fibromodulin também pode inibir a mineralização na interface entre tecidos duros e moles (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003). Além disso, interage com TGF-

β , auxiliando na retenção deste fator de crescimento nos tecidos, funcionando como um reservatório para TGF- β dentro da MEC (QIAN; XIAO; BARTOLD, 2004).

Camundongos com ausência de fibromodulin mostram fibras colágenas irregulares e com um diâmetro mais fino que o normal, sugerindo um papel do fibromodulin na regulação da maturação das fibras colágenas (SVENSSON; NÄRLID; OLDBERG, 2000).

O fibromodulin já foi observado no ligamento periodontal e cimento de dentes humanos saudáveis e envolvidos em patologias periodontais (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003).

2.2.2 Glicoproteínas

O grupo das glicoproteínas é composto por proteínas presentes no tecido mineralizado, principalmente osteonectina (ONC), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCC). As proteínas BSP e OCC são, em essência, exclusivas dos tecidos mineralizados, enquanto a osteonectina e a osteopontina têm uma distribuição mais ampla (SODEK; MCKEE, 2000).

2.2.2.1 *osteonectina*

A osteonectina (ONC) é uma glicoproteína fosforilada de 32 – 46 kDa cujas funções são sensivelmente afetadas pela presença ou ausência de fosfato (BOSKEY, 1998; MARTINEZ; ARAÚJO, 2004; TERMINE et al., 1981).

A ONC tem sido associada à regulação da progressão da célula através do ciclo celular, forma e interações celulares, ligação a íons metais e fatores de crescimento, além da modulação de atividades enzimáticas (LANE; SAGE, 1994). Exerce papel importante na adesão entre as fibras colágenas e a hidroxiapatita, já que exibe alta afinidade por ambas as estruturas e pode ligar-se a elas simultaneamente e seletivamente, utilizando dois domínios distintos (TERMINE et al., 1981) promovendo assim a deposição do fosfato de cálcio mineral no colágeno tipo I (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004). Assim, estipula-se que a ONC possa exercer um papel na mineralização do osso *in vivo* (INGRAM et al., 1993; ROBEY, 1996).

A ONC é o constituinte mais abundante da porção orgânica não colágena do osso (BOSKEY, 1998; TERMINE et al., 1981). Além disso, pode ser detectada em condrócitos e odontoblastos (SOMMER et al., 1996). Na matriz dentinária apresenta níveis de expressão tão altos quanto no osso (SOMMER et al., 1996).

2.2.2.2 osteopontina

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada e sulfatada de 41,5 kDa (SASANO et al., 2000) que pertence à família de proteínas chamada SIBLING (do inglês: Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) (FISHER; FEDARKO, 2003) e cujas funções em tecidos mineralizados e não-mineralizados são

sensivelmente afetadas pela presença ou ausência de fosfato, bem como pela extensão de fosforilação (BOSKEY, 1998). Dentro de sua seqüência primária, a OPN tem uma seqüência de adesão celular RGD que se liga a integrina $\alpha V\beta 3$, expressa em abundância na superfície dos osteoclastos, levando a adesão dos mesmos à superfície óssea e conseqüente ativação do mecanismo de reabsorção (COGAN et al., 2004; FACCIO et al., 2002), além de domínios de adesão com a hidroxiapatita (IBRAHIM et al., 2000; MURAMATSU et al., 2005).

A OPN é uma proteína multifuncional e está envolvida em diversos eventos biológicos que incluem os processos de desenvolvimento e sobrevivência celular, resposta imunológica, tumorigênese (OHMA; TAKAGI; TAKANO, 2000; MURAMATSU et al., 2005), cicatrização e inibição da mineralização em tecidos moles (SOMMER et al., 1996), agindo sobre as células e regulando sua proliferação, migração, diferenciação e ativação (COWLES et al., 1998; MURAMATSU et al., 2005). Possui papel essencial na mineralização, participando do desenvolvimento e remodelação óssea (MURAMATSU et al., 2005), uma vez que se liga fortemente a hidroxiapatita e pode regular a deposição de fosfato de cálcio, ora funcionando como limitante físico e assim inibindo a deposição, ora participando como nucleador e promovendo a formação e o crescimento do cristal (BOSKEY, 1998). Sua função exata na dentinogênese é desconhecida (OHMA; TAKAGI; TAKANO, 2000). Além disso, apresenta uma seqüência de ligação idêntica à da fibronectina, sendo também considerada um fator de adesão celular (AUBIN, 1998).

A OPN é produzida por diferentes tipos celulares (SASANO et al., 2000), sendo encontrada, além do osso, em vários outros tecidos e neoplasias, inclusive em odontoblastos, pré-dentina, dentina, cementoblastos e cimento, além de células do epitélio interno do órgão do esmalte (BOSSHARDT et al., 1998). Matsuzaka et al.

(2001) relataram presença imunoistoquímica da OPN nas células epiteliais e no componente mesenquimal do fibro-odontoma ameloblástico.

O possível mecanismo pelo qual a OPN pode influenciar na tumorigênese inclui adesão célula-matriz, quimiotaxia, e proteção das células tumorais contra a citotoxicidade do óxido nítrico. Estudos recentes têm mostrado também que a OPN pode inibir a apoptose (IBRAHIM et al., 2000). Além disso, a OPN interage com o VEGF (do inglês: vascular endothelial growth factor), que é uma potente proteína angiogênica. A OPN induz a migração da célula endotelial e estimula a migração endotelial induzida pelo VEGF, que é sabido estar envolvida na angiogênese tumoral (SULZBACHER et al., 2002). Essas recentes descobertas sugerem uma correlação da expressão/função da OPN com a malignidade e as metástases. Além disso, sugere-se que a OPN possa ser um candidato a marcador biológico para malignidade (MURAMATSU et al., 2005).

2.2.2.3 sialoproteína óssea

A BSP é uma glicoproteína ácida fosforilada e sulfatada de 75 kDa que tem alta afinidade pela hidroxiapatita (AUBIN, 1998) e pertence, juntamente com a osteopontina, à família de proteínas chamada SIBLING (do inglês: Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) (FISHER; FEDARKO, 2003). É o componente mais abundante da matriz mineralizada do osso e outros tecidos mineralizados (COGAN et al., 2004). Está comprovado que a BSP é específica de tecidos

mineralizados, sendo sintetizada e secretada por osteoblastos, odontoblastos e cementoblastos (CHEN et al., 1998b).

A BSP está associada a mineralização, tanto patológica quanto de tecidos esqueléticos, através da sua propriedade de ligar-se com alta afinidade a hidroxiapatita, ao colágeno e receptores da superfície celular (GANSS; KIM; SODEK, 1999). Dentro de sua seqüência primaria, a BSP tem seqüências de poliglutamato que mediam a ligação aos cristais de hidroxiapatita e uma seqüência de adesão celular RGD que liga-se a integrina $\alpha V\beta 3$, expressa em abundancia na superfície dos osteoclastos, levando a adesão dos mesmo à superfície óssea e conseqüente ativação do mecanismo de reabsorção (COGAN et al., 2004; FACCIO et al., 2002).

Apresenta as propriedades físicas e químicas de um nucleador de hidroxiapatita, graças à sua capacidade de inibir ou nuclear e mediar o crescimento do cristal de hidroxiapatita (GANSS; KIM; SODEK, 1999; ROBEY, 1996). Essa habilidade da BSP para nuclear a formação do cristal de hidroxiapatita *in vitro*, juntamente com sua expressão têmporo-espacial, correlacionada com a formação inicial do mineral nos ossos e tecidos dentais, é sugestivo de um papel essencial da BSP na iniciação da mineralização dos tecido *in vivo* (COGAN et al., 2004). Além disso, durante a formação óssea a BSP interage com a as células endoteliais, estimulando a angiogênese e dando suporte ao processo de invasão vascular (GANSS; KIM; SODEK, 1999).

Estudos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica demonstraram que a BSP está expressa nas células epiteliais formadoras de esmalte durante o desenvolvimento dentário de ratos, sugerindo um papel na amelogênese e mineralização (CHEN et al., 1998a). Entretanto sua positividade em cartilagem

mineralizada, dentina e esmalte é menor que a encontrada em osso e cimento recém-formados (GANSS; KIM; SODEK, 1999).

Chen et al. (1998b), através de estudos de hibridização *in situ* e imunoistoquímica, mostraram a expressão, em um nível relativamente alto, da BSP nas células epiteliais de tumores odontogênicos com e sem componente calcificado. Além disso, as células epiteliais de ameloblastomas também expressam a BSP, indicando um possível papel para a BSP na tumorigênese (CHEN et al., 1998b). A expressão de BSP em ameloblastomas pode estar relacionada ao seu potencial de invasão, facilitando a infiltração de células tumorais no osso circundante (CHEN et al., 1998b).

A BSP tem sido também associada à formação de cristais minerais em várias patologias, principalmente no carcinoma de mama, onde está também associada à ocorrência de metástases ósseas e a um pior prognóstico (GANSS; KIM; SODEK, 1999). A expressão de BSP também tem sido correlacionada com metástases ósseas em cânceres de pulmão e próstata (COGAN et al., 2004). Sabe-se que facilita a Invasão e o crescimento metastático, por meio de estímulo a angiogênese e à atividade osteoclástica local, ou, ainda, promovendo proliferação e migração das células tumorais (GANSS; KIM; SODEK, 1999).

2.2.2.4 *osteocalcina*

A OCC, uma proteína de 5,8 kDa, é também chamada de proteína gla óssea, por conter resíduos de ácido glutâmico modificados, os quais conferem à proteína

uma alta afinidade por íons minerais como Ca^{2+} e por cristais de hidroxiapatita (DUCY; KARSENTY, 1996). Juntamente com a osteopontina e a sialoproteína óssea, parece desempenhar papel importante como marcador de células com potencial osteogênico e cementogênico (ZHOU et al., 1994). Além disso, segundo DUCY et al. (1996) *in vivo* a OCC é inibidora da formação óssea. De acordo com INGRAM et al. (1993) sua afinidade com a hidroxiapatita é suficiente para que atue como inibidor do crescimento do cristal de hidroxiapatita. Dessa forma, cumpre importante papel na regulação da maturação do cristal (BOSKEY, 1998) e na manutenção da própria matriz, sendo aparentemente desnecessária na fase inicial do processo de mineralização (SOMMER et al., 1996).

A OCC é um marcador fenotípico comum de odontoblastos, principalmente os que já depositaram camada de dentina, osteoblastos e cementoblastos (PAPAGERAKIS et al., 1999). Os autores afirmam que células epiteliais comprometidas com a diferenciação ameloblástica podem expressar marcadores de linhagens de osteoblastos e/ou cementoblastos em condições patológicas.

Matsuzaka et al. (2001) relatam imunopositividade para OCC em células epiteliais e mesenquimais do fibro-odontoma ameloblástico. Papagerakis et al. (1999) relatam imunopositividade para OCC e ONC em células epiteliais próximas aos focos de mineralização de tumores odontogênicos mistos. A OCC também foi detectada nas células colunares altas dos tumores odontogênicos mistos. A OCC não foi observada nos tumores odontogênicos epiteliais.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, tem-se como proposição:

1. Estudar, através da técnica imunoistoquímica, a distribuição dos componentes não colágenos da MEC dos tecidos dentais: biglican, decorin, fibromodulin, osteonectina, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina no ameloblastoma e no tumor odontogênico cístico calcificante.
2. Analisar, comparativamente, os padrões de expressão observados nas lesões, verificando se existem diferenças na expressão das proteínas supra citadas entre o ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o protocolo 172/04 (Anexo A).

4.1 Amostra de tecido

As amostras estudadas foram selecionadas do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo. Constituiu-se de vinte espécimes diagnosticados como ameloblastoma e classificados de acordo com seu quadro histológico, sendo sete do padrão folicular, quatro do padrão acantomatoso e nove do padrão plexiforme. Do tumor odontogênico cístico calcificante seis foram os espécimes estudados.

4.2 Técnica imunoistoquímica

Do material emblocado em parafina cortes de 3µm de espessura foram obtidos para o procedimento imunoistoquímico, sendo estendidos em lâminas de

vidro preparadas com solução de 3-aminopropyltriethoxysilene (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) a 10% em etanol absoluto. Amostras de rim, displasia fibrosa e fragmentos de tecido ósseo adjacentes às lesões foram utilizados como controle positivo. Substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA – bovin serum albumin) e soro fetal bovino em tampão tris(hidroximetil)aminometano-(Tris) foi utilizado como controle negativo.

Em seguida foram realizadas reações imunoistoquímicas contra os componentes não colágenos da MEC, utilizando os anticorpos policlonais desenvolvidos em coelho contra biglican humano (LF51), decorin humano (LF136), osteonectina humana (LF-37), osteopontina humana (LF-166), sialoproteína óssea humana (LF-100), osteocalcina bovina (LF-32 – faz reação cruzada com a ONC humana e pode ser utilizada para a imunomarcacão desta proteína) gentilmente cedidos pelo Dr Larry W. Fisher, Matrix Biochemistry Unit, Craniofacial and Skeletal Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, e o anticorpo contra fibromodulin humano (Santa Cruz Biotechnology[®], CA, USA). Os clones, titulação e temperatura de incubação dos anticorpos estudados, bem como o eventual tratamento enzimático realizado, estão indicados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Clone, título e tempo de incubação dos anticorpos primários e tratamento enzimático utilizado

Anticorpo	Clone	Título	Tempo de incubação	Tratamento enzimático
Decorin ^(a)	(policlonal)	1:750	40 min.	Condroitinase ABC, 37°C, 60 min.
Biglican ^(a)	(policlonal)	1:750	40 min.	Condroitinase ABC, 37°C, 60 min.
Fibromodulin ^(b)	(policlonal)	1:50	40 min.	-
Osteonectina ^(a)	(policlonal)	1:600	40 min.	-
Osteopontina ^(a)	(policlonal)	1:1000	40 min.	-
BSP ^(a)	(policlonal)	1:600	40 min.	-
Osteocalcina^(a)	(policlonal)	1:1000	40 min.	-

^(a) Larry W. Fischer, Matrix Biochemistry Unit/NIH, Bethesda, MD, USA.

^(b) Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA.

Foi seguido o protocolo para a técnica imunoistoquímica estabelecido pelo Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal na FOU SP:

1. Desparafinização em 2 banhos de xilol: (1) por 30 minutos à temperatura de 60°C; e (2) por 20 minutos à temperatura ambiente.
2. Reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto por 3 vezes, 95%, 85%) em banhos de 5 minutos cada, realizando, ao final, um banho de 10 minutos em hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% para a remoção de pigmentos formólicos, seguindo 10 minutos em água corrente e 5 minutos em água destilada.
3. Bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol na proporção de 1:1, em 2 banhos de 20 minutos cada.
4. Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos em água destilada.
5. Dois banhos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5 M, pH 7.4 para os espécimes que não passariam pelo tratamento com a enzima condroitinase e dois banhos em solução de tampão TRIS-HCL

(hidroximetil-amino-metano) a 20mM, pH 8,0 para os espécimes que passariam pelo tratamento com a enzima, cinco minutos cada imersão.

6. Tratamento enzimático com a enzima condroitinase ABC (Seikagaku[®], Japan) para a quebra da ligação dos proteoglicanos com os glicosaminoglicanos e permitir o acesso dos anticorpos aos epítomos, quando necessário (tabela 4.1). Para tanto, incubaram-se estas amostras em uma solução de tampão TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) 20mM (pH 8,0) contendo 0,2 U/mL de condroitinase ABC durante 1 hora a 37°C em câmara úmida.
7. Dois banhos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5 M, pH 7.4, cinco minutos cada imersão.
8. Incubação com soro suíno normal (Dako Corp.[®], Carpinteria, CA), em câmara úmida, por 60 minutos, para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, seguida por três banhos em TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) a 0,5mM, pH 7.4, por 5 minutos cada imersão.

Após estas etapas, todos os cortes seguiram para o equipamento DAKO Autostainer Universal Staining System (DAKO Corp.[®], Carpinteria, CA, USA), onde se concluiu a reação com o seguinte protocolo:

1. Incubação dos anticorpos primários sob temperatura controlada a 37°C.
2. Incubação com o complexo terciário estreptavidina-biotina (Kit LSAB Peroxidase K0690 – Dako Corp.[®], Carpinteria, CA, USA).
3. Revelação da reação com DAKO Liquid DAB plus (cód. K3468) (Dako Corp.[®], Carpinteria, CA, USA).
4. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

Entre cada uma das reações realizadas automaticamente, os cortes foram lavados duas vezes em TBST.

A seguir, todos os cortes foram desidratados numa série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 3 vezes em álcool absoluto) por 5 minutos cada e em seguida, diafanizados em xilol, seguindo para montagem em resina Permout (Fisher Scientific[®], New Jersey, NY, USA).

4.3 Método de análise do material

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz por dois observadores calibrados, para identificar a presença ou ausência de marcação para cada proteína e seu padrão de expressão nos fragmentos de tumores odontogênicos.

A imunorreatividade foi determinada nas células epiteliais neoplásicas de ambas lesões, no tecido conjuntivo adjacente às áreas de epitélio odontogênico do ameloblastoma, e no ectomesênquima neoplásico e focos de calcificação no tumor odontogênico cístico calcificante. As marcações foram consideradas negativas (-), fracamente positivas (+), positivas (++) ou fortemente positivas (+++) de acordo com a intensidade de impregnação da substância cromógena.

5 RESULTADOS

5.1 Ameloblastoma

Os espécimes do ameloblastoma utilizados para a análise foram criteriosamente selecionados, de forma a apresentar uniformidade em seus aspectos histopatológicos. Os padrões histológicos utilizados foram os padrões folicular, acantomatoso e plexiforme. O padrão folicular apresentava ilhas de epitélio odontogênico compostas por um centro formado de células arranjadas frouxamente circundadas por uma camada única de células colunares alongadas distribuídas em paliçada e apresentando núcleos hipercromáticos localizados em oposição à membrana basal (Figura 5.1-A). O padrão acantomatoso é caracterizado pela presença de áreas de metaplasia escamosa nas porções centrais das ilhas epiteliais do ameloblastoma folicular (Figura 5.1-B). O padrão plexiforme consiste em longos cordões ou placas de epitélio odontogênico anastomosados compostos por um centro formado de células arranjadas frouxamente circundadas por células colunares (Figura 5.1-C). O tecido conjuntivo que compõe o estroma do ameloblastoma exhibe áreas de hialinização, normalmente próximas ao epitélio neoplásico e aos vasos sanguíneos.

A imunorreatividade foi determinada nas células epiteliais neoplásicas da seguinte forma:

1. Células da camada basal (células periféricas)
2. Células centrais estrelárias

3. Células metaplásicas (ameloblastoma acantomatoso)

A imunorreatividade foi determinada no tecido conjuntivo que constitui o estroma da lesão da seguinte forma:

1. Áreas de hialinização adjacentes ao epitélio neoplásico
2. Tecido conjuntivo não hialinizado

Os resultados podem ser observados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelas proteínas estudadas no ameloblastoma

anticorpo		Biglican	Decorin	Fibromodulin	ONC	OPN	BSP	OCC
Parênquima	Células periféricas	-	-	-	+	-	-	-
	Células estrelárias	-	-	-	- + ^A	-	-	-
	Células metaplásicas	+	+	-	++	-	++	-
Estroma	Tecido conjuntivo	++	++	-	++ ^B	-	++	-
	Áreas de hialinização	+++	+++	+	+	-	++	+

- ausência de marcação

+ marcação fracamente positiva

++ marcação positiva

+++ marcação fortemente positiva

^A ameloblastoma plexiforme

^B marcação concentrada no citoplasma dos fibroblastos

5.1.1 Biglican

As células da camada basal e as células centrais estrelárias presentes no componente epitelial de todos os padrões histológicos do ameloblastoma apresentaram-se negativas para o anticorpo anti-biglican (Figura 5.1-D a F). Já as células metaplásicas presentes no padrão acantomatoso foram fracamente positivas (Figura 5.1 E).

O tecido conjuntivo que compõe o estroma da lesão apresentou expressão fortemente positiva nas áreas de hialinização e positiva nas áreas não hialinizadas (Figura 5.1-D a F).

5.1.2 Decorin

À semelhança da imunomarcação pelo anticorpo anti-biglican, as células epiteliais da camada basal e as células centrais estrelárias dos ameloblastomas apresentaram ausência de expressão da proteína decorin (Figura 5.1-G a I). Já as células metaplásicas presentes no padrão acantomatoso foram fracamente positivas (Figura 5.1-H).

No estroma da lesão observou-se expressão fortemente positiva nas áreas de hialinização e expressão positiva nas áreas de tecido conjuntivo não hialinizado (Figura 5.1-G a I).

5.1.3 Fibromodulin

Não foi observada imunoexpressão do PG fibromodulin no componente epitelial dos ameloblastomas estudados (Figura 5.1-J a L). O tecido conjuntivo apresentou-se negativo e as áreas de hialinização apresentaram marcação fracamente positiva (Figura 5.1-L).

Figura 5.1 – A a C – Aspectos histopatológicos do ameloblastoma: A – padrão folicular; B – padrão acantomatoso; C – padrão plexiforme; D a F – Expressão do biglican: D – Ameloblastoma folicular - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; E – Ameloblastoma acantomatoso - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio e discreta expressão nas células metaplásicas; F - Ameloblastoma plexiforme - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; G a I – Expressão do decorin: G – Ameloblastoma folicular - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; H - Ameloblastoma acantomatoso - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio e discreta expressão nas células metaplásicas; I - Ameloblastoma plexiforme - intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; J a L – Expressão do fibromodulin: J, K e L – discreta marcação apenas nas áreas de hialinização próximas ao epitélio.

5.1.4 Osteonectina

As células epiteliais da camada basal dos três padrões de ameloblastoma mostraram-se fracamente positivas para a proteína osteonectina (Figura 5.2-A).

As células estrelárias presentes nos ameloblastomas do padrão folicular e acantomatoso não exibiram a marcação para a osteonectina (Figura 5.2-A e B). Já as células estrelárias do ameloblastoma plexiforme exibiram fraca positividade (Figura 5.2-C). As células metaplásicas presentes no padrão acantomatoso apresentaram-se positivas para a osteonectina (Figura 5.2-B).

As áreas de hialinização presentes no estroma mostraram fraca positividade (Figuras 5.2-A a C). As áreas de tecido conjuntivo não hialinizado mostraram-se positivas, sendo que a marcação concentrava-se no citoplasma dos fibroblastos (Figuras 5.2-A a C).

5.1.5 Osteopontina

Foi observada negatividade imunoistoquímica para a osteopontina nas células epiteliais dos três padrões de ameloblastoma (Figura 5.2-D a F).

O tecido conjuntivo também se apresentou negativo, mesmo nas áreas de hialinização (Figura 5.2-D a F). Controles positivos internos, constituídos de

fragmentos de tecido ósseo adjacentes à lesão, mostraram positividade comprovando o funcionamento da reação.

5.1.6 Sialoproteína óssea

As células da camada basal e as células estrelárias presentes em todos os padrões de ameloblastomas não exibiram imunorreatividade para a BSP (Figura 5.2-G a I). Já as células metaplásicas presentes no padrão acantomatoso foram positivas (Figura 5.2-H).

O estroma da lesão apresentou expressão positiva nas áreas de hialinização e fracamente positiva nas áreas não hialinizadas (Figura 5.2-G a I).

5.1.7 Osteocalcina

Não se observou imunorreatividade para o anticorpo anti-osteocalcina nas células epiteliais dos ameloblastomas (Figura 5.2-J a L). O tecido conjuntivo que compõe o estroma da lesão também foi negativo para o anticorpo anti-osteocalcina, com exceção para as áreas de hialinização que se mostraram fracamente positivas (Figura 5.2-J).

Figura 5.2 - A a C – Expressão da ONC: A – Ameloblastoma folicular – marcação positiva nas células periféricas das ilhotas epiteliais, fibroblastos e áreas hialinizadas do estroma neoplásico; B – Ameloblastoma acantomatoso - marcação positiva nas células periféricas e metaplásicas das ilhotas epiteliais, fibroblastos e áreas hialinizadas do estroma neoplásico; C – Ameloblastoma plexiforme - marcação positiva nas células periféricas e estrelárias epiteliais, fibroblastos e áreas hialinizadas do estroma neoplásico; D a F – Expressão da OPN: D, E e F – ausência de expressão; G a I – Expressão da BSP: G – Ameloblastoma folicular – positividade uniforme no estroma neoplásico; H - Ameloblastoma acantomatoso - positividade uniforme no estroma neoplásico e nas células metaplásicas; I - Ameloblastoma plexiforme - positividade uniforme no estroma neoplásico; J a L – Expressão da OCC: J, K e L – discreta marcação apenas nas áreas de hialinização próximas ao epitélio.

5.2 Tumor odontogênico cístico calcificante

Os espécimes do tumor odontogênico cístico calcificante utilizados para a análise foram criteriosamente selecionados, de forma a apresentar uniformidade em seus aspectos histopatológicos, que se caracterizavam por representarem uma neoplasia cística bem definida, com uma cápsula de tecido conjuntivo denso exibindo áreas com notável acúmulo de substância não colágena (Figura 5.3-A), apresentando revestimento epitelial delgado, com células basais cúbicas ou colunares e células das camadas superiores (células estrelárias) arranjadas de forma frouxa, lembrando o epitélio do ameloblastoma. Em meio ao componente epitelial observavam-se as células fantasmas (Figura 5.3-A a C). Os focos de calcificação podiam ser vistos em meio às células epiteliais e em meio ao ectomesênquima neoplásico (Figura 5.3-A e B). Três espécimes apresentavam proliferação do epitélio odontogênico em direção ao tecido conjuntivo e dentina displásica em regiões adjacentes ao epitélio (Figura 5.3-C).

A imunorreatividade foi determinada nas células epiteliais neoplásicas da seguinte forma:

1. Células da camada basal
2. Células estrelárias
3. Células fantasmas
4. Células fantasmas em processo de calcificação (células fantasmas apresentando grânulos de material calcificado em seu citoplasma)

A imunorreatividade foi determinada no ectomesênquima neoplásico presente na lesão da seguinte forma:

1. Ectomesênquima neoplásico próximo ao revestimento epitelial
2. Ectomesênquima neoplásico distante do revestimento epitelial
3. Dentina displásica

Os focos de calcificação podiam ser vistos em ambas estruturas, por isso não foram agrupadas em nenhuma das divisões acima.

Os resultados podem ser observados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Perfil imunoistoquímico apresentado pelas proteínas estudadas no tumor odontogênico cístico calcificante

anticorpo		Biglican	Decorin	Fibromodulin	ONC	OPN	BSP	OCC
epitélio	Células da camada basal	-	-	-	++	-	-	-
	Células estrelárias	-	-	-	+	-	-	-
	Células fantasmas	+	+	+	++ +++	-	++	+
	Células fantasmas em processo de calcificação	+	++	+	++ +++	+	+++	+
Ectomesênquima neoplásico	Adjacente ao epitélio	++ +++ ^A	++ +++ ^A	- + ^A	++ +++ ^A	-	+ ++ ^A	+ -
	Distante do epitélio	+ ++ ^A	+ ++ ^A	- + ^A	+ +	-	+ ++	- -
	Dentina displásica	+++	++	+	++	-	++	-
ambos	Focos de calcificação	-	-	-	-	+++	-	-

- ausência de marcação

+ marcação fracamente positiva

++ marcação positiva

+++ marcação fortemente positiva

^A Áreas de hialinização do tecido conjuntivo

5.2.1 Biglican

As células da camada basal e as células estrelárias presentes no componente epitelial apresentaram-se negativas para o biglican (Figura 5.3-D a F). Já as células

fantasmas e as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram fraca imunorreatividade para essa proteína (Figura 5.3-D e E).

A imunorreatividade para o biglican no ectomesênquima neoplásico próximo ao revestimento epitelial variou de fracamente positivo a fortemente positivo, e no ectomesênquima neoplásico distante do revestimento epitelial variou de fracamente positivo a positivo, sendo a expressão imunoistoquímica sempre mais acentuada nas áreas de hialinização, onde se observa menor concentração de fibras colágenas e maior quantidade de componentes não colágenos (Figura 5.3-D).

Observou-se marcação fortemente positiva na dentina displásica (Figura 5.3-F) e ausência de marcação nos focos de calcificação presentes tanto no componente epitelial quanto no ectomesênquima (Figura 5.3-F detalhe).

5.2.2 Decorin

A imunoexpressão para o PG decorin não foi observada nas células basais e estelárias do revestimento epitelial (Figura 5.3-G e H), mas fraca positividade e positividade puderam ser observadas nas células fantasmas nas células fantasmas em processo de calcificação respectivamente (Figura 5.3-H).

O ectomesênquima neoplásico próximo ao revestimento epitelial exibiu imunorreatividade variando de positiva a fortemente positiva, sendo a expressão imunoistoquímica sempre mais acentuada nas áreas de hialinização e o ectomesênquima neoplásico distante do revestimento epitelial apresentou-se fracamente positivo (Figura 5.3-G e H).

Observou-se marcação positiva na dentina displásica (Figura 5.3-I) e marcação negativa nos focos de calcificação (Figura 5.3-I detalhe).

5.2.3 Fibromodulin

No componente epitelial a imunoexpressão do fibromodulin foi bastante semelhante à vista para o biglican e decorin, sendo negativa nas células basais e estelárias e fracamente positiva nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação (Figura 5.3-J a L).

Já o ectomesênquima, seja ele próximo ou distante do revestimento epitelial, foi predominantemente negativo, com áreas de hialinização exibindo fraca positividade ((Figura 5.3-J).

Observou-se marcação fracamente positiva na dentina displásica (Figura 5.3-L) e negativa nos focos de calcificação e nas células gigantes multinucleadas (Figura 5.3-L detalhe).

Figura 5.3 – A a C – Aspectos histopatológicos do tumor odontogênico cístico calcificante: A – epitélio neoplásico; B – epitélio neoplásico apresentando células basais em paliçada, células fantasmas e focos de calcificação; C – dentina displásica em área adjacente ao epitélio; D a F – Expressão do biglican: D – intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; E – positividade nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação; F – intensa positividade nas áreas de dentina displásica e negatividade nos focos de calcificação (detalhe); G a I – Expressão do decorin: G – intensa positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; H – positividade nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação; I – positividade nas áreas de dentina displásica e negatividade nos focos de calcificação (detalhe); J a L – Expressão do fibromodulin: J – discreta positividade nas áreas de hialinização adjacentes ao epitélio; K – discreta positividade nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação; L – discreta positividade nas áreas de dentina displásica e negatividade nos focos de calcificação (detalhe).

5.2.4 Osteonectina

As células da camada basal exibiram expressão positiva e as células estrelárias apresentaram-se fracamente positivas para a osteonectina (Figura 5.4-A a C). Já as células fantasmas e as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram-se variando entre positivas e fortemente positivas (Figura 5.4-A e B).

O ectomesênquima neoplásico próximo ao revestimento epitelial exibiu imunorreatividade variando de positiva a fortemente positiva, sendo a expressão imunoistoquímica mais acentuada nas áreas de hialinização, e o ectomesênquima neoplásico distante do revestimento epitelial apresentou-se fracamente positivo (Figura 5.4-B e C).

Observou-se marcação positiva na dentina displásica (Figura 5.4-C), e negativa nos focos de calcificação (Figura 5.4-C detalhe).

5.2.5 Osteopontina

As células da camada basal, as células estrelárias e as células fantasmas apresentaram-se negativas para a osteopontina (Figura 5.4-D a F). Já as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram fraca positividade para essa proteína (Figura 5.4-E).

O ectomesênquima, seja ele próximo ao revestimento epitelial ou distante do revestimento epitelial, e a dentina displásica foram negativos (Figura 5.4-F).

Observou-se marcação fortemente positiva nos focos de calcificação presentes tanto no componente epitelial quanto no ectomesênquima (Figura 5.4-F detalhe).

5.2.6 Sialoproteína óssea

Não se observou expressão imunoistoquímica da BSP nas células da camada basal e nas células estrelárias (Figura 5.4-G). As células fantasmas apresentaram marcação positiva e as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram marcação fortemente positiva para essa proteína (Figura 5.4-G e H).

A imunorreatividade para a sialoproteína óssea no ectomesênquima neoplásico variou de fracamente positivo a positivo nas proximidades do epitélio, e foi fracamente positiva nas áreas distantes (Figura 5.4-G).

Observou-se marcação positiva na dentina displásica (Figura 5.4-I) e ausência de marcação nos focos de calcificação presentes tanto no componente epitelial quanto no ectomesênquima (Figura 5.4-I detalhe).

5.2.7 Osteocalcina

As células da camada basal e as células estrelárias apresentaram-se negativas para a osteocalcina (Figura 5.4-J e K). As células fantasmas e as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram-se fracamente positivas e positivas respectivamente (Figura 5.4-K).

O ectomesênquima neoplásico próximo ao revestimento epitelial exibiu imunorreatividade fracamente positiva, e o ectomesênquima neoplásico distante do revestimento epitelial apresentou-se negativo (Figura 5.4-J). Observou-se marcação negativa na dentina displásica e nos focos de calcificação (Figura 5.4-K e L).

Figura 5.4 - A a C – Expressão da ONC: A e B - intensa positividade no componente epitelial e mesenquimal da lesão. C - positividade nas áreas de dentina displásica e negatividade nos focos de calcificação (detalhe); D a F – Expressão da OPN: D, E e F – expressão positiva restrita às células fantasmas em processo de calcificação e aos focos de calcificação; G a I – Expressão da BSP: G – positividade no estroma neoplásico acentuada nas áreas próximas ao epitélio; H - positividade nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação; I - positividade na dentina displásica e negatividade nos focos de calcificação (detalhe); J a L – Expressão da OCC: J – discreta positividade no estroma neoplásico acentuada nas áreas próximas ao epitélio; K - positividade nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação e negatividade nos focos de calcificação; L - negatividade na dentina displásica.

6 DISCUSSÃO

A MEC exerce papel nos processos biológicos de desenvolvimento, reparação tecidual e metástase por meio da regulação da proliferação, diferenciação, adesão e migração celular (BANERJEE et al., 2003). A expressão de suas moléculas é um processo altamente regulado de forma que mudanças na sua composição e concentração podem influenciar significativamente a expressão gênica, a diferenciação celular e conseqüentemente alterar a formação dos tecidos normais e neoplásicos.

As proteínas da MEC ganharam interesse recentemente devido a sua habilidade de criar uma “rede funcional” em tecidos e agirem como moduladores de processos patológicos complexos como fibrose e crescimento neoplásico (KÖNINGER et al., 2004b). Sabe-se que o crescimento neoplásico envolve alguns fatores estimulatórios e inibitórios, bem como componentes do estroma que regulam funções como adesão celular, migração e expressão gênica (BANERJEE et al., 2003), portanto as moléculas da MEC são um importante fator de modulação do crescimento e diferenciação de várias células tumorais. Contudo poucos estudos investigam a MEC envolvida no desenvolvimento dos tumores odontogênicos (ITO et al., 2002).

As células neoplásicas podem empregar vários mecanismos para adquirir vantagens de sobrevivência sobre as células não transformadas incluindo a liberdade de crescimento, produção de citocinas imunomodulatórias, a baixa expressão de possíveis antígenos tumorais e fatores de co-estimulação e a perda de proteínas de controle do ciclo celular (STANDER et al., 1999). Essa expressão

alterada das moléculas integradas na rede de interações entre célula-célula e célula-matriz leva a um remodelamento da MEC, evento essencial para a invasão neoplásica local. Investigações sobre esse processo podem promover novos conhecimentos sobre os mecanismos da tumorigênese e podem também levar a novos alvos terapêuticos (KÖNINGER et al., 2004b).

Köninger et al. (2004b) ressaltam ainda que a MEC que circunda as neoplasias invasivas permite a interação entre moléculas solúveis reguladoras do crescimento e seus receptores, servindo como um reservatório para vários fatores de crescimento e citocinas e alterando o estado de ativação e proliferação das próprias células neoplásicas.

A degradação da MEC pode ser vista apenas como uma destruição e remodelação de barreiras estruturais, onde cada processo degenerativo permite a invasão celular. Contudo, vimos anteriormente que a MEC não é somente um arcabouço celular passivo; ela influencia o comportamento celular pelo aprisionamento de moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento e proteínas ligantes de fatores de crescimento (PINHEIRO et al., 2004). O conhecimento das características dos componentes não colágenos da MEC das neoplasias pode acender uma luz na sua histogênese, formação morfológica, comportamento biológico e diagnóstico diferencial.

As proteínas estudadas foram escolhidas por representarem as principais proteínas não colágenas da MEC dos dentes, órgãos formados pelas mesmas estruturas que dão origem aos tumores odontogênicos. Os tumores odontogênicos estudados apresentam importante participação do componente epitelial (responsável pela formação do esmalte na odontogênese normal) e segundo sugeriram Papagerakis et al. (1999) as células epiteliais comprometidas com a diferenciação

ameloblástica podem expressar marcadores de linhagem osteoblástica/cementoblástica em condições patológicas. Essas células seriam denominadas células epitélio-mesenquimais e representariam uma transição fenotípica, apresentando, na mesma célula, co-expressão de proteínas epiteliais e mesenquimais (PAPAGERAKIS et al., 1999).

Ainda segundo Papagerakis et al. (1999) as células epiteliais são convertidas em células mesenquimais em vários tecidos normais durante a embriogênese e em tecidos neoplásicos, e esse fenômeno resulta de uma seqüência de eventos celulares chamados de transição epitélio mesênquima (TEM). A TEM ocorre, por exemplo, na odontogênese normal durante a formação radicular, quando as células da bainha epitelial de Hertwig passam a expressar BSP, OCC e OPN (PAPAGERAKIS et al., 1999). Portanto a produção de proteínas pelo epitélio odontogênico não está restrita somente as proteínas de esmalte, e a possibilidade da expressão de proteínas teoricamente exclusivas de osso, dentina e cimento deve ser investigada também em tumores odontogênicos epiteliais e mistos.

Os aspectos histológicos do ameloblastoma e do tumor odontogênico cístico calcificante assemelham-se aos aspectos histológicos apresentados pelas estruturas componentes do órgão do esmalte durante as diversas fases da odontogênese. Essa similaridade entre o fenótipo de algumas células neoplásicas e células normais indica que a diferenciação das células odontogênicas, bem caracterizada no dente normal, pode também ocorrer em tumores odontogênicos (PAPAGERAKIS et al., 1999). Dados descrevendo a presença de proteínas do citoesqueleto, fatores de crescimento e proteínas da matriz nos tumores odontogênicos levam a mesma conclusão (PAPAGERAKIS et al., 1999). Um bom exemplo é o fenótipo mixóide adquirido pelas células estrelárias do ameloblastoma e do tumor odontogênico

cístico calcificante, semelhantes ao fenótipo das células do retículo estrelado do órgão do esmalte e que pode ser causado pela retenção de proteínas não colágenas da MEC no espaço intercelular.

Os tumores odontogênicos apresentam comportamentos biológicos diferentes. Entretanto possuem como característica comum sua predominante ocorrência em regiões intra-ósseas, o que demanda a destruição do tecido ósseo nas áreas adjacentes a neoplasia e um provável envolvimento dos componentes não colágenos da MEC local. Neste íterim observamos que uma das características importantes do ameloblastoma é seu potencial de invasividade local. A invasão ocorre dependendo de eventos cíclicos de degradação e aposição da MEC e tanto as células neoplásicas quanto as células do estroma do ameloblastoma podem secretar metaloproteinases (MMPs) que degradariam a MEC e a matriz óssea (PINHEIRO, 2002). Contudo a secreção de MMPs pelo parênquima tumoral não é um evento isolado ou mais importante para invasão. O estroma neoplásico também faria parte desse mecanismo de invasividade por expressar componentes colágenos e não colágenos que respondem a ação das MMPs (PINHEIRO, 2002).

Já o tumor odontogênico cístico calcificante apresenta um padrão de crescimento predominantemente expansivo, entretanto possui focos de material mineralizado em meio as suas estruturas. Os mecanismos de formação dessas estruturas mineralizadas ainda são poucos conhecidos (CHEN et al., 1998b). Takada et al. (2000) relataram a presença de proteínas do esmalte nas células fantasmas presentes no tumor odontogênico cístico calcificante, e sugeriram que o acúmulo de proteínas do esmalte pode ser um dos fatores que colaboram para a formação das células fantasmas, ou seja, levantaram a hipótese que essas células não estejam somente envolvidas em um processo degenerativo, mas também numa eventual

formação de matriz de esmalte. Como veremos a seguir nossos resultados confirmam que as células fantasmas estariam sofrendo um processo metaplásico e não somente um processo degenerativo.

É sabido que a mineralização é um fenômeno complexo, um assunto que envolve vários tipos de moléculas já que o colágeno isolado não parece ter função como nucleador para a hidroxiapatita. Portanto é necessário que outros constituintes da MEC realizem essa tarefa, por exemplo, os componentes não colágenos. Assim, o colágeno funcionaria como uma rede sobre a qual os nucleadores de hidroxiapatita estariam orientados (ROBEY, 1996).

Os PGs biglican e decorin desempenham um papel estrutural e funcional complexo durante a formação e manutenção dos tecidos dentários, estando associados a diferenciação celular e mineralização, através de mecanismos que parecem envolver a interação com o TGF- β , colágeno I, íons cálcio, além de outros componentes da matriz (TENÓRIO, 2003).

A distribuição do decorin normalmente suporta sua postulada função de regulação da reunião e crescimento das fibras colágenas. Já a diversidade de tipos celulares expressando o biglican sugere uma gama de funções específicas dessa proteína para cada célula, porém morfogênese e diferenciação ativa são denominadores comuns de todos os tecidos que expressam o biglican (BIANCO et al., 1990). Enquanto o decorin parece ser um componente da matriz em tempo integral, o biglican aparenta ser uma molécula de superfície celular envolvida em funções outras que não a produção e reunião da matriz (BIANCO et al., 1990).

Nossos resultados mostraram a ausência do biglican nas células basais e estrelárias tanto do ameloblastoma quanto do tumor odontogênico cístico calcificante. Segundo Tenório (2003) a expressão imunoistoquímica do biglican em

germes dentários de ratos diminui com a idade, até apresentar-se ausente em camundongos com dois meses de idade. Podemos postular então que provavelmente ambos tumores odontogênicos apresentariam um padrão de expressão de biglican semelhante aos tecidos dentários adultos.

Já as células metaplásicas e células fantasmas apresentaram-se fracamente positivas, fato sugestivo que essas células, apesar de representarem formas de metaplasia, comportar-se-iam como tipos celulares mais especializados, que segundo Bianco et al. (1990) expressam biglican durante o desenvolvimento. Além disso, segundo Tenório, Santos e Zorn (2003) a interação entre TGF- β e biglican sugere um papel para essa proteína no mecanismo de diferenciação e os GAGs sulfatados ligados ao biglican também influenciam a citodiferenciação e exercem um papel na estabilização do estado diferenciado.

As células fantasmas em processo de calcificação exibiram fraca positividade e as estruturas calcificadas originárias desse processo exibiram negatividade, dados que sugerem que o biglican neste caso atue somente na iniciação da mineralização, já que parece agir como um regulador da mineralização facilitando a iniciação da formação dos cristais de hidroxiapatita (BOSKEY et al., 1997).

A dentina displásica exibiu intensa positividade para esse PG. Segundo Tenório (2003) a expressão do biglican em germes dentais de ratos diminui com o passar do tempo, estando ausente nos tecidos dentários de ratos jovens, o que nos leva a supor que a dentina displásica possa representar uma forma de dentina imatura.

Com relação ao estroma dos ameloblastomas e ectomesênquima neoplásico dos tumores odontogênicos císticos calcificantes a expressão do biglican variou de fracamente positiva a fortemente positiva, com ênfase nas áreas próximas ao epitélio

neoplásico e áreas de hialinização. Esse resultado pode ser explicado uma vez que o biglican exerce papel estrutural devido a sua interação com fibras colágenas do tipo I e VI (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003; ZANOTI et al., 2005) e papel de regulador da organização da MEC (GOLDBERG et al., 2002). Também se liga a um número de outros constituintes de tecido conjuntivo, bem como fatores de crescimento.

Além disso, estuda-se um eventual papel de supressão tumoral para o biglican já que inibe o crescimento de células de câncer pancreático *in vivo*, está superexpresso em carcinomas originários de glândulas salivares (LEIVO et al., 2005; VUILLERMOZ et al., 2004), e presente nos septos fibrosos ou na cápsula de mixomas odontogênicos (ZHAO et al., 1999). Portanto a positividade para esse PG, acentuada nas áreas de hialinização onde segundo Chen et al. (1998b) encontram-se os produtos do epitélio odontogênico, pode representar uma reação dos tecidos que envolvem o componente epitelial, com o objetivo de inibir a proliferação epitelial.

Com relação às células epiteliais de ambos tumores odontogênicos o PG decorin exibiu resultados bastante semelhantes ao PG biglican, estando ausente nas células basais e estrelárias de ambos tumores, fracamente positivo nas células fantasmas e células metaplásicas e positivo nas células fantasmas em processo de calcificação. Essa expressão predominantemente negativa nas células epiteliais neoplásicas condiz com a principal função desse PG na construção e crescimento das fibras colágenas (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003).

Com relação a sua presença nas células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação do tumor odontogênico cístico calcificante algumas hipóteses podem ser estudadas, entre elas: uma possível participação dessa proteína no controle do mecanismo de mineralização, opondo-se ao papel

estimulatório exercido pelo biglican; uma maior presença da proteína com objetivo de suprir uma eventual deficiência na sua atividade (sua função de inibição da mineralização é exercida através de sua ligação com os sítios de interação entre a hidroxiapatita e o colágeno e, portanto, fora do tecido conjuntivo sua ação estaria prejudicada); ou simplesmente sua atividade nos mecanismos na formação de calcificações distróficas seja diferente dos mecanismos de mineralização normal.

A ausência de expressão desse PG nos focos de calcificação demonstra que apesar de possuir mecanismo de ação pouco esclarecido provavelmente ainda atue predominantemente como inibidor da formação de tecidos mineralizados. A presença do PG decorin nas células metaplásicas ainda remete a uma função obscura já que entre as principais funções deste PG não figura seu envolvimento nos mecanismos de diferenciação celular.

Já no estroma neoplásico dos ameloblastomas e no ectomesênquima odontogênico presente no tumor odontogênico cístico calcificante a marcação imunoistoquímica variou de fracamente positiva a fortemente positiva, com maior intensidade nas áreas próximas ao epitélio neoplásico e nas áreas hialinizadas. Esse padrão de imunoexpressão explica-se provavelmente pela ligação do decorin com os colágenos tipo I, II, III e IV (ZANOTTI et al., 2005) bem como com outros vários componentes da MEC (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003).

Além disso, recentemente descreveu-se habilidade do decorin de inibir o crescimento tumoral (KÖNINGER et al., 2004a), e postulou-se que a superexpressão desse gene, com conseqüente superprodução da proteína na MEC desses tumores, possa representar uma resposta do hospedeiro a invasão das células tumorais na tentativa de prevenir a difusão do tumor. O decorin foi observado, por exemplo, no estroma neoplásico de carcinoma epidermóides bucais (BANERJEE et al., 2003).

Segundo Ständer et al. (1999) o decorin modula negativamente o crescimento neoplásico agindo em pelo menos duas vias distintas da formação neoplásica, a imunossupressão mediada por citocinas e a perda de controle do ciclo celular. Decorin também tem mostrado função como um modulador negativo do controle do crescimento celular, possivelmente através da ligação com o TGF- β , que inibe a ligação desse fator de crescimento com o receptor apropriado e neutraliza seus efeitos de promoção do crescimento (KÖNINGER et al., 2004b; ZHAO et al., 1999).

O TGF- β é liberado por neoplasias de várias origens histogenéticas e promove a imunossupressão do hospedeiro e o escape imune das células neoplásicas pela indução da parada do crescimento e apoptose em células imunes, pela diminuição da expressão de proteína de apresentação antigênica e pelas mudanças no perfil de liberação de citocinas das células imunes tumorais. Mais que isso, o TGF- β pode modular o crescimento tumoral de forma autócrina e parácrina, pode mediar a resistência a drogas e pode facilitar a angiogênese tumoral. O decorin liga-se ao TGF- β , inibindo sua bioatividade, modulando negativamente sua síntese e supostamente revertendo a imunossupressão mediada pelo TGF- β 1. Decorin é pouco expresso no parênquima de muitos tumores, mas bastante expresso no estroma tumoral. Em virtude dessa regulação no crescimento e propriedades imunomodulatórias, decorin promete tornar-se um novo alvo para terapia experimental de cânceres humanos (STÄNDER et al., 1999).

A dentina displásica apresentou positividade para o PG decorin, fato condizente com o seu papel na formação da dentina normal (MATSUURA et al., 2001; TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003) e com sua expressão exclusiva em pré-dentina de ratos (TENÓRIO; SANTOS; ZORN, 2003). Contudo, Yoshida et al. (1996) mostraram que o decorin pode ser detectado imunoistoquimicamente somente na

junção pré-dentina dentina – chamado de frente de calcificação – e, portanto a pré-dentina humana não exibiria imunomarcação para a proteína decorin. Então a dentina displásica pode, na verdade, representar um material dentinóide que apresenta constante ação agonista do biglican e antagonista do decorin com relação ao processo de calcificação, não podendo maturar-se completamente.

O PG fibromodulin apresentou-se ausente nas células basais e estrelárias de ambos tumores odontogênicos. Além disso, esteve ausente nas células metaplásicas do ameloblastoma acantomatoso. Esse perfil imunoistoquímico pode ser correlacionado com sua função predominante de regulação do espaçamento e espessura das fibras colágenas exercida no tecido conjuntivo (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003; PROVENZANO et al., 2005). As células fantasmas e as células fantasmas em processo de calcificação apresentaram fraca positividade e os focos de calcificação foram negativos, expressão provavelmente relacionada à sua função de inibição da mineralização na interface entre tecidos moles e duros (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003).

O estroma neoplásico presente no ameloblastoma e o ectomesênquima odontogênico presente no tumor odontogênico cístico calcificante foram predominantemente negativos talvez porque representem tecidos maduros, com ausência de fibrilogênese colágena pronunciada. Já a sua fraca positividade nas áreas de hialinização pode estar relacionada a sua função de inibição de formação de fibras colágenas *in vitro* (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003) e talvez sua presença ajude a manter essa área hialinizada.

A dentina displásica apresentou fraca positividade provavelmente por representar uma dentina imatura, possibilitando a ação inibitória da mineralização por parte do fibromodulin (MATIAS; YOUNG; BARTOLD, 2003).

A osteonectina é uma proteína que apresenta seu gene expresso em vários tipos celulares. Após sua síntese é secretada para a MEC onde pode modular a adesão celular através de eventos mediados por receptores que induzem mudanças nos componentes citoplasmáticos associados com adesões focais, ou pode interagir diretamente com componentes da MEC como a vitronectina para modular a adesão celular. Portanto a ONC é associada com a modulação da adesão celular, migração e angiogênese durante o desenvolvimento (REMPEL; GE; GUTIÉRREZ, 1999).

O aumento da expressão da ONC em células neoplásicas sugere que sua expressão inapropriada possa contribuir para a progressão neoplásica (REMPEL; GE; GUTIÉRREZ, 1999). Além disso, mais que um marcador inespecífico de aumento de agressividade relacionado a progressão tumoral, pode ser um marcador específico de invasão, funcionando como um marcador de diagnóstico importante na diferenciação das neoplasias benignas com potencial de invasividade (REMPEL; GE; GUTIÉRREZ, 1999).

Essa afirmação condiz com a positividade encontrada na maioria das células epiteliais neoplásicas presentes nos ameloblastomas, uma neoplasia que apresenta como característica marcante a invasividade local. Mas entra em conflito com a positividade observada nas células epiteliais do tumor odontogênico cístico calcificante, neoplasia que não apresenta comportamento invasivo. Talvez a presença imunoistoquímica dessa proteína nas células basais de ambos tumores odontogênicos possa estar relacionada preferencialmente com a função de regulação da célula através do ciclo celular (LANE; SAGE, 1994), já que as células basais encontram-se em constante divisão celular. Já a sua expressão nas células estrelárias do ameloblastoma plexiforme e nas células metaplásicas do ameloblastoma acantomatoso não seriam condizentes com as funções da ONC em

neoplasias, necessitando-se de mais estudos para estabelecimento de sua possível função.

A positividade imunoistoquímica exibida pelas células estrelárias, fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação no tumor odontogênico cístico calcificante pode ser relacionada com a alta afinidade apresentada pela ONC com a hidroxiapatita (TERMINE et al., 1981), que levaria a uma maior concentração desses cristais minerais nessas células e contribuiria para a futura mineralização das células fantasmas. Essa hipótese corrobora com Papagerakis et al. (1999) que relatam imunopositividade para ONC em células epiteliais próximas aos focos de mineralização de tumores odontogênicos mistos. Além disso, a expressão da ONC nas células estrelárias que circundam as células fantasmas sugere que o epitélio odontogênico possa realmente induzir e iniciar o processo de calcificação, talvez através da síntese e secreção da ONC.

A ONC também apresentou notável presença no estroma neoplásico do ameloblastoma e no ectomesênquima neoplásico do tumor odontogênico cístico calcificante, sendo marcação presente principalmente no citoplasma dos fibroblastos. A ONC foi localizada anteriormente em fibroblastos do ligamento periodontal (WASI et al., 1984) e fibroblastos da polpa *in vitro*, sugerindo que esses fibroblastos são mais similares a osteoblastos que células mesenquimais indiferenciadas (MARTINEZ; ARAÚJO, 2004). Portanto os fibroblastos presentes nos tumores odontogênicos podem, também, assemelharem-se mais a osteoblastos que células mesenquimais indiferenciadas. Além disso, a ONC exibe alta afinidade por fibras colágenas (TERMINE et al., 1981).

Segundo Sommer et al. (1996) a ONC apresenta altos níveis de expressão na matriz dentinária. Papagerakis et al. (2002) descreveram ausência de marcação no

compartimento mineralizado da dentina tubular e intensa expressão na pré-dentina mineralizada. Garcia et al. (2003) também descrevem a marcação para ONC na pré-dentina. Nossos resultados mostram marcação positiva na dentina displásica presente em algumas áreas do tumor odontogênico cístico calcificante, indicando novamente que essa dentina displásica possa representar uma dentina imatura. Já os focos de calcificação apresentaram negatividade imunoistoquímica, fato sugestivo de que sua função de promoção da mineralização esteja prejudicada na ausência do colágeno.

A osteopontina é uma proteína multifuncional envolvida em diversos eventos biológicos como desenvolvimento, sobrevivência celular, resposta imune, tumorigênese e cicatrização (OHMA; TAKAGI; TAKANO, 2000; SOMMER et al., 1996). Apresenta a habilidade de ligar-se simultaneamente a integrina $\alpha V\beta 3$ na superfície de osteoclastos e a hidroxiapatita que levaria a ativação dos osteoclastos e conseqüente reabsorção óssea (FACCIO et al., 2002; COGAN et al., 2004; IBRAHIM et al., 2000; MURAMATSU et al., 2005), fato teoricamente essencial para o desenvolvimento dos tumores odontogênicos, já que estes acontecem predominantemente em regiões intra-ósseas. Esse mecanismo também está envolvido na invasão vascular, já que as células endoteliais apresentam essa integrina, e na formação de metástases ósseas em carcinomas de mama (IBRAHIM et al., 2000).

Além disso, influencia na tumorigênese por meio da adesão das células a matriz, quimiotaxia, proteção das células tumorais contra a citotoxicidade do óxido nítrico, inibição da apoptose e angiogênese tumoral (IBRAHIM et al., 2000; SULZBACHER et al., 2002). Recentemente Muramatsu et al. (2005) sugeriram que a OPN seja um fator prognóstico para a progressão tumoral e sobrevivência em um

amplo número de neoplasias sólidas incluindo câncer de mama, câncer gástrico, câncer de ovário e próstata, além de um biomarcador de malignidade e metástase.

Diante do exposto nota-se que a OPN exerce diversas funções em tecidos normais e tecidos neoplásicos. Porém sua ausência na maioria das estruturas presentes nos tumores odontogênicos estudados mostra que em pouco participa da patologia dessas neoplasias. Talvez exerça papel significativo somente na evolução das células fantasmas em processo de calcificação (fracamente positivas) para os focos de calcificação (fortemente positivos), já que possui a capacidade de regular a deposição de fosfato de cálcio, ora inibindo ora promovendo (BOSKEY, 1998). Igualmente Ibrahim et al. (2000) obtiveram baixo ou nenhum nível de expressão dessa proteína nas células neoplásicas de carcinoma de mama, mas intensa expressão nos focos de calcificação presentes na lesão. A associação entre a OPN e as microcalcificações é consistente com sua afinidade pela hidroxiapatita e sua habilidade de regular o crescimento do cristal.

A sialoproteína óssea (BSP) é o componente mais abundante da matriz mineralizada do osso e outros tecidos mineralizados incluindo cartilagem mineralizada, dentina e cimento (COGAN et al., 2004; IBRAHIM et al., 2000), e sua expressão está normalmente restrita a tecidos esqueléticos em adultos, mas também inclui trofoblastos durante o processo de embriogênese (KARADAG et al., 2004). Além disso, a BSP está envolvida na quimiotaxia, angiogênese e proliferação, mecanismos que exercem papéis fundamentais na progressão neoplásica (SHARP et al., 2004).

Chen et al. (1998b) mostraram a expressão, em um nível relativamente alto, da BSP nas células epiteliais de tumores odontogênicos com componente calcificado e células epiteliais de ameloblastomas, indicando um possível papel para a BSP na

tumorigênese. Além disso, a BSP é abundantemente expressa por neoplasias malignas, particularmente em neoplasias que metastatizam preferencialmente para o osso, incluindo células de carcinoma de mama, próstata, pulmão e tireóide (IBRAHIM et al., 2000; KARADAG et al., 2004, SHARP et al., 2004) sugerindo talvez uma participação dessa proteína na invasão óssea. A expressão de BSP tem sido associada com severidade clínica e pobre prognóstico entre pacientes portadores de carcinomas de mama e próstata (KARADAG et al., 2004).

A BSP liga-se a simultaneamente à hidroxiapatita e à integrina $\alpha V\beta 3$ presente na superfície de osteoclastos, levando a adesão destes osteoclastos à superfície óssea e a ativação do mecanismo de reabsorção. Liga-se também a essa integrina presente na superfície de células endoteliais, levando à invasão vascular (COGAN et al., 2004; FACCIO et al., 2002; IBRAHIM et al., 2000). Diversos estudos demonstraram que a progressão de vários tipos de neoplasias está também associado à intensa expressão dessa integrina (KARADAG et al., 2004). Neste ínterim, Modolo et al. (2004) relatam a expressão imunoistoquímica positiva das subunidades de integrinas isoladas αV e $\beta 3$ em ameloblastomas. Portanto, a expressão de BSP em ameloblastomas descrita por Chen et al. (1998b) pode estar relacionada ao seu potencial de invasão, facilitando a infiltração de células tumorais no osso circundante.

Nossos resultados mostraram alguma diferença com relação ao trabalho de Chen et al. (1998b). Em nosso caso somente as células metaplásicas presentes nos ameloblastomas padrão acantomatoso exibiram positividade para a BSP e é sabido que essa variedade de ameloblastoma não apresenta comportamento mais agressivo em comparação com os subtipos que não exibiram a BSP. Sendo assim, talvez a BSP não exerça papel tão pronunciado no mecanismo de invasão tumoral

apresentado pelo ameloblastoma ou talvez o componente epitelial não participe diretamente desse processo de invasão mediado pela BSP, tendo um papel estimulatório sobre o estroma, que como veremos posteriormente, expressa BSP.

No caso do tumor odontogênico cístico calcificante nossos resultados mostraram que somente as células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação exibiram positividade, ficando claro que o principal papel da BSP no componente epitelial dessa neoplasia provavelmente manifesta-se no processo de calcificação devido as suas propriedades de nucleador de hidroxapatita (GANSS; KIM; SODEK, 1999; ROBEY, 1996).

A BSP também se mostrou presente no estroma neoplásico dos ameloblastomas e no ectomesênquima do tumor odontogênico cístico calcificante com distribuição bastante semelhante, com ênfase para as áreas próximas ao epitélio odontogênico. Esse padrão de expressão sugere uma estimulação epitelial sobre o tecido conjuntivo para que este participe ativamente do mecanismo de reabsorção óssea mediado pela BSP e explicado anteriormente.

Os focos de calcificação do tumor odontogênico cístico calcificante não apresentaram expressão da BSP e a dentina displásica foi positiva. Garcia et al. (2003) descrevem discreta marcação imunoistoquímica para a BSP na pré-dentina de dentes humanos erupcionados. Correlacionando esses resultados com a função de nucleador da formação dos cristais e sua expressão têmporo-espacial relacionada com a formação inicial do mineral nos tecidos dentais sugerindo um papel na iniciação da mineralização pela BSP (COGAN et al., 2004) concluímos, novamente, que a dentina displásica deve representar dentina imatura.

A osteocalcina (OCC) é uma proteína com alta afinidade por íons minerais e cristais de hidroxapatita, atuando como um inibidor do crescimento do cristal de

hidroxiapatita e, portanto, cumprindo um papel importante na regulação do crescimento do cristal (BOSKEY, 1998; DUCY; KARSENTY, 1996; INGRAM et al., 1993).

O componente epitelial do ameloblastoma não expressou a proteína OCC, colaborando com o estudo de Papagerakis et al. (1999) que não observou a OCC nos tumores odontogênicos epiteliais. Já o tumor odontogênico cístico calcificante exibiu marcação fracamente positiva nas células fantasmas e positiva nas células fantasmas em processo de calcificação colaborando novamente com Papagerakis et al. (1999) que relatam imunopositividade para OCC e ONC em células epiteliais próximas aos focos de mineralização de tumores odontogênicos mistos. A presença dessa proteína nas estruturas que estão sofrendo ou sofrerão processo de mineralização provavelmente está ligado a sua afinidade pelo cálcio e pelos cristais de hidroxiapatita (DUCY; KARSENTY, 1996) e a seu papel de inibidor do crescimento do cristal de hidroxiapatita (INGRAM et al., 1993).

Papagerakis et al. (2002) descrevem a ausência de expressão imunoistoquímica da OCC na dentina e na pré-dentina. A ausência dessa proteína nos focos de calcificação e na dentina displásica em nossos espécimes provavelmente está ligada ao papel dessa glicoproteína de inibição do crescimento do cristal de hidroxiapatita (INGRAM et al., 1993).

A OCC esteve discretamente presente nas áreas de hialinização do estroma do ameloblastoma e regiões ectomesênquima neoplásico adjacente ao epitélio no tumor odontogênico cístico calcificante. Essa presença provavelmente explica-se devido à indução por parte do epitélio.

Neste estudo foi demonstrada, pela primeira vez, a expressão de alguns dos componentes não colágenos da MEC dos tumores odontogênicos. Diante dos

resultados obtidos pudemos observar que as proteínas estudadas apresentaram distribuição semelhante em neoplasias caracterizadas por padrões de crescimento diferentes, levando a crer que essas proteínas isoladamente não exercem papel decisivo na determinação do tipo de padrão de crescimento. Entretanto uma característica comum à grande maioria dos tumores odontogênicos é sua predominante ocorrência em regiões intra-ósseas, o que demanda a destruição do tecido ósseo nas áreas adjacentes a neoplasia, sendo bastante provável a atuação dos componentes estudados neste complexo mecanismo de crescimento.

Outro fato digno de relevância é a baixa expressão dessas proteínas nas células epiteliais neoplásicas quando comparada com a expressão no estroma e ectomesênquima, levando-nos a crer que as células epiteliais, neste caso, atuem principalmente como estimuladores da produção dessas proteínas por parte do ectomesênquima e estroma. Esse quadro torna-se bastante lógico se lembrarmos que no caso dos tumores odontogênicos muito raramente o epitélio tem contato direto com o tecido ósseo e, portanto, são os tecidos mesenquimais que se tornam os responsáveis diretos pela reabsorção óssea. Contudo, devemos salientar que os tecidos mesenquimais também respondem de maneira antagonista aos estímulos epiteliais, ressaltando, neste caso, a expressão de proteínas com papel de supressão tumoral, como o biglican e o decorin, pelo ectomesênquima e estroma neoplásicos.

Desta forma, verifica-se que o conjunto dos resultados da expressão e distribuição dos proteoglicanos biglican, decorin e fibromodulin e das glicoproteínas ONC, OPN, BSP e OCC indicam o possível papel destas moléculas durante o desenvolvimento dos tumores odontogênicos. Entretanto, estudos adicionais são necessários no sentido de obter um melhor entendimento sobre os mecanismos

pelos quais essas moléculas influenciam o comportamento das células dos tumores odontogênicos.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos é possível concluir que durante o desenvolvimento dos tumores odontogênicos:

1. o biglican é identificado, principalmente, nos tecidos mesenquimais, sejam eles participantes (caso do ectomesênquima neoplásico do tumor odontogênico cístico calcificante) ou apenas componentes (caso do estroma dos ameloblastomas) da neoplasia, e na dentina displásica presente no tumor odontogênico cístico calcificante. As células epiteliais em processo de metaplasia exibiram discreta expressão desse proteoglicano;
2. o decorin também esteve presente principalmente nos tecidos mesenquimais, e da mesma maneira que o biglican, com maior intensidade nas áreas próximas ao epitélio neoplásico. As células em processo de metaplasia apresentaram discreta expressão, com exceção para as células fantasmas em processo de calcificação. A dentina displásica expressou o decorin com menor intensidade que o biglican;
3. a expressão do fibromodulin foi predominantemente negativa nos tumores odontogênicos estudados, com exceção para as áreas de hialinização do mesênquima e células metaplásicas do tumor odontogênico cístico calcificante;
4. a osteonectina pôde ser abundantemente identificada nos componentes epitelial e mesenquimal dos tumores odontogênicos, mas esteve ausente nos focos de calcificação;

5. a osteopontina foi imunolocalizada somente nas células fantasmas em processo de calcificação e nos focos de calcificação;
6. a sialoproteína óssea apresentou ampla expressão imunoistoquímica no estroma dos ameloblastomas e no ectomesênquima neoplásico do tumor odontogênico cístico calcificante. Esteve presente também nas células epiteliais em processo de metaplasia e na dentina displásica. Não foi observada nos focos de calcificação;
7. a osteocalcina mostrou ausência de expressão imunoistoquímica na maioria das células epiteliais com exceção para as células fantasmas e células fantasmas em processo de calcificação. O mesênquima de ambas lesões exibiu discreta expressão somente nas áreas próximas ao epitélio. Os focos de calcificação e a dentina displásica presentes no tumor odontogênico cístico calcificante foram negativos.

REFERÊNCIAS¹

Aithal D, Reddy BS, Mahajan S, Boaz K, Kamboj M. Ameloblastomatous calcifying odontogênico cyst: a rare histologic variant. *J Oral Pathol Med* 2003;32(6):376-8.

Araújo NS, Araújo VC. *Patologia bucal*. São Paulo: Artes Medicas; 1984.

Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76(6):899-910.

Banerjee AG, Bhattacharyya I, Lydiatt WM, Vishwanatha JK. Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(22):7769-76.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005.cap. 6,p. 283-327.

Bataineh AB. Effect of preservation of the inferior and posterior borders on recurrence of ameloblastomas of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(2):155-63.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey P. Expression and localization of the two small proteoglycans, biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeleton tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38(11):1549-63.

Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem* 1998;30/31Suppl:83-91.

Boskey AL, Spevak L, Doty SB, Rosenberg L. Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin, and DS-biglycan on hidroxyapatite formation in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int* 1997;61(4):298-305.

Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 1998; 250(1):13-33.

¹De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

Chen J, Sasaguri K, Aufdemorte TB, Jiang H, Thomas HF. Enamel epithelium expresses bone sialoprotein (BSP). *Eur J Oral Sci* 1998a;106 Suppl1:331-6.

Chen J, Aufdemorte TB, Jiang H, Liu A-R, Zhang W, Thomas HF. Neoplastic odontogenic epithelial cells express bone sialoprotein. *Histochem J* 1998b;30(1):1-6.

Cogan G, Bansal AK, Ibrahim S, Zhu B, Goldberg HA, Ganss B, et al. Analysis of human bone sialoprotein in normal and pathological tissues using a monoclonal antibody (BSP 1.2 mab). *Connect Tissue Res* 2004;45(1):60-71.

Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Grinowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 1998;62(1):74-82.

Ducy P, Karsenty G. Skeletal gla proteins: gene structure, regulation of expression, and function. In: Bilezikian JP, Raisz LD, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. cap. 14, p.183-95.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382(6590):448-52.

Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(4):331-49.

Faccio R, Grano M, Colucci S, Villa A, Giannelli G, Quaranta V, et al. Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 14):2919-29.

Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 2003;44(Suppl1):33-44.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10(1):79-98.

Garcia JMQ, Martins MD, Jaeger RG, Marques M. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured pulp cells. *Int Endod J* 2003;36(6):404-10.

Gardner DG. A pathologist's approach to the treatment of ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1984;42(3):161-6.

Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H. Ameloblastomas. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon:IARC Press; 2005. cap. 6, p. 296-300.

Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Young M, Ameye L. Biglycan is a repressor of amelogenin expression and enamel formation: an emerging hypothesis. *J Dent Res* 2002;81(8):520-4.

Goldberg M, Rapoport O, Septier D, Palmier K, Hall R, Embery G, et al. Proteoglycans in predentin: The last 15 micrometers before mineralization. *Connect Tissue Res* 2003;44(Suppl1):184-8.

Gorlin RJ, Pindborg JJ, Clausen FP, Vickers RA. The calcifying odontogenic cyst – a possible analogue of the cutaneous calcifying epithelioma of Malherbe. An analysis of fifteen cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962;15:1235-43.

Hall RC, Embery G. The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues. *Adv Dent Res* 1997;11(4):478-86.

Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC, et al. Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000;18(3):253-60.

Ingram RT, Clarke BL, Fischer LW, Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res* 1993;8(9):1019-29.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52.

Ito Y, Abiko Y, Tanaka Y, Rabemtulla F, Kaku T. Immunohistochemical localization of large chondroitin sulfate proteoglycan in odontogenic tumor. *Med Electron Microsc* 2002;35(3):173-7.

Johnson A3rd, Fletcher M, Gold L, Chen SY. Calcifying odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 57 cases with immunohistochemical evaluation for cytokeratin. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(7):679-83.

Karadag A, Ogbureke KUE, Fedarko NS, Fisher LW. Bone Sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(12):956-65.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004.

Königer J, Giese NA, Mola FF, Berberat P, Giese T, Esposito I, et al. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin Cancer Res* 2004a;10(14):4776-83.

Königer J, Giese T, di Mola FF, Wente MN, Esposito I, Bachem MG, et al. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004b;322(3):943-9.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. *International histological classification of tumours: Histological typing of odontogenic tumors*. 2ªed. New York: Springer-Verlag; 1992a.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. *The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumors. A commentary on the second edition*. *Cancer* 1992b;70(12):2988-94.

Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994;8(2):163-73.

Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, et al. Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;156(2):104-13.

Martinez EF, Araújo VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int Endod J* 2004;37(11):749-55.

Matias MA, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localization of fibromodulin in the periodontium during cementogenesis and root formation in the rat molar. *J Periodontal Res* 2003;38(5):502-7.

Matsuura T, Duarte RW, Cheng H, Uzawa K, Yamauchi M. Differential expression of decorin and biglycan genes during mouse tooth development. *Matrix Biol* 2001;20(5-6):367-73.

Matsuzaka K, Inoue T, Nashimoto M, Takemoto K, Ishikawa H, Asaka M, et al. A case of an ameloblastic fibro-odontoma arising from calcifying odontogenic cyst. *Bull Tokyo Dent Coll* 2001;42(1):51-5.

Modolo F, Martins MT, Loducca SVL, Araújo VC. Expression of integrin subunits alpha2, alpha 3, alpha 5, alpha V, beta1, beta3, beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium. *Oral Dis* 2004;10(5):277-82.

Muramatsu T, Shima K, Ohta K, Kizaki H, Ro Y, Kohn Y, et al. Inhibition of osteopontin expression and function in oral cancer cell lines by antisense oligonucleotides. *Cancer Lett* 2005;217(1):87-95.

Ohma N, Takagi Y, Takano Y. Distribution of non-collagenous dentin matrix proteins and proteoglycans, and their relation to calcium accumulation in bisphosphonate-affected rat incisors. *Eur J Oral Sci* 2000;108(3):222-32.

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002;30(2):377-85.

Papagerakis P, Peuchmaur M, Hotton D, Ferdadji L, Delmas P, Sasaki S, et al. Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenic tumors. *J Dent Res* 1999;78(1):20-30.

Phillipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med* 2002;31(5):253-8.

Pindborg JJ, Kramer IRH. International histological classification of tumours: No 5. Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions. Geneva: World Health Organization; 1971.

Pinheiro JJV. Estudo imuno-histoquímico e zimográfico das metaloproteinases da matriz 1, 2 e 9 no ameloblastoma [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Pinheiro JJV, Freitas VM, Moretti AIS, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology* 2004;45(1):65-72.

Praetórius F, Ledesma-Montes C. Calcifying cystic odontogenic tumour. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidranky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. cap. 6, p.313.

Praetórius F, Hjorting-Hansen E, Gorlin RJ, Vickers RA. Calcifying odontogenic cyst. Range, Variations and neoplastic potential. *Acta Odontol Scand* 1981;39(4): 227-40.

Provenzano PP, Alejandro-Osório AL, Valhmu WB, Jensen KT, Vanderby Jr R. Intrinsic fibroblast-mediated remodeling of damaged collagenous matrices in vivo. *Matrix Biol* 2005;23(8):543-55.

Qian H, Xiao Y, Bartold PM. Immunohistochemical localization and expression of fibromodulin in adult rat periodontium and inflamed human gingiva. *Oral Dis* 2004;10(4):233-9.

Rempel SA, Ge S, Gutiérrez JA. SPARC: A potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(2):237-41.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 1996;35(1-4):131-6.

Sasano Y, Zhu JX, Kamakura S, Kusunoki S, Mizoguchi I, Kagayama M. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol* 2000;202(1):31-7.

Salo T, Kainulainen T, Parikka M, Heikinheimo K. Expression of laminin-5 in ameloblastomas and human fetal teeth. *J Oral Pathol Med* 1999;28(8):337-42.

Schönherr E, Hausser H, Beavan L, Kresse H. Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. *J Biol Chem* 1995;270(15):8877-83.

Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988;252(2):313-23.

Septier D, Hall RC, Embery G, Goldberg M. Immunoelectron microscopic visualization of pro- and secreted forms of decorin and biglycan in the predentin and during dentin formation in the rat incisor. *Calcif Tissue Int* 2001;69(1):38-45.

Shafer WG, Hine MK, Barnett ML, Tomich CE. *Tratado de patologia bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1987.

Sharp JA, Waltham M, Williams ED, Henderson MA, Thompson EW. Transfection of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with bone sialoprotein (BSP) stimulates migration and invasion in vitro and growth of primary and secondary tumors in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 2004;21(1):19-29.

Shear M. Developmental odontogenic cysts. An update. *J Oral Pathol Med* 1994;23(1):1-11.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99-126.

Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, Wetterwald A. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 1996;19(4):371-80.

Small IA, Waldron CA. Ameloblastoma of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1955;8(3):281-97.

Ständer M, Naumann U, Wick W, Weller M. Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Res* 1999;296(2):221-7.

Sulzbacher I, Birner P, Trich K, Lang S, Chott A. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch* 2002;441(4):345-9.

Svensson L, Närlid I, Oldberg A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett* 2000;470(2):178-82.

Takada T, Zhao M, Uchida T, Kudo Y, Sato S, Nikai H. Immunohistochemical demonstration of an enamel sheath protein, sheathlin, in odontogenic tumors. *Virchows Arch* 2000;436(4):324-9.

Tenório DMH. Distribuição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos em germes de molares de ratos durante o desenvolvimento pós-natal e em molares de ratos jovens [Tese Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2003.

Tenório DMH, Santos MF, Zorn TMT. Distribution of biglycan and decorin in rat tissue. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(8):1061-5.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, Mcgarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26(1 Pt 1):99-105.

Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'onofrio MF, Ramont L, Venteo L, Perreau C, et al. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res* 2004;296(2):294-306.

Waddington RJ, Hall RC, Embery G, Lloyd DM. Changing profiles of proteoglycans in the transition of predentine to dentine. *Matrix Biol* 2003;22(2):153-61.

Waldron CA. Cistos e tumores odontogênicos. In: Neville BW, Dam DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. cap. 15, p. 589-642.

Wasi S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Sodek J, et al. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 1984;62(6):470-8.

Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth. *Arch Oral Biol* 1996;41(4):351-7.

Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernaconi P, Canioni E, Di Blasi C, et al. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain* 2005;128(Pt 11):2546-55.

Zhao M, Lu Y, Takada T, Ogawa I, Miyauchi M, Mock D, et al. Immunohistochemical and histochemical characterization of the mucosubstances of odontogenic myxoma: histogenesis and differential diagnosis. *Pathol Res Pract* 1999;195(6):391-7.

Zhou H, Choong P, Mccarthy R, Chou ST, Martin TJ, Ng KW. In situ hybridization to show sequential expression of osteoblast gene markers during bone formation *in vivo*. J Bone Miner Res 1994;9(9):1489-99.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 172/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Distribuição das proteínas não colágenas da matriz extracelular em tumores odontogênicos*", de responsabilidade do Pesquisador **Filipe Modolo Siqueira**, sob orientação do Prof. Dr. **Ney Soares de Araújo**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 20 de outubro de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP