FÁBIO CÉSAR PROSDÓCIMI

**Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores
(TIMPs e RECK) em tumores odontogênicos benignos**

São Paulo

2012

FÁBIO CÉSAR PROSDÓCIMI

**Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores
(TIMPs e RECK) em tumores odontogênicos benignos**

Versão Corrigida

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

Orientadora: Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Prosdócimi, Fábio César.

Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs e RECK) em tumores odontogênicos benignos / Fábio César Prosdócimi : orientadora Katiúcia Batista da Silva Paiva; coorientadora Flávia Caló de Aquino Xavier. -- São Paulo, 2012.

141 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida.

1. Tumores odontogênicos. 2. Metaloproteinases. 3. Ameloblastoma. I. Paiva, Katiúcia Batista da Silva II. Xavier, Flávia Caló de Aquino. III. Título.

Prosdócimi FC. Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs e RECK) em tumores odontogênicos benignos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: 06/02/2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Katiúcia Batista da Silva Paiva. Instituição: USP-SP

Julgamento: **Aprovado** Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Suzana Cantanhede Orsini M. de Sousa. Instituição: FO - USP

Julgamento: **Aprovado** Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Décio dos Santos Pinto Júnior. Instituição: FO - USP

Julgamento: **Aprovado** Assinatura: _____

Prof(a). Camila de Oliveira Rodini Pegoraro. Dr(a). Instituição: FOB - USP

Julgamento: **Aprovado** Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Ricardo Della Coletta. Instituição: FOP - UNICAMP

Julgamento: **Aprovado** Assinatura: _____

Aos meus pais, Fábio e Vera, que certamente lá de cima devem estar felizes e orgulhosos, muitas e eternas saudades;

Para a minha esposa Claudia, amiga, colega, incentivadora, uma pessoa presente em todo este trabalho, a mulher da minha vida, mãe dos meus tesouros e;

Para as minhas amadas e maravilhosas filhas Giulia e Melissa, presentes de Deus, razão de minha existência, sorriso que me faz feliz e luz do meu viver.

Amo vocês do fundo do meu ventrículo esquerdo, que sempre contrai mais forte quando pensa em vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva, um exemplo de dedicação à pesquisa, à ciência e a arte de viver. Obrigado pela paciência durante o meu aprendizado, pela tranquilidade transmitida durante as mais diversas situações e, principalmente, pelo respeito demonstrado às minhas limitações.

A minha coorientadora Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier. Além de excelente profissional, um ser humano digno de admiração. Suas palavras vieram, invariavelmente, nos momentos certos. O meu mais sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Chefe do Departamento de Estomatologia, meu primeiro orientador nessa caminhada em direção ao projeto de doutorado. Obrigado por abrir as portas da USP novamente para mim e por acreditar nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, um grande Professor, docente com grande experiência, sempre uma conversa amiga e divertida, própria de quem está de bem com a vida e sabe o que faz. Décio, muitíssimo obrigado pelo apoio nos mais variados momentos.

A Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, antes de tudo, um exemplo de dedicação e educação. Parabéns pelo respeito aos seus alunos, fato digno de admiração por muitos. Muitíssimo obrigado pela orientação e atenção nos mais variados momentos.

A Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini, Chefe da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação. O meu enorme obrigado, especialmente no momento mais difícil desse trabalho, ou seja, na conclusão. Saber ser uma líder é um privilégio. Parabéns.

A Profa. Dra. Camila de Oliveira Rodini, pelo apoio durante todo o período do doutorado e também pelo auxílio na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, pela valiosa colaboração de seus comentários, pertinentes, ao trabalho. O meu agradecimento e o meu respeito.

A Profa. Dra. Eliza Harumi Kozasa. Em poucas pessoas pude confiar durante a minha carreira. Obrigado, minha amiga.

A Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e seus Profs. Drs.: Andréa Mantesso, Fábio Alves, Fernando Xavier, Karem Ortega, Marília Martins, Nathalie Resende, Norberto Sugaya, Sílvia Lourenço.

A Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, minha ex-orientadora e sempre amiga. O meu muito obrigado ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A Profa Dra. Mari Cleide Sogayar, Coordenadora do Núcleo de Terapia Celular e Molecular - NUCEL. Querida Mari, palavras não bastam para agradecer o seu imenso apoio. Um obrigado do tamanho do Mundo!

Ao Querido Prof. Fernando Neves, um amigo. E dos bons!

A Diretoria do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista – UNIP, na figura do Prof. Dr. Paschoal Laércio Armônia e do Prof. Dr. Carlos Eduardo Alegretti, meus amigos. Obrigado pelo apoio e incentivo nos momentos críticos dessa jornada.

Ao Prof. Jorge Brihy, Diretor Pedagógico da Universidade Paulista – UNIP. O início dessa jornada têm o incentivo desse meu amigo. Obrigado, Jorginho!

Aos meus colegas e amigos: Bettina Brasil, Elizabeth Teodorov, Rosana Cristina Boni, Lúcio Frigo, Luciane Soares, Andréa Beatriz Bonsi, Regiane Mathias, Lara Picoli, Nilson Silva Souza, Monica Rodrigues, Fábio Martinez, Dora Uemura, Francisco Cavalcante, Cássio Vilicev, Thelma Parada, Guilherme Terra, Vanessa Ferriello, Vanessa Santhiago. Obrigado pelo apoio e incentivo!

Aos meus caríssimos Coordenadores de Curso da Universidade Paulista – UNIP, pessoas que, sem dúvida, permitiram que esse trabalho fosse adiante: Melissa Lara, Raquel Coutinho, Sandra Whitaker, Cristina Campofiorito, Cristiano Baldan, Tais Fortes, Priscilla Onofre, Priscila Ferronato, Élcio Magdalena, Hermínio Barreto, Igor Masson, Ivaldo Esteves....

Aos meus comrades: Arthur Schmidt, Cyro Ottoni de Carvalho, Marcelo Mascaro, Ricardo Monezi, Carlos Roberto, Vinícius Cestari... Amigo também serve para agüentar as lamúrias!

A Zilda, Néia e Nair, da Secretaria da Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Zilda, você fez a minha peregrinação pela Pós-graduação mais correta. Néia, você foi o apoio mais emblemático dessa caminhada.

A Elisa. Elisa dos Santos, do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A Elisa que tantas vezes me auxiliou e estimulou. Querida Elisa, que Deus abençoe sua vida e a dos seus. Meu eterno obrigado, minha amiga.

Ao Juvani Lago Saturno, um cara que realmente me ajudou demais. Valeu!!!

Aos alunos de pós-graduação do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível. Alessandra, Ana Claudia Ruiz, Ana Paula Molina, Ana Rita, Bianca Pulino, Catalina Costa, Fabiana Martins, Felipe Daltoé, Frederico, Juliana Seo, Karen Tieme, Karin Fernandes, Felipe Sperandio, Gabriela Nagata, Gustavo Rabelo, Carla Siqueira, Joelma Lima, Douglas, Lucyene Miguita...Nós fazemos a Pós-graduação caminhar.

Aos Prof Dr Jackson Bittencourt e Edson Liberti, do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Aos alunos de pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Marcos, Nanda, Gabriel, Érika, Adauto, Ana Cláudia...Sem vocês esse trabalho não teria sido possível, certamente.

Ao Prof. Euro de Barros Couto Júnior, responsável pelo estudo estatístico.

Ao pessoal da biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Glauci Elaine, você é um anjo que veio na hora certa. Obrigado!

Aos professores que ministraram os cursos para a obtenção dos créditos necessários nesse Programa de Pós-graduação. Meu reconhecimento de Vossa sapiência.

Ao Grupo GEN - Editora Guanabara Koogan.

À equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Kauê Pavanello, Paula Prieto, Carina Esteves, Leonardo Ferro, Fernanda Amorim, Michella Lima, Márcio Cristóforo, Maria Fernanda, Edna... Muito obrigado pelo incentivo e amizade.

Ao Luiz H. S. Silva e Nicole Bendini. Luiz, você me apoiou e ensinou um monte de coisas, principalmente humildade. Você é um grande cara! Nicole, minha ex-aluna, obrigado pelos ensinamentos. O meu mais sincero agradecimento pela paciência para me ensinar e pela amizade sincera. Valeu!!!

A minha sogra, Maria Edite, e a minha tia, Maria Zilene Xavier. Zilene, muito obrigado!

Ao meu amigo e cunhado, Edson. Você é um grande presente na minha vida. Que Deus te proteja, hoje e sempre.

Ao LELO – FOU SP, pelo apoio no momento decisivo da defesa. Obrigado!

A todos aqueles que me auxiliaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste estudo.

E principalmente aos meus alunos, motivo maior deste trabalho.

*“Tudo quanto vive, vive porque muda; muda porque passa; e, porque passa, morre.
Tudo quanto vive perpetuamente se torna outra coisa, constantemente se nega, se
furta à vida”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Prosdócimi FC. Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMP e RECK) em tumores odontogênicos benignos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida

Os tumores odontogênicos benignos compreendem um grupo de neoplasias originárias dos tecidos dentários. Pesquisas vêm buscando identificar moléculas envolvidas nos mecanismos moleculares que regulam a remodelação da matriz extracelular (MEC) e como isto influencia no comportamento localmente invasivo presente em alguns destes tumores. A Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM – conversão do fenótipo epitelial em mesenquimal) é bem caracterizada em diversos carcinomas, culminando em metástase. MMPs são enzimas que degradam os componentes da MEC, geram moléculas bioativas, participam da TEM e o controle da remodelação da MEC dá-se pelo balanço entre elas, seus inibidores (TIMPs e RECK) e seu ativador (EMMPRIN). Assim, o objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão das MMPs (-2, -7, -9 e -14), seus inibidores (TIMPs -2, -3, -4 e RECK), seu ativador (EMMPRIN) e marcadores da TEM (Snail, Slug, N-caderina, Fibronectina, α -Actina de músculo liso e Vimentina) em Ameloblastomas (AB) e Tumores Odontogênicos Cístico Calcificantes (TOCC). Ainda, realizamos a comparação da expressão de cada molécula avaliada em cada compartimento celular (epitélio e estroma) e correlação entre as moléculas avaliadas no mesmo tumor. Utilizamos 19 casos de AB e 18 casos de TOCC (Serviço de Anatomia Patológica da FOU SP), localização das enzimas/proteínas por imunoistoquímica e analisadas nos compartimentos epitelial e estromal. Todas as proteínas/enzimas analisadas foram detectadas tanto nos AB quanto nos TOCC, sendo a maioria expressa em ambos os compartimentos. A N-caderina foi localizada apenas no epitélio dos AB e a Vimentina somente no estroma em ambos os tumores. Na comparação entre o “epitélio x estroma” dos ameloblastomas, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a MMP-2, MMP-7, EMMPRIN/CD147, Fibronectina, α -Actina de músculo liso, N-caderina, Vimentina, Snail e Slug. Na comparação entre o “epitélio x estroma” dos TOCC, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a MMP-9, RECK,

EMMPRIN/CD147, Vimentina, N-caderina, Snail e Slug. Assim, entre o “epitélio x estroma” dos ameloblastomas e TOCC, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a MMP-2, MMP-7, MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, Fibronectina, Vimentina, α -Actina de músculo liso, N-caderina, Snail e Slug. Esta é a primeira vez que a EMMPRIN, RECK, TIMP-3, TIMP-4, N-caderina, Snail e Slug são descritas em TOCC e TIMP-3, TIMP-4, Snail e Slug em ameloblastomas. Concluímos que estas proteínas/enzimas estão diferencialmente expressas tanto no epitélio quanto no estroma destes tumores e sugerimos que estes podem participar do comportamento localmente invasivo.

Palavras-chave: Metaloproteinases de matriz. Tumores odontogênicos. Transição epitélio-mesênquima. Ameloblastoma. Tumor odontogênico cístico calcificante.

ABSTRACT

Prosdócimi FC. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMP and RECK) in odontogenic tumors benign [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida

Odontogenic tumors comprise a group of benign neoplasms originating from dental tissues. Research looking for identify molecules involved in the molecular mechanisms that regulate extracellular matrix remodeling (ECM) and how this impacts on locally invasive behavior present in some of these tumors. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT - conversion of epithelial phenotype into mesenchymal phenotype) is well characterized in several carcinomas, leaving to metastasis. MMPs are enzymes that degrade ECM components, generate bioactive molecules, participating in the EMT and control ECM remodeling is given by the balance between them, their inhibitors (TIMPs and RECK) and its activator (EMMPRIN). The aim of this study was evaluate expression profile of MMPs (-2, -7, -9 and -14), their inhibitors (TIMPs -2, -3, -4 and RECK), its activator (EMMPRIN) and EMT markers (Snail, Slug, N-cadherin, Fibronectin, α -smooth muscle actin and Vimentin) in ameloblastomas (AB) and Calcifying Cystic Odontogenic Tumor (CCOT). We also compared the expression of each molecule assessed in each cellular compartment (epithelium and stroma) and correlation between molecules evaluated in the same tumor. We used 19 AB cases and 18 CCOT cases from files of Pathology Laboratory (FOUSP), localization of enzymes/proteins and analyzed by immunohistochemistry in epithelial and stromal compartments. All proteins/enzymes were detected in both AB and CCOT, mostly expressed in both compartments. N-cadherin was localized only in the epithelium of AB and Vimentin only in stromal in both tumors. Comparing "epithelium vs stroma" of AB, we observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) for MMP-2, MMP-7, EMMPRIN/CD147, Fibronectin, α -smooth muscle actin, N-cadherin, Vimentin, Snail and Slug. Comparing "epithelium vs stroma" of CCOT, we observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) for MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, Vimentin, N-cadherin, Snail and Slug. Analyzing "epithelium vs stroma" between AB and CCOT, we observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) for MMP-2, MMP-7, MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, Fibronectin, Vimentin, α -smooth muscle actin, N-cadherin, Snail and Slug. This is the first time that EMMPRIN, RECK, TIMP-3, TIMP-4, N-cadherin, Snail and Slug are described in CCOT and TIMP-3, TIMP-4, Snail and Slug in AB. We conclude that these proteins/enzymes are

differentially expressed in both epithelium and stroma of these tumors and suggest that they may participate locally invasive behavior.

Keywords: Matrix metalloproteinases. Odontogenic tumors. Epithelial-mesenchymal transition. Ameloblastoma. Calcifying cystic odontogenic tumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 2.1 - Classificação atual da OMS (2005).....	25
Quadro 2.2 - Resumo das moléculas envolvidas no desenvolvimento e progressão dos tumores odontogênicos	27
Figura 2.1 - Representação dos dois tipos histológicos mais comuns em ameloblastomas: (A-C) folicular, apresentando fronte ósseo (seta) e células epiteliais com polarização invertida com núcleos voltados a região apical (seta) e (D-F) plexiforme. DC: degeneração cística, EPa: epitélio em paliçada, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50, 100 e 500 µM	32
Figura 2.2- Representação dos dois principais tipos histológicos do antigo cisto de Gorlin desde que foi reclassificado: (A-C) Tumor Odontogênico Cístico Calcificante apresentando células-fantasma na camada epitelial; e (D-E) o Tumor Dentinogênico de Células-Fantasma, com aspecto histológico semelhante ao do ameloblastoma, porém com células-fantasma e deposição de matriz calcificada semelhante à dentina (dentinóide). Barra: 50, 200 e 500 µM.....	34
Figura 2.3 - Representação esquemática dos tipos de TEM. Pt: plaquetas, B e T: linfócitos B e T, NK: células <i>natural killer</i> , G: granulócitos, M: macrófagos. Fonte: Adaptado de (1).....	36
Figura 2.4 - Representação esquemática dos aspectos celulares e moleculares da TEM e TME. LEF: <i>lymphoid enhancer binding factor</i> , FSP1: proteína específica de fibroblasto 1, ZO-1: zona ocludente 1, MUC1: mucina 1, SIP1: proteína de interação a proteína neuronal motora da sobrevivência, FOXC2: <i>forkhead box C2</i> . Fontes: Adaptado de (1, 2, 3).	38
Quadro 2.3 - Composição da MEC, proteínas secretadas e proteínas ancoradas à membrana celular em ameloblastomas e TOCC	42
Quadro 2.4 - Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos ...	44

Figura 2.5 - Domínios das MMPs. <u>Pré</u> : segmento pré-peptídico sinal (N-terminal); <u>Pró</u> : segmento pró-peptídico com um grupamento tiol (SH) livre ligador de zinco (N-terminal); <u>A</u> : região da alça; <u>E</u> : sítio susceptível a atuação de enzimas tipo furina; <u>DT</u> : domínio transmembrana (C-terminal); <u>C</u> : cauda citoplasmática (C-terminal); <u>GPI</u> : domínio glicosilfosfatidilinositol ancorado a membrana plasmática (C-terminal); <u>Vn</u> : domínio tipo vitronectina/ hemopexina contendo 4 repetições, sendo que a primeira e a última estão ligadas por ponte dissulfeto; <u>DTRIL-1 r-P/C</u> : domínio tipo receptor de IL-1 (interleucina-1) rico em prolina/cisteína (C-terminal) (Adaptado de (4)46	46
Quadro 2.5 - Efeitos biológicos mediados pela MMPs em situações fisiológicas50	50
Quadro 2.6 - Classificação, propriedades bioquímicas e atuações biológicas das TIMPs.....53	53
Quadro 2.7 - MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs e RECK) presentes em ameloblastoma e TOCC.....57	57
Quadro 4.1 - Dados clínicos dos pacientes dignosticados com ameloblastoma61	61
Quadro 4.2 - Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com TOCC61	61
Figura 4.1 - Representação esquemática dos métodos empregados em imunohistoquímica: (A) tecnologia da Estreptoavidina-biotina (LSAB) e (B) tecnologia de cadeia polimérica conjugada (EnVision) (<i>Adaptado de DAKO Handbook for Immunohistochemical Staining</i>)62	62
Quadro 4.3 - Descrição dos anticorpos primários utilizados na reação de imunohistoquímica63	63
Figura 5.1 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7, TIMP-3, TIMP-4, Fibronectina, Vimentina, EMMPRIN/CD147, N-caderina e α -SMA no capuz dentário. E: epitélio reduzido do órgão do esmalte, TC: tecido conjuntivo, VS: vasos sanguíneos. Barra: 200 μ m.....75	75
Figura 5.2 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7 e MMP-9 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: frente óssea, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μ m.....76	76
Figura 5.3 - Imunolocalização das MMP-14, TIMP-2 e TIMP-3 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: frente óssea, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μ m.....77	77
Figura 5.4 - Imunolocalização das TIMP-4, RECK e EMMPRIN/CD147 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: frente óssea, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μ m.....78	78

Figura 5.5 - Imunolocalização das N-caderina, Snail e Slug em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.....	79
Figura 5.6 - Imunolocalização das Fibronectina, Vimentina e a-SMA em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.....	80
Figura 5.7 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células-fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM	88
Figura 5.8 - Imunolocalização das TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e RECK em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células-fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE:: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM	89
Figura 5.9 - Imunolocalização da EMMPRIN/CD147, N-caderina, Snail e Slug em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células-fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE:: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM	90
Figura 5.10 - Imunolocalização da Fibronectina, Vimentina e a-SMA em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células-fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Distribuição percentual da análise semi-quantitativa das imunomarcações das proteínas/enzimas nos ameloblastomas	73
Tabela 5.2 - Distribuição percentual da análise semi-quantitativa das imunomarcações das proteínas/enzimas no TOCC	92
Tabela 5.3 - Comparação e correlação da expressão das proteínas/enzimas no epitélio entre o ameloblastoma e TOCC com diferença estatisticamente significativa	95
Tabela 5.4 - Comparação e correlação da expressão das proteínas/enzimas no estroma entre o ameloblastoma e TOCC com diferença estatisticamente significativa	97
Tabela 5.5 - Comparação da expressão das proteínas/enzimas no “epitélio x estroma” individualmente no ameloblastoma e no TOCC com diferença estatisticamente significativa	97
Tabela 5.6 - Correlação entre “MMPs x marcadores mesenquimais” no ameloblastoma com relação estatisticamente significativa	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ameloblastoma
BMP	Proteína morfogenética óssea
CF	Célula fantasma
DC	Degeneração cística
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBV	Epstein-Barr vírus
EPA	Epitélio em paliçada
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
ES	Estroma
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FO	Fronte ósseo
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HPV	Papiloma virus humano
IAP	Proteína inibitória de apoptose
ICAM	moléculas de adesão intracelular
IL	interleucina
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinases de matriz
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PTHrP	Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide
RANK	Ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B
RECK	Reversion-Inducing <u>C</u> ysteine-Rich Protein with <u>K</u> azal Motifs
RE	Retículo estrelado
SHH	sonic hedgedog
TEM	transição epitélio-mesenquimal
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TME	transição mesênquima-epitelial
TNF	Fator tumoral de necrose
TO	tumor odontogênico

TOB	tumor odontogênico benigno
TOCC	tumor odontogênico cístico calcificante
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
3 OBJETIVO	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
5 RESULTADOS.....	66
6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	143

1 INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos compreendem uma gama de desordens de crescimento desde neoplasias benignas e malignas até malformações dos tecidos dentários. A sua maioria é benigna, porém, alguns deles, tais como os ameloblastomas, apresentam comportamento localmente invasivo e recidiva.

As pesquisas nessa área vêm buscando identificar quais moléculas estão envolvidas nos mecanismos moleculares que regulam o início e progressão neoplásicas, a remodelação da matriz extracelular (MEC), interações célula-célula e célula-MEC e como estes participam nos processos relacionados ao comportamento invasivo. Neste contexto, a Transição Epitélio-Mesenquimal (perda do fenótipo epitelial e ganho de fenótipo mesenquimal e aquisição de mobilidade pela MEC) aparece como uma possível explicação para este tipo de comportamento, já identificado em muitos carcinomas, culminando com a metástase. Entretanto, nada se conhece se existe o processo de TEM nestes tumores. Assim, o microambiente tumoral é um importante regulador do comportamento e pode auxiliar na compreensão destes mecanismos moleculares e determinar marcadores que auxiliem em um melhor diagnóstico e melhor delineamento no tratamento destes tumores. Além disso, é sabido que muitos marcadores da diferenciação celular durante a odontogênese são expressos de forma anormal nos tumores odontogênicos benignos, dentre eles as metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores.

As MMPs são enzimas que, em conjunto, podem degradar todos os componentes da MEC e gerar moléculas bioativas. São as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos normais como a embriogênese e organogênese, bem como em eventos patológicos como a invasão tumoral nos tecidos. O controle do remodelamento da MEC dá-se pelo balanço entre as MMPs, seus inibidores teciduais (TIMPs), seu inibidor ancorado a membrana plasmática (RECK) e seu ativador (EMMPRIN). Sabe-se que algumas MMPs, seus inibidores e EMMPRIN já foram descritos em alguns tumores odontogênicos, sendo relacionados ao

comportamento localmente invasivo. Além disso, as MMPs e EMMPRIN já são conhecidos por participarem de etapas cruciais no processo de TEM.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão das MMPs (-2, -7, -9 e -14), seus inibidores (TIMPs -2, -3, -4 e RECK), seu ativador (EMMPRIN) e marcadores da TEM (Snail, Slug, N-caderina, Fibronectina, α -Actina de músculo liso e Vimentina) em biópsias de Ameloblastomas (AB) e Tumores Odontogênicos Cístico Calcificantes (TOCC) humanos por imuno-histoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumores Odontogênicos

Os tumores odontogênicos (TO) apresentam-se, de modo mais amplo, desde alterações de crescimento a malformações dos tecidos dentais. Incluem um grupo heterogêneo de lesões que podem apresentar comportamento benigno ou maligno, invasivos ou não, mais freqüentes na mandíbula que na maxila, podendo ou não atingir os tecidos moles adjacentes e exibem muitas variações histológicas. Estas lesões são incomuns e algumas são extremamente raras, mas podem estabelecer significantes alterações no diagnóstico e na terapêutica na cavidade oral e outras regiões maxilofaciais (Barnes et al., 2005; Morgan, 2011a).

Histopatologicamente, esses tumores, freqüentemente, apresentam características semelhantes às encontradas na odontogênese e formam estruturas similares aquelas derivadas do epitélio oral, folículo e papila dentárias. Alguns tumores são caracterizados pela presença de células epiteliais que, morfológicamente, lembram ameloblastos, enquanto que outras estruturas calcificadas lembram a dentina, esmalte, cimento ou todos eles misturados. Esta diversidade histopatológica na morfologia é devida a natureza pluripotente e indutiva dos tecidos dentais.

Em 1971, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a primeira classificação sobre os TOs a ser adotada mundialmente: “Tipos histológicos dos tumores odontogênicos, cistos dos maxilares e lesões afins” (Pindborg, 1972). Atualmente, utiliza-se a última classificação publicada pela OMS (Barnes et al., 2005), atualizada em função dos novos conhecimentos moleculares e genéticos destes tumores (Barnes et al., 2005) (Quadro 2.1).

A maioria dos estudos envolvendo tumores odontogênicos considera suas características clínico-patológicas (como o comportamento da neoplasia) e a avaliação de sua classificação. Alterações moleculares envolvidas na oncogênese e diferenciação celular, como a participação de oncogenes e genes supressores tumorais, genes de reparo de DNA, genes reguladores do

I) Tumores Malignos	A) Carcinomas Odontogênicos	1. Ameloblastoma metastizante (maligno) 2. Carcinoma ameloblástico – tipo primário 3. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (indiferenciado) intra-ósseo 4. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (indiferenciado) periférico 5. Carcinoma de células escamosas intra-ósseo primário derivado de tumor 6. Carcinoma de células escamosas intra-ósseo primário derivado de cistos 7. Carcinoma de células escamosas intra-ósseo primário derivado de tumor 8. Carcinoma odontogênico de células claras 9. Carcinoma odontogênico de células fantasmas
	B) Sarcomas Odontogênicos	1. Fibrossarcomas ameloblástico 2. Fibro-odontossarcoma ou fibrodentinossarcoma ameloblástico
II) Tumores Benignos	Epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro, sem ectomesênquima odontogênico	1. Ameloblastoma sólido – multicístico 2. Ameloblastoma extra-ósseo – tipo periférico 3. Ameloblastoma tipo desmoplásico 4. Ameloblastoma tipo unicístico 5. Tumor odontogênico escamoso 6. Tumor odontogênico epitelial calcificante (Antigo Tumor de Pindborg) 7. Tumor odontogênico adenomatóide 8. Tumor odontogênico queratocístico
	Epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido dentário duro	1. Fibroma ameloblástico 2. Fibrodentinoma ameloblástico 3. Fibro-odontoma ameloblástico 4. Odontoma: a. Odontoma tipo complexo b. Odontoma tipo composto 5. Odontoameloblastoma 6. Tumor odontogênico cístico calcificante (Antigo Cisto de Gorlin) 7. Tumor dentinogênico de células-fantasmas (Antigo Cisto de Gorlin)
	C. Mesênquima ou ectomesênquima odontogênico com ou sem epitélio odontogênico	1. Fibroma odontogênico 2. Mixoma odontogênico 3. Cementoblastoma

III) Lesões Ósseas Relacionadas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fibroma ossificante 2. Displasia fibrosa 3. Displasia óssea 4. Lesão central de células gigantes (Granuloma) 5. Querubismo 6. Cisto ósseo aneurismático 7. Cisto ósseo simples
IV) Outros Tumores	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor neuroectodérmico melanótico da infância

Fonte: (Barnes et al., 2005)

Quadro 2.1 – Classificação atual da OMS (2005)

desenvolvimento dentário, do ciclo celular, da apoptose, fatores de crescimento, bem como estudos desenvolvimento dentário, do ciclo celular, da apoptose, fatores de crescimento, bem como estudos direcionados a proteínas relacionadas aos tecidos duros têm sido investigadas neste grupo de lesões. Moléculas de adesão celular, proteinases da matriz extracelular (MEC), fatores angiogênicos e citocinas osteolíticas têm sido associadas à progressão desses tumores (Quadro 2.2).

Moléculas possivelmente associadas a tumorigênese e/ou diferenciação de células tumorais	
Oncogenes	<i>Ras, Myc e Fos</i>
Genes supressores de tumor	<i>p53, APC</i>
Fatores de crescimento	TGF- α e - β (Fator de Crescimento Transformante), FGF-1 e -2 (Fator de Crescimento Fibroblástico), HGF (Fator de Crescimento de Hepatócito)
Telomerase	Telomerase
Reguladores do ciclo celular	Ciclina D1, p16 ^{INK4a} , p21 ^{WAF1/Cip1} , p27 ^{Kip1}
Fatores relacionados a apoptose	Família Bcl-2, família IAP (Proteína Inibitória da Apoptose), Fas, TNF- α (Fator Tumoral de Necrose), p53
Reguladores da odontogênese	Via do SHH (<i>Sonic Hedgehog</i>), via do Wnt, via de Notch
Proteínas relacionadas aos tecidos mineralizados	Amelogenina, enamelina, ameloblastina, MMP-20 (enamelisina), BSP, osteonectina, osteocalcina, osteopontina, BMP (Proteínas Morfogenéticas Ósseas)
Moléculas possivelmente associadas com a progressão tumoral	
Moléculas de adesão celular	E-selectina, ICAM-1 (Moléculas de Adesão Intracelular), VCAM-1 (Moléculas de Adesão Celular Vascular), E-caderina, integrinas, CD44
Proteinases da Matriz extracelular	MMP-1, MMP-2, MMP-9, heparanase
Fatores angiogênicos	VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
Citocinas osteolíticas	IL-1, IL-6 (Interleucina), TNF- α , PTHrP (Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide), RANKL/OPG (Ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB/Osteoprotegerina)

Fonte:(Kumamoto, 2006; Kumamoto et al., 2008; Devilliers et al., 2011; Siar et al., 2011; Siar et al., 2012).

Quadro 2.2 – Resumo das moléculas envolvidas no desenvolvimento e progressão dos tumores odontogênicos

2.2 Tumores Odontogênicos Benignos (TOBs)

Os tumores odontogênicos benignos (TOBs) foram classificados de acordo com o tecido de possível origem (epitélio ou mesênquima) e se possuem a capacidade de induzir ou não a formação de tecido mineralizado, semelhantes a dentina (Quadro 2.1).

2.2.1 Ameloblastoma

O odontoma é o tumor odontogênico benigno mais comum, porém é considerado uma lesão não-neoplásica. Neste contexto, o ameloblastoma é o tumor odontogênico benigno neoplásico mais comum. Dentre os TOBs de origem epitelial, o ameloblastoma apresenta-se como o tumor com a segunda maior incidência e é localmente invasivo, apesar de ser considerado benigno, sendo um tumor que destrói o osso ao redor da lesão, com aspecto clínico-patológico variável, elevada recidiva e, eventualmente, sofre transformação maligna. Assim, é o tumor odontogênico de maior importância clínica (Barnes et al., 2005).

O aspecto clínico assemelha-se ao de um abaulamento intra ou extra-oral, quase sempre assintomático (neste caso, geralmente, atinge proporções grotescas), onde, na região da lesão, a mucosa oral apresenta-se com aspecto geral normal e sem infecções. O aspecto observado em exames radiográficos assemelha-se ao de “bolhas de sabão”, “favos de mel”, devido à expansão das corticais, notando-se, ainda, alterações dentais tais como reabsorção radicular e deslocamento dental.

Embriologicamente, o epitélio ameloblástico apresenta polarização voltada para a superfície da camada do retículo, conhecida como estrato intermediário. Este estrato que, na odontogênese, encontra-se entre os ameloblastos e o retículo estrelado, auxilia a produção de esmalte, não está presente no ameloblastoma e, assim, não há produção de esmalte. Esta polarização é observada em ameloblastomas e marcam a formação de células pré-ameloblásticas. Além disso, ameloblastomas não expressam amelogenina (Saku et al., 1992a) e nem ameloblastina (Takata et al., 2000a), ou seja, não atingem o estágio de maturação ameloblástica e não secretam esmalte. Histologicamente, as células epiteliais neoplásicas podem ser alongadas e em paliçada, muito semelhantes à ameloblastos (mais exatamente pré-ameloblastos), indicando o termo ameloblastoma. Desta forma, o ameloblastoma caracteriza-se basicamente como uma neoplasia odontogênica “não indutiva”, por não induzir a formação de qualquer tecido duro, apresentando dois padrões histológicos predominantes (folicular ou plexiforme) circundados por tecido conjuntivo.

Assim, podemos observar cinco padrões definidos: 1) Folicular, que apresenta o epitélio organizado em ilhotas semelhantes ao epitélio do órgão do esmalte, com

células alongadas de polaridade invertida dos núcleos, ou seja, oposta à membrana basal, tendo as células centrais frouxamente arrançadas de modo semelhante ao retículo estrelado e o estroma de tecido conjuntivo fibroso apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções; 2) Plexiforme, formado por cordões de epitélio odontogênico entrelaçados, rodeados por células colunares semelhantes à ameloblastos, com o estroma vascularizado e isento de cistos; 3) Acantomatoso, mais utilizado para designar a presença de queratina entremeada à uma metaplasia escamosa próxima à ilhas epiteliais; 4) Basilar ou de Células Basais, com grumos de células basais uniformes, semelhantes as dos carcinomas basocelulares, onde não são notadas células semelhantes às do retículo estrelado, além de células epiteliais periféricas cúbicas; e 5) de Células Granulares, apresentando grumos de células epiteliais do ameloblastoma que se diferenciaram em células granulares (com grânulos eosinofílicos citoplasmáticos) (Black et al., 2010).

Associando-se os aspectos clínicos aos histopatológicos, encontramos quatro subtipos histológicos distintos de ameloblastomas: multicístico, periférico, unicístico e desmoplásico. O ameloblastoma multicístico é a forma mais comum (cerca de 90%), o mais invasivo e, em geral, localizado na mandíbula, principalmente na região de molares. Os ameloblastomas unicísticos, principalmente na região posterior e associada à coroa de um dente incluso, incluem aqueles referidos como: (I) ameloblastoma mural, onde a extensão da lesão pode ser determinada após análise extensiva da biópsia; (II) ameloblastoma luminal, onde o epitélio ameloblástico circunda a parede fibrosa da área cística e sua camada basal apresenta polarização nuclear invertida e nota-se aspecto semelhante à do retículo estrelado; (III) aqueles derivados de cistos dentígeros ou intraluminais, onde observa-se uma projeção de nódulos intraluminais, ou seja, em direção à luz do cisto, por vezes preenchendo completamente esse espaço. Os ameloblastomas periféricos são tumores odontogênicos incomuns (cerca de 1-10%), com as características histológicas do ameloblastoma intra-ósseo, mas que ocorrem apenas nos tecidos moles. O ameloblastoma desmoplásico, apresenta-se com intensa colagenização do estroma, observando-se ainda a presença de epitélio tumoral em forma de ilhotas ovóides ou de cordões.

Na figura 2.1, estão representados os padrões plexiforme e folicular em ameloblastomas multicísticos, por serem os mais comumente encontrados e mais invasivos localmente, respectivamente.

Camundongos transgênicos carreando o oncogene *v-Ha-ras* desenvolvem espontaneamente tumores tipo-ameloblastoma, quando comparados aos animais selvagens, e apresentam a amelogenina, MMP-20, FOS, colágeno VIIIA (membrana basal de endotélio), TNFRSF1a (receptor para TNF- α), BMP-2 e Dlx7 (fator de transcrição da família homeobox) superexpressos, sugerindo que múltiplos genes envolvidos nas cascatas moleculares ativadas tanto na odontogênese quanto na tumorigênese são induzidas pela via de ras (Dodds et al., 2003).

2.2.2 Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC)

O antigo Cisto de Gorlin ou Cisto Odontogênico Calcificante (Gorlin et al., 1962) foi descrito como uma entidade com duas características básicas: tumor cístico e neoplasia sólida. Em todos estes anos, várias classificações foram propostas com o objetivo de esclarecer a natureza e os diferentes agrupamentos, considerando as características histomorfológicas e clinico-patológicas. Assim, estes tumores odontogênicos foram distinguidos do ameloblastoma com base nas características histopatológicas e por terem, geralmente, natureza menos agressiva. Somente em 2005, este grupo foi reclassificado como duas variantes benignas distintas: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC) e Tumor Dentinogênico de Células-fantasma (TDCF). O TOCC foi definido como uma neoplasia cística benigna de origem odontogênica, caracterizada por um epitélio tipo-ameloblastoma com células-fantasma calcificadas e o TDCF foi definido como uma neoplasia sólida localmente invasiva caracterizada por ilhas tipo-ameloblastoma de células epiteliais no tecido conjuntivo. Aberrante queratinização pode ser achada na forma de células fantasmas associadas com diferentes quantidades de dentina displásica. A forma maligna destas duas variantes foi descrita como Carcinoma Odontogênico de Células-Fantasma (Barnes et al., 2005; Ledesma-Montes et al., 2008; Morgan, 2011b) (Figura 2.2).

O TOCC é usualmente uma lesão radiograficamente unilocular e apresenta-se em diferentes locais de predileção dos ameloblastomas, na região anterior da mandíbula ou maxila. Pode ou não estar associado a molares não-erupcionados ou

odontomas. Com seu crescimento lento, promove expansão da cortical adjacente, geralmente indolor. Ocasionalmente foi relatado dor e epistaxe.

O TOCC é classificado em duas categorias: proliferativa e não-proliferativa. O tipo proliferativo apresenta a parede do cisto formada por tecido conjuntivo fibroso margeado por um fino epitélio com extensa formação de células-fantasma e calcificações. Já o não-proliferativo possui poucas células-fantasma. Pode ser ainda intra ou extra-ósseo.

Histologicamente, apresenta células epiteliais colunares altas semelhantes a ameloblastos, próximas a células tipo-retículo estrelado e células-fantasma. As células tipo-retículo estrelado são consideradas células transitórias e que formarão as células-fantasma (estágio inicial). As células-fantasma apresentam citoplasma eosinofílico expandido e, especialmente nas camadas superficiais, células anucleadas ou vazias, e esta é uma das características do diagnóstico diferencial em relação ao ameloblastoma. Não se sabe ao certo se estas células representam queratinização normal ou aberrante (Lucchese et al., 2007), uma simples degeneração celular ou uma forma de matriz do esmalte em reabsorção (Takata et al., 2000a), células odontogênicas apoptóticas resultando em transformação metaplásica dos tumores odontogênicos (Kim et al., 2000; Lucchese et al., 2007). A OMS considera estas células como células escamosas transitórias em vários estágios de desenvolvimento (Barnes et al., 2005), mas a sua verdadeira origem e processo de calcificação ainda permanencem obscuros. Entretanto, estas células também podem ser encontradas em outros tumores odontogênicos ou não-odontogênicos, tais como o odontoma (Kerebel et al., 1985), fibroodontoma ameloblástico (Matsuzaka et al., 2001), pilomatrixoma (Gorlin et al., 1962) e craniofaringioma (Fernandez-Miranda et al., 2012). Em alguns casos, as células-fantasma mineralizam e, quando se estendem em direção a parede do cisto, podem estimular a formação de uma reação de corpo estranho de células gigantes. Outra característica é a presença de um material eosinofílico tipo-osteodentina (“dentinóide”) na interface entre o epitélio e a parede do cisto, sendo considerada

Figura 2.1 – Representação dos dois tipos histológicos mais comuns em ameloblastomas: (A-C) folicular, apresentando fronte ósseo (seta) e células epiteliais com polarização invertida com núcleos voltados a região apical (seta) e (D-F) plexiforme. DC: degeneração cística, EPa: epitélio em paliçada, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50, 100 e 500 µM

uma característica análoga aquela que ocorre no início da dentinogênese durante o desenvolvimento normal do dente (Morgan, 2011a). Estas células, diferentemente do ameloblastoma, secretam várias proteínas da MEC expressas durante a formação do esmalte, como a amelogenina (Saku et al., 1992b), ameloblastina (Takata et al., 2000a), amelotina (Crivelini et al., 2012a) e proteína associada ao ameloblasto odontogênico (ODAM, *odontogenic ameloblast-associated protein*) (Crivelini et al., 2012a). Assim, o conhecimento da composição da MEC destes tumores pode esclarecer o comportamento biológico apresentado por eles.

2.3 Transição Epitélio-Mesênquimal (TEM)

Os metazoários (todos os animais multicelulares) consistem de dois tipos celulares básicos, epitelial e mesenquimal, os quais diferem entre si por sua morfologia e função. Células epiteliais são aderentes e formam camadas de células justapostas e aderidas, devido aos complexos de adesão intercelulares (zônulas de oclusão, junções aderentes e junções comunicantes) em suas membranas laterais. Estas células também apresentam polaridade ápico-basal, com a característica de ter a região basal voltada para a membrana basal, a qual separa o epitélio dos demais tecidos. Por outro lado, as células mesenquimais são não-polarizadas e não apresentam junções intercelulares, assim tendo mobilidade através da matriz extracelular (MEC).

Os fenótipos epiteliais e mesenquimais são reversíveis e, durante o desenvolvimento embrionário, as células podem alternar entre estes dois estados. A transição epitélio-mesenquimal (TEM) e o seu contrário, a transição mesênquima-epitelial (TME), são conceitos primeiramente definidos por Elizabeth Hay, cerca de 45 anos atrás. No modelo de embriões de galinha, Hay propôs que as células epiteliais podem mudar drasticamente seu fenótipo que refletiam sua “transformação” em células mesenquimais. Entretanto, desde que “transformação” é um processo reversível e células mesenquimais podem ser convertidas a células epiteliais via TME, o termo “transição” é agora utilizado.

A TEM é um processo biológico que permite que células epiteliais polarizadas se submetam a múltiplas alterações bioquímicas que as capacitem a

Figura 2.2 - Representação dos dois principais tipos histológicos do antigo cisto de Gorlin desde que foi reclassificado: (A-C) Tumor Odontogênico Cístico Calcificante apresentando células-fantasma na camada epitelial; e (D-E) o Tumor Dentinogênico de Células-Fantasma, com aspecto histológico semelhante ao do ameloblastoma, porém com células-fantasma e deposição de matriz calcificada semelhante à dentina (dentinóide). Barra: 50, 200 e 500 μM

assumir um fenótipo mesenquimal, o qual inclui o aumento da capacidade migratória, invasividade, elevada resistência a apoptose e aumento substancial na produção de componentes da MEC. A finalização do processo de TEM é observado pela degradação da membrana basal e a habilidade de células mesenquimais migrarem a partir da camada epitelial.

Todas as células em nosso organismo são derivadas de uma única célula (célula-tronco embrionária) e as variações fenotípicas encontradas nos diversos tecidos e órgãos são resultado da expressão específica de determinadas moléculas, gerando a variabilidade de funções. Durante a embriogênese, o epitélio é considerado como altamente plástico e capaz de transitar entre os estágios epiteliais e mesenquimais e vice-versa, via TEM e TME, respectivamente. No indivíduo adulto, este processo ocorre durante o reparo tecidual, cicatrização e fibrose para a geração de células mesenquimais/fibroblastos associados a estes mecanismos. Ainda, este processo está sendo associado a vários aspectos da progressão tumoral. Assim, a TEM têm sido agora reconhecida como o mecanismo para dispersar as células no embrião, geração de fibroblastos/células mesenquimais nos tecidos lesionados e iniciando o comportamento invasivo e metastático de células tumorais derivadas do epitélio (Janda et al., 2002; Kiemer et al., 2001; Thiery, 2003; Xue et al., 2003a).

Desta forma, a TEM têm sido classificada em três tipos: (I) Tipo 1 ou TEM embriogênica, associada a implantação, embriogênese e organogênese, através de células epiteliais primitivas formadoras de células mesenquimais e células neuroepiteliais iniciais formando as células da crista neural, mas não produzindo fibrose e nem células tumorais; (II) Tipo 2 ou TEM fibrinogênica ou de reparo, associada a cicatrização, reparo tecidual e fibrose, após trauma e/ou inflamação, através de células epiteliais do próprio órgão que sofreu a injúria formando fibroblastos; (III) Tipo 3 ou TEM oncogênica, associada a células tumorais de epitélio que perdem o fenótipo epitelial e, adquirindo o fenótipo mesenquimal, migram pela MEC (sítio primário), mas não geram fibroblastos. Estas células alcançando os vasos sanguíneos ou linfáticos (células tumorais circulantes) invadem os tecidos distantes e, finalmente, readquirindo o fenótipo epitelial via TME (sítio secundário), assim, disseminando sistemicamente estas células, sendo o modelo mais atual que explica a metástase (Kalluri et al., 2009; Zeisberg et al., 2009) (Figura 2.3).

(A)

(B)

TEM do Mesoderma

TEM da Crista Neural

■ Células embrionárias destinadas a TEM

Figura 2.3 - Representação esquemática dos tipos de TEM. Pt: plaquetas, B e T: linfócitos B e T, NK: células *natural killer*, G: granulócitos, M: macrófagos. Fonte: Adaptado de (Acloque et al., 2009).

A TEM está muito bem caracterizada e consolidada devido à grande quantidade de experimentos conduzidos em cultura de células e em roedores. Entretanto, os patologistas ainda debatem a relevância da TEM em condições patológicas humanas, tais como fibrose e progresso tumoral em função da dificuldade de identificar células epiteliais passando pela membrana basal durante a fibrose e detecção do local ou células tumorais em migração com o fenótipo mesenquimal. Recentes estudos usando técnicas de imagem e confiáveis métodos de marcação celular ou sondas marcadas utilizando partículas fluorescentes têm tornado possível a visualização das células epiteliais passando pelo processo de TEM (Trimboli et al., 2008; Lohela et al., 2010; Ewald et al., 2011; Ding et al., 2012).

O completo espectro de agentes sinalizadores que contribuem para a TEM em células de carcinomas permanece desconhecido. Uma sugestão é de que as alterações genéticas e epigenéticas sofridas pelas células tumorais durante o curso da formação do tumor primário conferem a elas responsividade especial aos sinais indutores de TEM originados da associação entre o estroma e o tumor. Oncogenes induzem senescência e estudos sugerem que células tumorais em TEM podem também desenvolver resistência a senescência causada pelos oncogenes, assim facilitando a sua subsequente disseminação (Ansieau et al., 2008; Smit et al., 2008; Weinberg, 2008). No caso de muitos carcinomas, sinais indutores da TEM emanam da interação estroma-tumor, notavelmente HGF, EGF, PDGF e TGF- β , aparecem como responsáveis pela indução ou ativação funcional de fatores de transcrição indutores da TEM em células tumorais, notavelmente Snail, Slug, ZEB1, Twist, Goosecoid e FOXC2. Uma vez expressos e ativados, cada um destes fatores de transcrição podem atuar pleiotropicamente (muitas funções do mesmo gene) na complexa programação da TEM. Isto depende de uma série de redes de sinalização intracelulares que se conectam através das proteínas transdutoras de sinal ERK, MAPK, PI3K, Akt, Smads, RhoB, β -catenina, LEF, Ras e c-Fos, bem como das proteínas de superfície celular como as integrinas β 4, α 5 β 1 e α v β 6. A ativação do programa da TEM é também facilitada pelo rompimento das interações célula-célula e interações célula-MEC (Thiery, 2003; Kalluri; Weinberg, 2009;; Zeisberg; Neilson, 2009).

Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM)

Fenótipo Epitelial	Fenótipo Epitelial com poucas características mesenquimais	Fenótipo Semi-Mesenquimal	Fenótipo Mesenquimal
Marcadores epiteliais fortemente marcados	Marcadores epiteliais moderadamente marcados	Marcadores epiteliais fracamente marcados	Ausência de marcadores epiteliais
Ausência de marcadores mesenquimais	Marcadores mesenquimais fracamente expressos	Marcadores mesenquimais moderadamente expressos	Marcadores mesenquimais fortemente marcados

Transição Mesênquima-Epitelial (TME)

Figura 2.4 -Representação esquemática dos aspectos celulares e moleculares da TEM e TME. LEF: *lymphoid enhancer binding factor*, FSP1: proteína específica de fibroblasto 1, ZO-1: zona ocludente 1, MUC1: mucina 1, SIP1: proteína de interação a proteína neuronal motora da sobrevivência, FOXC2: *forkhead box C2*. Fontes: Adaptado de (Acloque et al., 2009; Kalluri; Weinberg, 2009; Bednarz-Knoll et al., 2012).

Os processos envolvidos na TEM podem ser descritos em diversas etapas, algumas das quais podem ocorrer simultaneamente. Uma vez que as células epiteliais tornam-se responsivas aos sinais indutores de TEM, estes sinais podem promover os rompimentos dos complexos de adesões intercelulares e a perda da polaridade ápico-basal (Godde et al., 2010). Assim, alterações no citoesqueleto são cruciais para as células deixarem o epitélio e se tornarem individualmente com mobilidade. Estas modificações inicialmente ocorrem pela formação de constrições apicais e desorganização do citoesqueleto basal. Simultaneamente, a atividade de proteases leva a degradação da membrana basal, permitindo a saída desta célula da camada epitelial, sendo este processo denominado delaminação ou degradação da membrana basal. Desse modo, as células em processo de TEM adquirem propriedades migratórias e invasivas que permitem atravessar a MEC. Isto é possível devido a quantidade de moléculas envolvidas tanto na iniciação quanto na finalização do processo, tais como a ativação de fatores de transcrição, expressão de proteínas da superfície celular específicas, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto, produção de enzimas de degradação da MEC e alteração na expressão de microRNAs específicos. Em muitos casos, alguns destes fatores envolvidos são também utilizados como biomarcadores para demonstrar a passagem da célula pelo processo de TEM (Figura 2.4).

O conceito da TEM envolvido na formação de metástase de células tumorais é baseado nas observações de que células epiteliais de carcinoma que adquiriam marcadores mesenquimais como vimentina ou FSP-1 estavam associadas com o aumento do potencial metastático (Thompson et al., 1994), com uma superexpressão nuclear de β -catenina (Brabletz et al., 1998) e perda de moléculas de adesão célula-célula, tais como E-caderina (Behrens et al., 1989; Ebrilidze et al., 1989; Sommers et al., 1994; Thompson et al., 1994; Xue et al., 2003b). Assim, atualmente, os marcadores mais utilizados para a verificação de TEM tipo 3 são vimentina, fibronectin e N-caderina (marcadores mesenquimais) (Raymond et al., 1989; Ngan et al., 2007;), E-caderina (marcadores epiteliais) (Dorudi et al., 1993; Kowalski et al., 2003) e Snail e Slug (fatores de transcrição) (Peinado et al., 2003). Apesar de compartilhar alguns fenótipos similares aos dos outros tipos de TEM, a TEM tipo 3 também evoca a expressão dos mais primitivos marcadores sugestivos de células-tronco (Mani et al., 2008), gerando células-tronco tumorais a partir de células epiteliais convertidas a células mesenquimais. Estas células estão

associadas a iniciação, crescimento, invasão e metástase e recidiva tumorais (Ouyang et al., 2010). Assim, as vias de sinalização durante a embriogênese e a progressão tumoral tornam possíveis identificar novas vias específicas da progressão tumoral, importante para a sugestão de novas estratégias terapêuticas nas terapias anti-câncer (Yang et al., 2008).

2.4 Matriz Extracelular (MEC)

A idéia de que a matriz extracelular (MEC) é um arcabouço de preenchimento intercelular é algo que evoluiu para um conceito onde se mostra como uma interface de controle ativo das funções celulares e teciduais. É composta por uma rede de diferentes substâncias, como diferentes tipos de colágeno, proteínas microfibrilares, polissacarídeos, proteoglicanos, citocinas, fatores de crescimento e glicoproteínas. Essa composição é que propicia à MEC um papel desse controle celular-tecidual. A MEC funciona ainda como um reservatório de fatores de crescimento que podem ser rapidamente utilizados durante a sua degradação e remodelação, promovendo desse modo um ambiente favorável ao crescimento, proliferação, migração, morfologia e diferenciação celular, fundamentais para a permanente remodelação tecidual necessária durante o desenvolvimento e crescimento (Hubmacher et al., 2013).

A MEC interage com as células via receptores tais como integrinas (Fata et al., 2004), sindecanas (Saunders et al., 1989), tenascina (Lightner et al., 1990), β -1,4-galactosiltransferase (GalTase) (Hathaway et al., 1996), distroglicana (Durbeej et al., 1997; Muschler et al., 2002), domínio receptor de discoidina 1 (*discoidin domain receptor 1* – DDR1) (Vogel et al., 2001) e receptores tipo Toll (Schaefer et al., 2005), que são importantes para regular as vias de transdução de sinais intracelulares imprescindíveis para a polarização, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular (Rohrbach et al., 1993).

As células utilizam várias estratégias para regular as proteinases da MEC: regulação da transcrição, controle do tráfego de vesículas ou de estruturas ligadas à membrana celular (secreção e endocitose), ativação de pró-enzimas e a produção de inibidores endógenos.

A composição da MEC e da superfície celular dos tumores odontogênicos benignos é pouco caracterizada e, conseqüentemente, muitos processos biológicos relacionados ao seu comportamento são desconhecidos. O quadro 2.3 resume os componentes da MEC, moléculas secretadas e a composição da superfície celular dos ameloblastomas e TOCC.

2.5 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As metaloproteinases de matriz (MMPs), as serralisinas (enzimas de bactérias), as astacinas e as adamalisinas (ADAMs - desintegrina e metaloproteinase - e as ADAM-TS - ADAMs com repetições de trombospondina) são membros das metaloproteinases de mamíferos (MPs) dentro da superfamília metzincina. Estas enzimas possuem múltiplos domínios, são endopeptidases zinco-dependentes, com um perfil estrutural comum e todas apresentam a mesma configuração terciária do sítio catalítico (estrutura secundária caracterizada pela presença de uma seqüência altamente conservada contendo 3 histidinas ligadas ao zinco - no sítio catalítico - e uma metionina), chamada de metzincina (Stocker et al., 1995). As MPs apresentam uma seqüência peptídica ligada ao zinco característica (HEBXHXBGBXHZ), onde o aminoácido variável “Z” é específico de cada família (Stocker et al., 1995). Embora elas tenham uma alta similaridade estrutural, as funções desempenhadas pelas MPs são enormemente variadas (Brinckerhoff et al., 2002).

As MMPs são uma importante família e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção dos componentes da MEC. Elas processam e degradam inúmeras proteínas peri e extracelulares e, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC (Birkedal-Hansen, 1993), além de serem as únicas enzimas capazes de clivar colágenos fibrilares (Curran et al., 1999).

A primeira MMP descrita foi encontrada em caudas de girinos em metamorfose e esta foi denominada de collagenase por Gross e Lapière (Gross et al., 1962). As MMPs de mamíferos são classificadas em solúveis e

TOB	Matriz Extracelular, Moléculas Secretadas e Superfície Celular
Ameloblastoma	Sindecana-1 (CD138) (Bologna-Molina et al., 2010), Sindecana-2 (Hozumi et al., 2006), Sindecana-3 (Hozumi et al., 2006), Fibronectina (Nagai et al., 1994; Vaananen et al., 2001), Colágeno VIIIA (Heikinheimo et al., 2002), Colágeno IV (Nakano et al., 2002), Colágeno XVII (Parikka et al., 2001), Tenascina (Carnelio et al., 2010), Laminina-1 (Poomsawat et al., 2007), Versicana (Itoh et al., 1997), Perlecana (Ida-Yonemochi et al., 2002), α -Distroglicana (Ida-Yonemochi et al., 2011), integrina α 2 (Modolo et al., 2004), integrina α 3 (Modolo et al., 2004), integrina α 5 (Modolo et al., 2004), integrina α v (Modolo et al., 2004; Wang et al., 2009), integrina β 1 (Ida-Yonemochi, Ahsan, & Saku, 2011; Modolo et al., 2004; Tsuneki et al., 2012a), integrina β 3 (Modolo et al., 2004), integrina β 4 (Modolo et al., 2004), integrina α 2 β 1 (Moreira et al., 2008; Rifes et al., 2007), integrina α 5 β 1 (Moreira et al., 2008; Rifes et al., 2007), integrina α 3 β 1 (Moreira et al., 2008; Rifes et al., 2007), CD133 (Kumamoto et al., 2010), CD56 (Kusafuka et al., 2011), Osteonectina (SAPRC) (Shen et al., 2010), Osteopontina (Masloub et al., 2011b; Wang; Liu, 2009), CD44v6 (Wang; Liu, 2009), Podoplanina (Caetano et al., 2012; Tsuneki et al., 2012a; Zustin et al., 2010), Proteína associada ao ameloblasto odontogênico (ODAM) (Ren et al., 2011), Ameloblastina (Ren et al., 2011), Proteína relacionada ao Paratormônio (PTHrP) (Abdel-Aziz et al., 2012), EMMPRIN (CD147) (Kumamoto et al., 2006a; Kumamoto, 2006), BMP (2, 4 e 7) (Kumamoto et al., 2006b), BMPR-I e BMPR-II (Kumamoto & Ooya, 2006b), E-caderina (Kumamoto et al., 1999), Claudinas (1, 4, 5 e 7) (Bello et al., 2007), RANKL (Kumamoto et al., 2004), Osteoprotegerina (OPG) (Kumamoto; Ooya, 2004), N-CAM (CD56) (Cairns et al., 2010), EGF (Heikinheimo et al., 1993c), EGFR (Abdel-Aziz & Amin, 2012; Heikinheimo et al., 1993a; Heikinheimo et al., 1993c; Vered et al., 2003), TGF- α (Heikinheimo et al., 1993b), TGF- β 1 (Karathanasi et al., 2012), TGF- β 2 (Heikinheimo et al., 1993b), TNF- α (Hendarmin et al., 2005), TNFR1 (Hendarmin et al., 2005), TNFR2 (Hendarmin et al., 2005), CD10 (Abdel-Aziz; Amin, 2012; Iezzi et al., 2008; Masloub et al., 2011a), PDGF (Sulzbacher et al., 2008), PDGFRA (Sulzbacher et al., 2008), HGF (Poomsawat et al., 2012), c-met (Poomsawat et al., 2012)
TOCC	Amelogenina (Abiko et al., 2001; Crivelini et al., 2012a; Saku, Okabe; Shimokawa, 1992b), Ameloblastina (Crivelini et al., 2012a; Takata et al., 2000b), Amelotina (Crivelini et al., 2012a), Proteína associada ao ameloblasto odontogênico (ODAM) (Crivelini et al., 2012b), Lamina-1 e -5 (Poomsawat et al., 2007), Enamelina (Saku et al., 1992b), Podoplanina (Caetano et al., 2012; Tsuneki et al., 2012b), Fibronectina (Tsuneki et al., 2012b), Integrina β 1 (Tsuneki et al., 2012b), Versicana (Ito et al., 2002), Osteopontina (Salehinejad et al., 2012), CD44v6 (Salehinejad et al., 2012), Notch1 (Siar et al., 2011), Jagged1 (Siar et al., 2011), E-caderina (Kumamoto; Ooya, 1999), TGF- β 1 (Karathanasi et al., 2012), HGF (Poomsawat et al., 2012), c-met (Poomsawat et al., 2012)

BMP: proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins*), BMPR: receptores de proteínas morfogenéticas (*bone morphogenetic proteins receptor*), EGF: fator de crescimento epitelial (*epithelial growth factor*), EGFR: receptor do fator de crescimento epitelial (*epithelial growth factor receptor*), TGF: fator de crescimento tumoral (*tumor growth factor*), HGF: fator de crescimento de hepatócito (*hepatocyte growth factor*).

Quadro 2.3 – Composição da MEC, proteínas secretadas e proteínas ancoradas à membrana celular em ameloblastomas e TOCC

MMPs ancoradas à membrana celular (MT-MMP), de acordo com suas especificidades enzima-substrato *in vitro*. A maioria das MMPs solúveis é secretada como pró-enzimas e requerem ativação no meio extracelular (Harper et al., 1971), enquanto que as MT-MMPs são ativadas intracelularmente e expressas na superfície celular na forma ativa (Nabeshima et al., 2002). As MMPs solúveis são classificadas em collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e outras. Já as MT-MMPs são compostas por seis membros diferentes. A subclassificação das MMPs foi, originalmente, baseada em seus correspondentes substratos da MEC, mas, atualmente, as MMPs são designadas numericamente de acordo com a ordem cronológica na qual foram identificadas e agrupadas de acordo com sua estrutura tridimensional (Egeblad et al., 2002; Nabeshima et al., 2002) (Quadro 2.4). As MMPs -4, -5, -6 e -22 foram removidas da lista por serem idênticas a outros membros (Nabeshima et al., 2002; Nagase et al., 2006a). As MMPs são proteinases extracelulares, mas, estudos têm mostrado que as MMPs -1 (Limb et al., 2005; Nabeshima et al., 2002), -2 (Kwan et al., 2004; Nabeshima et al., 2002) e -11 (Luo et al., 2002; Nabeshima et al., 2002) são também encontradas intracelularmente e podem interagir com proteínas intracelulares.

As MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas e a maioria são secretadas na forma latente, ou seja, pró-enzimas (zimogênio), contendo 5 domínios básicos: (I) N-terminal pré-peptídico (cerca de 10 kDa), sinalizador da secreção e removido no retículo endoplasmático rugoso; (II) N-terminal pró-peptídico, removido intra ou extracelularmente; (III) catalítico (20 kDa); (IV) região da alça; e (V) C-terminal tipo hemopexina (30 kDa) (Nabeshima et al., 2002; Visse et al., 2003) (Figura 2.5). Estes domínios representam a composição básica de todas as MMPs (exceto das MMPs -7 e -26, as mais simples dentre as MMPs e não possuem o domínio hemopexina e nem a região da alça), e o aumento dos domínios está diretamente relacionado com o aumento da especificidade enzima-substrato ou em relação a sua localização celular, como é o caso das MT-MMPs. Todas MMPs são ativas em pH neutro, requerem Ca^{2+} para ativação e manutenção da conformação tridimensional. As MMPs solúveis são ativadas por clivagem enzimática (por serina proteinases e outras MMPs do domínio pró-peptídico (PRCGVPDV - especificamente entre a cisteína e o Zn^{+2}), liberando um fragmento de, aproximadamente, 10 kDa.

Grupo	MMP	Nome	Formas latente e Ativa (kDa)	Substratos
Colagenases	1	Colagenase Intersticial, Colagenase Fibroblástica, Colagenase Tecidual ou Colagenase-1	55/45	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, agrecana, versicana, perlecana, fibronectina, ligante de proteína, caseína, α 2-M, ovostatina, nidogênio, pró-TNF- α , L-selectina, α 1-PI, PZP, IGFBP-3, pró-IL-1 β e IL-1 β , MCP-3, SDF-1
	8	Colagenase Neutrófila, Colagenase de Neutrófilo	75/58	Col I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatina, agrecana, α 1-PI, antiplasmina- α 2, fibronectina, receptor de protease ativada 1
	13	Polimorfonuclear, Colagenase Granulocítica ou Colagenase-2 Colagenase-3	60/48	Col I, II, III e IV, XVIII, gelatina, PAI-2, agrecana, perlecana, laminina, elastina, tenascina, fibrilina, fibronectina, osteonectina, MCP-3, SDF-1
Gelatinases	2	Gelatinase A, Gelatinase Neutrófila ou Colagenases tipo IV de 72 kDa	72/66	Colágenos: I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, XVIII, Gelatina tipo I, Decorina, Elastina, Entactina/Nidogênio, Fibrilina, Fibrina, Fibrinogênio, Fibronectina, Fibulina, Laminina-5 (γ 2), Plasminogênio, Tenascina, Vitronectina, Agrecana, Versicana, Mielina Básica, Osteonectina, Amelogenina, Condroitina sulfato, IGFBP-3, Pró-IL-1 β , IL-1 β , IL-8, Pró-TGF- β , Pró-TNF- α , ligante de Proteína, Substância P, C1q, α 1-AC, α 1-PI, receptor 1 de FGF, MCP-3, SDF-1, adrenomodulina, endotelina grande, LTBP1, Galactina-3.
	9	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV de 92 kDa	92/86	Colágenos: II, IV, V, VII, X, XI, XIV e XVIII, Gelatina tipo I, Caseína, Decorina, Elastina, Fibrilina, Fibrina, Fibrinogênio, Plasminogênio, Vitronectina, Agrecana, Versicana, Entactina/Nidogênio, ICAM-1, Galactina-3, Mielina básica, Osteonectina, Pró-IL-1 β , IL-1 β , IL-2R α , Pró-TGF- β , Pró-TNF- α , ligante de Proteína, Proteína P, C1q, α 1-PI, α 2-M, MCP-2, SDF-1, LTBP1.
Estromelisinass	3	Estromelisin-1, Transina-1, Proteoglicanase ou Proteína Ativadora de Pró-colagenase	57/45	Col III, IV, IX, X, XVIII, gelatina, agrecana, versicana, decorina, perlecana, fibrilina, nidogênio, fibronectina, laminina, elastina, plasminogênio, caseína, fibrinogênio, antitrombina-III, α 2-M, ovostatina, α 1-PI, pró-TNF, IGFBP-3, E-caderina, osteonectina, pró-IL-1 β , MCP-3, SDF-1
	10	Estromelisin-2 ou Transina-2	57/44	Col III, IV, V, gelatina, caseína, agrecana, elastina, proteína link, fibronectina
	11	Estromelisin-3	51/44	Laminina, fibronectina, gelatina, α 1-PI, IGF, IGFBP-1
MMPs Tipo de Membrana	14	MT1-MMP	66/56	Col I, II, III, XVIII, agrecana, gel I, caseína, nidogênio, elastina, fibronectina, Fator XII, perlecanaa, fibrina, fibrilina, fibrinogênio, vitronectina, laminina-1, laminina-5 (γ 2), laminina-5(β 3), pró-TGF- β , pró-TNF- α , sindecana-1, proteína inibidora de mielina(Belien et al., 1999a), CD44(Kajita et al., 2001a), MCP-3, tTG, MUC1, lumicana, sulfato de dermatana, tenascina C, LDL-RP, integrina α v, IL-8, SDF-1, KiSS-1 proteína, metastina, CTGF, DR6, gC1qr, glicana β , α 1-PI, α 2M, tTG, apoA-I, apoE, gelsolina plasmática, apoC-II, IL-8, SLPI, pro-TNF- α , CTGF, APP
	15	MT2-MMP	72/60	Col I, IV, gel, agrecanaa, fibronectina, fibrilina, tenascina C, laminina-1, nidogênio, tTG, perlecanaa, LDL-RP, fibronectina
	16	MT3-MMP	64/52	Col II, III, gel, caseína, vitronectina, fibronectina, tTG, agrecanaa, CD44, α 1-PI, sindecana, LDL-RP, laminina-1, glicana β , KiSS-1 proteína, metastina, α 2-M, APP
	17	MT4-MMP	57/53	Fibrina, gel, fibrinogênio, pró-TNF- α , agrecanaase-1 (ADAMTS-4), LDL-RP
	24	MT5-MMP	-	KiSS-1 proteína, elastina, gel, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, APP
	25	MT6-MMP ou Leucosina	-	Fibrina, fibrinogênio, col IV, gel, fibronectina, sulfato de dermatana e condroitina, N-caderina
Matrilisina	7	Matrilisina, Matrína, Metaloproteinase Uterina ou PUMP-1	28/19	Col IV, X, XVIII, gelatina, agrecana, proteína link, elastina, fibronectina, decorina, laminina, plasminogênio, entactina, caseína, transferrina, mielina básica, α 1-PI, pró-TNF- α , FASL, criptina, osteonectina, IGFBP-3, E-caderina, RANKL, EGF ligado a heparina
	26	Endometase ou Matrilisina-2	-	Col IV, fibronectina, vitronectina
Outras	12	Metaloelastase Macrofágica, Elastase Macrofágica ou Metaloelastase Colagenase-4 (<i>Xenopus</i>)	54/45-22	Col IV, XVIII, gelatina, elastina, α 1-PI, fibronectina, agrecana, entactina/nidogênio, plasminogênio, vitronectina, fibrilina, laminina, pró-TNF, mielina básica, receptor ativador de plasminogênio tipo urokinase
	18	RAS-1	-	Col IV, gelatina, tenascina, agrecana, IGFBP-3, laminina-5 (γ 2), nidogênio-1, COMP
	19	Enamelisina	54/22	Amelogenina, Col XVIII, agrecana, COMP
	20	Homólogo ao <i>Xenopus</i> XMMP	-	-
	21	CMMP (<i>chicken</i>) ou MMP associada à Artrite Reumatóide	54/46-41	Agrecana
	23	Cisteína Array MMP (CA-MMP), Femalisina, MIFR ou MMP-21/MMP-22 γ	55/?	-
	27	Epilisina	-	-

Sem Grupo	-	Mcol-A (<i>mouse</i>)	-	-
	-	Mcol-B (<i>mouse</i>)	-	-
	-	Gelatinase de 75-kDa (<i>Chicken</i>)	-	-

α 2-M: α 2-macrobrogulina, α 1-PI: inibidor de proteinase α 1 (*α 1-proteinase inhibitor*), COMP: Proteína de matriz oligomérica da cartilagem (*cartilage oligomeric matrix protein*), FASL: ligante de Fas, IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*; LDL-RP: receptor relacionado a lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein receptor protein*), MCP-3: proteína quimiotática de monócitos-3 (*monocyte chemoattractant protein-3*), PZP, MUC: mucina transmembrana, PAI-2: inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*plasminogen activator inhibitor-2*), : proteína da zona de gravidez (*pregnancy zone protein*), RANKL: ligante de RANK, SDF: Fator derivado de célula estromal 1 (*stromal cell-derived factor-1*). Dados extraídos de: (Fessler et al., 1984; Fosang et al., 1992; Murphy et al., 1993; Fowlkes et al., 1994; Gearing et al., 1994; Ochieng et al., 1994; Aimes et al., 1995; Levi et al., 1996; d'Ortho et al., 1997; Giannelli et al., 1997; Imai et al., 1997; Mecham et al., 1997; Ohuchi et al., 1997; Buttner et al., 1998; Hiraoka et al., 1998; Ashworth et al., 1999; Bartlett et al., 1999; Belien et al., 1999b; Ellerbroek et al., 1999; Fernandez-Patron et al., 1999; Berton et al., 2000; English et al., 2000; Ferreras et al., 2000; Hahn-Dantona et al., 2000; Haro et al., 2000; Hiller et al., 2000; Koshikawa et al., 2000; McQuibban et al., 2000; Belkin et al., 2001; English et al., 2001; Kajita et al., 2001b; Lin et al., 2001; Dallas et al., 2002; Deryugina et al., 2002; Egeblad & Werb, 2002; Fukui et al., 2002; Karsdal et al., 2002; Krekoski et al., 2002; Endo et al., 2003; Gao et al., 2004; Hao et al., 2004; Hwang et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Overall, 2004; Boire et al., 2005; Ahmad et al., 2006; Itoh et al., 2006; Kim et al., 2006; Lemaitre et al., 2006; Monea et al., 2006).

Quadro 2.4 - Classificação das MMPs e seus respectivos substratos conhecidos

Figura 2.5 - Domínios das MMPs. Pré: segmento pré-peptídico sinal (N-terminal); Pró: segmento pró-peptídico com um grupamento tiol (SH) livre ligador de zinco (N-terminal); A: região da alça; F: sítio susceptível a atuação de enzimas tipo furina; DT: domínio transmembrana (C-terminal); C: cauda citoplasmática (C-terminal); GPI: domínio glicosilfosfatidilinositol ancorado a membrana plasmática (C-terminal); Vn: domínio tipo vitronectina/ hemopexina contendo 4 repetições, sendo que a primeira e a última estão ligadas por ponte dissulfeto; DTRIL-1 r-P/C: domínio tipo receptor de IL-1 (interleucina-1) rico em prolina/cisteína (C-terminal) . Adaptado de (Sternlicht et al., 2001)

ponto do domínio pró-peptídico remove apenas uma parte da sequência peptídica e sua completa remoção é, freqüentemente, efetuada por uma MMP intermediária ou por outra ativa.

Embora a maior parte destas enzimas seja secretada como pró-enzimas, dez pró-MMPs possuem uma sequência de reconhecimento da pró-proteína convertase tipo furina localizada no final do segmento pró-peptídeo e podem ser ativadas intracelularmente e secretadas para a MEC ou ancoradas a membrana celular na forma ativa (Pei et al., 1995; Sato et al., 1996). Elas podem ainda ser ativadas por agentes não proteolíticos, tais como agentes reativos de SH, compostos de mercúrio, espécies reativas de oxigênio e desnaturantes, pelo mesmo mecanismo de clivagem entre a Cys-Zn⁺² (Nagase, 1997).

MMPs presentes em células normais e localizadas pericelularmente, no tempo e quantidades corretas, são ativadas ou inibidas apropriadamente. Então, estas enzimas são fortemente reguladas aos níveis transcricional, pós-transcricional, ao nível protéico via seus ativadores e inibidores e interação com componentes específicos da MEC (Nagase et al., 1999; Sternlicht; Werb, 2001).

A expressão gênica destas enzimas é regulada por diversos fatores estimulantes e supressores que influenciam muitas vias de sinalização. Por exemplo, a expressão de várias MMPs pode ser regulada positiva e negativamente por ésteres de forbol, sinais derivados de integrinas, proteínas da MEC, estresse celular e alteração na morfologia (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht et al., 1999). A expressão é ainda regulada por hormônios, fatores de crescimento, oncogenes e citocinas, tais como interleucinas, interferons, EGF (*epidermal growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), TGF- β (*tumor growth factor-beta*) e EMMPRIN/CD147 (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (Fini et al., 1998). Muitos destes estímulos induzem a expressão e/ou ativação de produtos dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, os quais se heterodimerizam e ligam-se aos sítios do ativador de proteína 1 (AP-1) onde se encontram vários genes promotores das MMPs. Embora o complexo AP-1 desempenhe uma importante função na regulação de diversos

genes das MMPs, outros fatores também estão envolvidos. Em alguns casos, um sinal pode coordenadamente regular alguns genes de MMPs e diferencialmente regular outros, como acontece com o TGF- β , retinóides e glicocorticóides (Benbow et al., 1997). Existem também evidências que sugerem que membros ou grupos da família das MMPs são regulados independentemente (Brown et al., 1990; Vincenti et al., 1998).

Tradicionalmente, a função biológica das MMPs têm sido associada a degradação e turnover da maioria dos componentes da MEC. Este equívoco funcional têm sido utilizado por anos para explicar o envolvimento das MMPs nos processos de desenvolvimento, homeostase e doenças, levando a utilização de inibidores de MMPs em testes clínicos para o tratamento do câncer sem sucesso, levantando a questão se elas realmente podem ser alvos terapêuticos. Recentes estudos utilizando estudos de degradômica e proteômica em modelos de animais knockout para as MMPs tem mudado o dogma sobre as funções das MMPs, tendo funções dúbias tanto como protetoras como deletérias para os tecidos dependendo do processo biológico envolvido. As MMPs tiveram seus alvos proteolíticos específicos ampliados, incluindo outras moléculas da superfície celular e proteínas pericelulares não relacionadas à MEC, atuando assim na regulação do comportamento celular em várias vias, principalmente ao nível da sinalização celular. Estas incluem outras proteinases, substratos intracelulares, inibidores de proteinases, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes (pró-TGF- β , entre outros), proteínas ligadas a fatores de crescimento, receptores ancorados à membrana plasmática (integrinas, CD44, etc) e moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz (Butler et al., 2009; Lopez-Otin et al., 2009; Rodriguez et al., 2010; Bauvois, 2012; Mannello et al., 2012).

A maioria das MMPs ocupa papel central em condições fisiológicas normais (tais como diferenciação de células-tronco, proliferação, mobilidade celular, remodelação, cicatrização, angiogênese e apoptose) (Mannello et al., 2005; Malesud, 2006; Mannello et al., 2006) (Quadro 2.5) e a perda do balanço entre as MMPs e seus inibidores tem implicado em várias condições patológicas (tais como invasão tumoral, fibrose, etc) através de diferentes mecanismos, principalmente ligados a destruição tecidual, fibrose e alteração da composição da MEC (Malesud, 2006; Kessenbrock et al., 2010; Gialeli et

al., 2011). A superexpressão das MMPs em uma grande variedade de tumores malignos tem sido correlacionada à agressividade tumoral, estadiamento e fator prognóstico (Kessenbrock et al., 2010).

A TEM em tecidos adultos é regulada pela composição e estrutura da dos componentes da MEC e MMPs (Lochter et al., 1997; Radisky et al., 2010a). A MMP-3 e MMP-7 já foram demonstradas na promoção da TEM em estágios iniciais da transformação maligna de tumores de origem epitelial (Lochter et al., 1997; Noe et al., 2001). Além disso, tem se observado que a MMP-7 e MMP-14 são transcricionalmente regulados positivamente pela β -catenina, uma proteína que é tipicamente translocada para o núcleo durante a TEM e é também um alvo da sinalização da via do Wnt, sugerindo a conexão entre as MMPs e esta via de sinalização oncogênica (Crawford et al., 1999; Takahashi et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado que a MMP-3 é um alvo e regulador da TEM induzida por Wnt-1 (Blavier et al., 2010). A progressão tumoral e metástase em diversos tipos de câncer tem sido atribuído a regulação das MMPs (Pulyaeva et al., 1997; Yokoyama et al., 2003; Illman et al., 2006; Taki et al., 2006; Cao et al., 2008; Joseph et al., 2009; Ding et al., 2012; Fanelli et al., 2012; Lu et al., 2012).

2.6 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

O balanço entre as MMPs e seus inibidores é um pré-requisito necessário para o funcionamento de eventos fisiopatológicos envolvendo a remodelação da MEC (desenvolvimento, morfogênese, remodelação tecidual, inflamação, doenças degenerativas, crescimento tumoral, invasão e metástase) (Hadler-Olsen et al., 2011).

As MMPs podem ser inibidas reversivelmente por seus inibidores fisiológicos (TIMPs) (Bauer et al., 1975), irreversivelmente pela α 2-macroglobulina (serina proteinase que é a maior inibidora das MMPs do plasma sanguíneo) (Sottrup-Jensen et al., 1989), pela PZP (*pregnancy zone protein*) (Arbelaez et al., 1997), pelo domínio NC1 (produto da clivagem da extremidade C-terminal do colágeno tipo IV) (Netzer et al., 1998)

MMPs	Efeito biológico	Substrato Clivado
1	Reepitelização e migração de queratinócitos	Colágeno tipo I
13	Ativação de osteoclastos	Colágeno tipo I
2	Desenvolvimento de neurite	Proteoglicano sulfato de condroitina
7	Diferenciação de adipócitos	Fibronectina
1, 2, 3	Migração celular	Fibronectina
14	Migração celular	CD44
3	Apoptose de células epiteliais mamárias	Membrana basal
3	Formação do epitélio alveolar mamário	Membrana basal
3	Transição epitélio-mesênquima (células epiteliais mamárias)	E-caderina
2	Diferenciação de células mesenquimais com fenótipo inflamatório	
1	Agregação plaquetária	
3, 7, 9, 12	Geração de fragmentos tipo-angiostatina	Plasminogênio
Todas	Geração de fragmentos tipo-endostatina	Colágeno tipo XVIII
2, 3, 7, 9, 13	Afinidade maior por colágeno	BM-40 (SPARC / osteonectina)
14	Tubulogênese renal	Colágeno tipo I
3, 13	Liberação de bFGF	Perlecana
1, 2, 3, 7 e 19	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-3
Todas	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-5
11	Aumento da bioviabilidade de IGF1 e proliferação celular	IGFBP-1
Todas	Ativação de VEGF	CTGF
2, 14, 19	Migração de células epiteliais	Cadeia de laminina 5 γ 2
14	Migração de células epiteliais	Laminina 5 γ 3
Colagenases	Apoptose (células epiteliais amnióticas)	Colágeno tipo I
1, 3, 9	Pró-inflamatória	Processamento do IL-1 β a partir do precursor
9	Resistência de células tumorais	ICAM-1
1, 2, 3, 13, 14	Antiinflamatória	Proteína-3 quimiotóxica de monócitos
1, 2, 9	Antiinflamatória	Degradação de IL-1 β
2, 3, 7	Aumento da bioviabilidade de TGF- β	Decorina
3, 7	Agregação celular desagregada e aumento da invasão celular	E-caderina
14, 15, 16	Diminuição da adesão celular e spreading	Transglutaminase tecidual da superfície celular
7	Apoptose mediada pelo receptor de Fas	Ligante Fas
7	Pró-inflamatória	Pró-TNF α
7	Ativação de osteoclastos	Ligante RANK
9	Diminuição da resposta IL-2	IL-2R α

1	Ativação PAR1	Receptor 1 ativador de protease
2	Geração de vasoconstrictor	Endotelina
2	Conversão de vasodilatador em vasoconstrictor	Adrenomedulina
7	Vasoconstrição e crescimento celular	Ligante heparina EGF
2	Apoptose neural determinando neurodegeneração	Fator 1 α (SDF-1) estromal derivado de células
9	Bioviabilidade de TGF β	Precursor de TGF β
9	Neovascularização do timo	Colágeno tipo IV
9	Apoptose de condrócitos hipertróficos e recrutamento de osteoclastos	Galactina-3
14	Aderência do embrião ao epitélio uterino	MUC1, mucina transmembrana

Fonte:(Nagase et al., 2006b).

Quadro 2.5 – Efeitos biológicos mediados pela MMPs em situações fisiológicas

(Netzer et al., 1998), pela TFPI-2 (*tissue factor pathway inhibitor 2*) (Herman et al., 2001), pela CT-PCPE (*carboxy-terminal fragment of procollagen carboxy-terminal proteinase enhancer*), que apresenta um segmento C-terminal, que tem atividade inibidora de MMPs, com similaridades estruturais com o domínio N-terminal das TIMPs (Mott et al., 2000), pela proteína precursora da β -amilóide ligada a membrana (Miyazaki et al., 1993), pela trombospondina-2 (Yang et al., 2001) e pela glicoproteína RECK que é o único inibidor das MMPs ancorado à membrana plasmática (Takahashi et al., 1998).

2.6.1 – Inibidores Teciduais das MMPs (TIMPs)

As TIMPs são conhecidas como sendo os inibidores fisiológicos de todos os membros da família das MMPs (TIMPs 1-4). Estas apresentam de 37-51% de homologia na seqüência primária, mas exibem distintos perfis estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão (Quadro 2.6). São proteínas pequenas, de aproximadamente 21 kDa de peso molecular e variavelmente glicosiladas. Estas moléculas são compostas por dois domínios: (I) um domínio N-terminal, com cerca de 125 resíduos de aminoácidos, ligado a um oligosacarídeo/oligonucleotídeo, que representa dois terços da molécula, o grande *three-loop*; e (II) um pequeno domínio C-terminal com cerca de 65 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma estrutura secundária rica em folhas β -pregueadas, entretanto, pouco elucidada, o pequeno *three-loop* (Williamson et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1997; Tuuttila et al., 1998). A conformação tridimensional apresenta, então, 6 *loops* formados pelas 12 cisteínas que estabelecem as 6 pontes dissulfeto (Murphy et al., 1993; Williamson et al., 1994). As TIMPs são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular associadas a proteínas de membrana ou associadas a moléculas da MEC (Pavloff et al., 1992).

Além de sua função de inibidores das MMPs, as TIMPs exercem diversas atividades biológicas independentes das funções de inibidores das MMPs, tais como modulação da proliferação celular, migração e invasão, anti-angiogênicas e plasticidade sináptica. Estas funções podem ser originadas do processo de inibição das MMPs, como a regulação do catabolismo da MEC pode influenciar o

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Peso Molecular (kDa)	28	21	24/27	22
Locais de N-glicosilação	2	-	Parcial	-
Localização da Proteína	Solúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular	Insolúvel na MEC	Solúvel na MEC e Superfície Celular
Associação com pró-MMPs	Pró-MMP-9	Pró-MMP-2	Pró-MMP-9/ Pró-MMP-2	Pró-MMP-2
MMPs inibidas	MMP-9	Todas	Todas	Maioria
MMPs fracamente inibidas	MMP-14 MMP-16 MMP-19 MMP-24	-	-	-
Proliferação Celular	↑ Precusores Eritrocitários ↑ Células Tumorais	↑ Precusores Eritrocitários ↑ Células Tumorais ↑ Fibroblastos ↑ Células de Músculo Liso ↓ Células Endoteliais	↑ Células de Músculo Liso e Células Tumorais*	↑ Células Tumorais de Mama ↓ Células Tumorais de Wilm
Apoptose	↓ Células do Linfoma de Burkitt	↑ Células Tumorais Cólon-retais ↓ Melanoma	↑ Células de Músculo Liso ↑ Células Tumorais ↑ Células do Epitélio Pigmentado da Retina	↑ Fibroblastos Cardíacos
Angiogênese Tumoral	↑ Mama ↓ Fígado	↓ Melanoma ↓ Mama	↓ Melanoma	-
Angiogênese em colágeno 3D/gel de fibrina	Sem efeito	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Tumorigênicos	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe
Efeitos Metastásicos	Estimula	-	-	Estimula

Fonte: (Apte et al., 1995; Sato et al., 1996; Will et al., 1996; Bigg et al., 1997; Liu et al., 1997; Baker et al., 2002; Chirco et al., 2006; Brew et al., 2010b)

Quadro 2.6 - Classificação, propriedades bioquímicas e atuações biológicas das TIMPs

comportamento celular, mas, a maioria deles, tem sido observados de forma independente, através da interação direta com receptores da superfície celular específicos que induzem respostas celulares (Stetler-Stevenson, 2008).

Os animais que não possuem os genes das TIMPs são viáveis, apresentando alterações em diversos órgãos (Brew et al., 2010a). Animais mutantes para TIMP-2 não apresentam anormalidades anatômicas ou microscópicas e não perderam a capacidade reprodutiva, entretanto a ativação da pró-MMP-2 foi muito comprometida (Caterina et al., 2000), indicando que a sua função fisiológica especializada é a ativação da MMP-2 (Wang et al., 2000), já que estes animais apresentaram o mesmo fenótipo dos animais mutantes para a MMP-2 (Hayashi et al., 1997).

2.6.2 RECK

O gene *RECK* foi inicialmente identificado pela capacidade de induzir a reversão fenotípica de uma linhagem de fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) transformada pelo oncogene *RAS* ativado (transformação *v-Ki-RAS*) (Takahashi et al., 1998). Este gene é altamente expresso em diversos órgãos humanos e em camundongos, mas baixa ou indetectável expressão em linhagens celulares tumorais, além de poder ser regulado negativamente por diversos oncogenes, incluindo o *Ras* e *myc* (Takahashi et al., 1998; Sasahara et al., 1999a; Sasahara et al., 1999b).

RECK é um inibidor exclusivo das MMPs -2 (Takahashi et al., 1998) -9 (Oh et al., 2001a; Sasahara et al., 2002; Takagi et al., 2009) e MMP-14 (Oh et al., 2001a; Sasahara et al., 2002) e, aparentemente, da MMP-7 (Omura et al., 2009) *in vitro* e *in vivo*. O exato mecanismo molecular envolvido na regulação da secreção das MMPs e/ou da regulação da atividade enzimática por RECK ainda permanecem sem resposta, mas interações diretas proteína-proteína são requeridas, entretanto a estequiometria envolvida nestes eventos é desconhecida. Camundongos *knockout* para RECK (*RECK*^{-/-} e *RECK*^{+/-}) demonstraram que a maioria dos embriões homozigotos para a deleção morreram aos 10,5 dias de vida intra-uterina (E10,5) e o restante não ultrapassou os 11,5 dias de vida (E11,5). A análise histológica revelou que os tecidos mesenquimais apresentaram severo desarranjo na arquitetura

tecidual, anormal organogênese principalmente ao nível da angiogênese, pois o sistema vascular foi formado, mas as células endoteliais não eram capazes de formar túbulos.

Além disso, estes animais apresentaram altos níveis de MMP-2 ativa, entretanto, a pró-MMP-9 não foi detectada, e intensa degradação da MEC, principalmente na redução significativa de colágeno tipo I, comparado aos níveis em mutantes heterozigotos ou em indivíduos normais. Camundongos com dupla deleção para RECK/MMP-2 (*MMP-2^{-/-}* e *RECK^{-/-}*) sobreviveram 1 dia a mais que os animais *RECK^{-/-}* e apresentaram perfil anatômico e histológico parecidos, mas menos severos.

Com isso, muitas evidências sugerem que a desregulação das MMPs pode ter colaborado, em grande parte, para o fenótipo encontrado em camundongos *RECK^{-/-}*. Em camundongos normais (E10,5), RECK foi detectado em células ao redor de vasos sanguíneos (mais em células murais do que em células endoteliais), alta expressão ao redor do tubo neural e moderada no mesênquima e nos somitos, justamente no tecidos mais afetados nos animais *RECK^{-/-}* (Oh et al., 2001b).

A descoberta de que o colágeno tipo I é a proteína mais afetada em animais *RECK^{-/-}* e que camundongos homozigotos mutantes para o gene do colágeno $\alpha 1(I)$ também morrem *in utero* pela ruptura de grandes vasos sanguíneos (Lohler et al., 1984), sugere que RECK pode ser um regulador da remodelação da MEC através do controle da via de sinalização de Ras. Camundongos *knockout* para GAP, um regulador negativo de Ras, apresentam defeitos similares durante a angiogênese embrionária (Henkemeyer et al., 1995).

Nesta última década, muitos trabalhos tem demonstrado a participação de RECK como fator prognóstico em carcinomas, tais como carcinomas de cabeça e pescoço (Li et al., 2005a; Kato et al., 2008; Long et al., 2008; Cardeal et al., 2012; Chung et al., 2012a; Deng et al., 2012), de próstata (Rabien et al., 2007; Rabien et al., 2012; Reis et al., 2012), de bexiga (Wittschieber et al., 2011), osteosarcoma (Kang et al., 2007; Xu et al., 2010; Clark et al., 2011), de fígado (Chung et al., 2012b; Zhang et al., 2012); de mama (Span et al., 2003; Gomes et al., 2012; Vinothini et al., 2011; Zhang et al., 2012), de colo (Takeuchi et al., 2004; Song et al., 2006; van der Jagt et al., 2006; Li et al., 2012; Stenzinger et al., 2012;), de pâncreas (Masui et al., 2003; Kim et al., 2008; Tian et al., 2010), de pulmão (Takemoto et al., 2007) e colangiocarcinoma (Li et al., 2005b; Namwat et al., 2011). Muitos dos achados de

RECK em tumores têm correlacionado sua expressão com a diminuição da expressão das MMPs, acarretando em melhor prognóstico.

Nada se sabe sobre a participação de RECK na TEM.

2.7 Ativador das MMPs (EMMPRIN/CD147)

A EMMPRIN/CD147 é uma glicoproteína transmembrana altamente glicosilada pertencente à superfamília das imunoglobulinas, foi identificada independentemente em diferentes espécies e recebido várias designações, tais como M6, neutrelina, 5^A11, HT7, OX-47, CE9, EMMPRIN, Basigina e gp42 (Altruda et al., 1989; Miyauchi et al., 1990) (Seulberger et al., 1990; Fossum et al., 1991; Kasinrerker et al., 1992;). Células tumorais EMMPRIN/CD147 positivas induzem a expressão das MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-11 em cultura de fibroblastos (Kataoka et al., 1993; Biswas et al., 1995; Guo et al., 1997), assim ela foi designada como indutora de MMP (*Extracellular MMP Inducer*), entretanto não atua sobre inibidores das MMPs (TIMP-1 e TIMP-2) (Toole, 2003).

O controle da degradação da MEC é um pré-requisito para a invasão tumoral e metástase. Células de câncer de mama transfectadas com EMMPRIN/CD147 resultaram no aumento do crescimento tumoral e metástase após implantação na glândula mamária e correlacionada com altos níveis de MMP-2 e MMP-9 (Zucker et al., 2001). A EMMPRIN/CD147 tem sido associada a um grande número de moduladores da interação estroma-tumor, baseados nos achados da indução da produção das MMPs, estímulo da angiogênese via VEGF e resistência a drogas anti-câncer (Toole et al., 2008).

Expressão elevada de EMMPRIN/CD147 é correlacionada com a progressão tumoral em gliomas (Sameshima et al., 2000), tumores de células gigantes de osso (Si et al., 2003), carcinoma de faringe (Rosenthal et al., 2003), carcinoma de ovário (Davidson et al., 2003) e melanomas (Kanekura et al., 2002; van den Oord et al., 1997).

Recentemente, a EMMPRIN/CD147 foi demonstrada na promoção da TEM através da via do TGF- β e ser regulado transcricionalmente por Slug em hepatocarcinomas (Wu et al., 2011a).

As MMPs, TIMPs e RECK têm sido identificados em ameloblastomas e TOCC e associados com a remodelação da MEC e invasividade, como resumido no Quadro 2.7. Nada se conhece sobre a expressão e função de EMMPRIN/CD147 nos tumores odontogênicos benignos.

TOBs	MMPs	Inibidores (TIMPS e RECK)
Ameloblastoma	1 (Kumamoto et al., 2003; Pinheiro et al., 2004a; Ribeiro et al., 2009a), 2 (Kumamoto et al., 2003; Pinheiro et al., 2004a; Ribeiro et al., 2009a; Zhang et al., 2009a), 7 (Freitas et al., 2012), 9 (Kumamoto et al., 2003; Pinheiro et al., 2004b; Ribeiro et al., 2009b; Tsuneki et al., 2012a), 14 (Kumamoto; Ooya, 2006b; Zhang et al., 2009b) e 26 (Freitas et al., 2012)	1 (Kumamoto et al., 2003), 2 (Kumamoto et al., 2003) e Reck (Kumamoto ; Ooya, 2006b; Zhang et al., 2009a)
TOCC	1 (Ribeiro et al., 2011), 2 (Ribeiro et al., 2011), 7 (Ribeiro et al., 2011), 9 (Gong et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Tsuneki et al., 2012a) e 26 (Ribeiro et al., 2011)	

Quadro 2.7 - MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs e RECK) presentes em ameloblastoma e TOCC

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi delinear o perfil de expressão das MMPs (-2, -7, -9 e -14), seus inibidores (TIMPs -2, -3, -4 e RECK), seu ativador (EMMPRIN) e marcadores da TEM (Snail, Slug, N-caderina, Fibronectina, α -Actina de músculo liso e Vimentina) em Ameloblastomas e Tumores Odontogênicos Cístico Calcificantes.

Para tanto, nós tivemos como objetivos específicos:

1. Avaliar o perfil de expressão das MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14), seus inibidores (TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e RECK), seu ativador (EMMPRIN/CD147) por imuno-histoquímica;
2. Avaliar o perfil de expressão dos marcadores da Transição epitélio-mesenquimal (Snail, Slug, N-caderina, Fibronectina, α -Actina de músculo liso e Vimentina) por imuno-histoquímica;
3. Avaliar a comparação da expressão de cada molécula avaliada em cada compartimento celular (epitélio e estroma) e correlação entre as moléculas avaliadas no mesmo tumor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa em 08/08/2011, protocolo 82/11, CAAE nº 0094.0.017.000-11, conforme anexo.

4.2 Casuística

Para a seleção da casuística foi realizado um levantamento dos casos diagnosticados como “Folículo ou Capuz Dentário”, “Ameloblastoma” e “Tumor Odontogênico Cístico Calcificante” (TOCC) pertencentes ao arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da FOU SP (de 2000 a 2012), utilizando-se o *software* “Laudo & Imagem”. Foram selecionados 3 casos de folículo dentário (utilizado como controle de epitélio odontogênico normal remanescente da odontogênese), 19 casos de ameloblastoma sólido/multicístico (11 casos plexiformes, 6 foliculares e 2 mistos – utilizado como tumor localmente mais invasivo localmente) (Quadro 4.1) e 18 casos de TOCC (utilizado como tumor localmente menos invasivo localmente) (Quadro 4.2). Os cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina foram analisados e apenas casos com diagnóstico confirmado, representativos e com material suficiente para a análise imuno-histoquímica foram selecionados.

4.3 Método de Imuno-histoquímica (IHC)

Os blocos parafinados foram seccionados em micrótomo (Leica, 4µm) e colocados sobre lâminas silanizadas¹ e secas em estufa a 60°C por 48 horas. Os

¹ Silanização da lâminas: lâminas submersas em silano (3-aminopropyltriethoxy-silano, A3648, Sigma-Aldrich) a 10% em álcool absoluto, lavadas em água MilliQ e secas a 60°C por 24 horas.

cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcool (100% e 70%) e tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,4). A inativação de cargas livres foi feita com incubação em solução de Bórax a 1% (X, Sigma-Aldrich) por 15 min e bloqueio da peroxidase endógena em solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% (K42321710, Merck - diluído em PBS) por 45 minutos. A recuperação antigênica foi realizada através de exposição dos epítomos por calor (*heat-induced epitope retrieval* - HIER), através de solução de tampão citrato-fosfato (10 mM, pH 6,0 e entre 95-100 °C, P4809, Sigma-Aldrich) em *steamer* por 20 min e resfriamento por 20 min. O bloqueio de interações inespecíficas foi realizada por incubação em solução de leite sem gordura a 4% (Leite desnatado em água MilliQ) por 20 min ou Solução de Bloqueio (X0909, *Protein Block Serum-Free*, DAKO) por 10 min (vide Quadro 4.3). Os cortes foram incubados com anticorpos primários (vide Quadro 4.3) em câmara úmida, *overnight* (16h) a 4°C, diluídos em solução de diluição (S3022, *Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DAKO) ou solução de PBS/BSA a 1% (vide Quadro 4.3). Utilizamos os seguintes kits para a visualização: I) LSAB + System-HRP (K0690, DAKO) para anticorpos primários produzidos em cabra (*goat*), baseado no método de duas etapas e na tecnologia da estreptoavidina-biotina onde o anticorpos secundário está conjugado a biotina e a estreptoavidina está conjugada a peroxidase (HRP – *horseradish peroxidase*) – por 30 min no reagente A e B; e II) EnVision™+ Dual Link System-HRP (K4061, DAKO) para anticorpos primários produzidos em camundongo (*mouse*) ou coelho (*rabbit*), baseado no método de duas etapas e na tecnologia de cadeia polimérica conjugada onde o polímero está conjugado ao anticorpo secundário e a peroxidase – por 30 min (Figura 4.1). A detecção foi realizada com solução de DAB (DAB+ Chromogen, Liquid DAB Substrate Chromogen System, K3468, DAKO) (vide Quadro 4.3) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. As lâminas foram montadas com médio de montagem permanente específico para a preservação da coloração gerada pelo cromógeno DAB (VectaMount™ Mounting Medium, H-5000, Vector Laboratories). As lavagens entre as etapas discriminadas acima foram realizadas com tampão PBS/Triton 0,1% (pH 7,4), 2 vezes por 5 min.

Como controle positivo, nós utilizamos tecidos com conhecida positividade para os anticorpos em questão (vide Quadro 4.3) e, como controle negativo, a omissão do anticorpo primário e utilização da solução de diluição de anticorpo ou PBS/BSA a 1%.

Casos	Gênero	Idade (anos)	Localização	Subtipo
1	Feminino	24	Posterior da mandíbula	Plexiforme
2	Masculino	61	Corpo da mandíbula	Plexiforme
3	Feminino	56	Corpo e ramo da mandíbula	Folicular
4	Masculino	35	Corpo da mandíbula	Plexiforme
5	Masculino	14	Mandíbula	Misto
6	Feminino	33	Ramo e parasínfise esquerda	Folicular
7	Masculino	39	Corpo da mandíbula esquerda	Plexiforme
8	Feminino	33	Corpo da mandíbula esquerda	Folicular
9	Feminino	28	Ramo e ângulo da mandíbula esquerda	Plexiforme
10	Feminino	44	Corpo da mandíbula esquerda e direita	Folicular
11	Masculino	35	Não informado	Plexiforme
12	Masculino	14	Corpo e ramo da mandíbula	Misto
13	Masculino	32	Rebordo alveolar 43	Folicular
14	Feminino	36	Sínfise da mandíbula	Plexiforme
15	Feminino	48	Rebordo alveolar retromandibular	Plexiforme
16	Masculino	41	Seio maxilar e maxila direita	Plexiforme
17	Feminino	40	Corpo da mandíbula	Plexiforme
18	Feminino	57	Mandíbula	Folicular
19	Feminino	26	Corpo e ramo da mandíbula	Plexiforme

Quadro 4.1 – Dados clínicos e histológicos dos pacientes diagnosticados com ameloblastoma

Casos	Gênero	Idade (anos)	Localização
1	Masculino	39	Maxila
2	Masculino	40	Maxila
3	Masculino	36	Maxila
4	Feminino	21	Maxila
5	Feminino	27	Mandíbula
6	Masculino	28	Não informado
7	Feminino	26	Maxila anterior
8	Masculino	19	Maxila anterior
9	Feminino	14	Maxila direita
10	Feminino	20	Maxila anterior
11	Feminino	20	Maxila anterior
12	Masculino	26	Ângulo da mandíbula direita
13	Feminino	28	Não informado
14	Feminino	21	Maxila
15	Masculino	47	Mandíbula
16	Masculino	39	Mandíbula parasínfise direita
17	Masculino	15	Maxila direita
18	Masculino	25	Maxila anterior

Quadro 4.2 – Dados clínicos e histológicos dos pacientes diagnosticados com TOCC

Figura 4.1 - Representação esquemática dos métodos empregados em imuno-histoquímica: (A) tecnologia da Estreptoavidina-biotina (LSAB) e (B) tecnologia de cadeia polimérica conjugada (EnVision) (*Adaptado de DAKO Handbook for Immunohistochemical Staining*)

4.4 Análise Descritiva da Imuno-histoquímica

A análise descritiva da imunomarcção foi realizada considerando o compartimento epitelial (epitélio odontogênico neoplásico) e compartimento estromal (adjacente a camada epitelial ou entre ela, considerando células endoteliais e fibroblastos e desconsiderando o tecido inflamatório – podendo ser um efeito secundário desencadeado pelo procedimento de marsupialização dos tumores ou pelo contato com a cavidade bucal) e o tipo de imunomarcção: nuclear, citoplasmática, de membrana ou da MEC. Esta análise foi realizada por dois avaliadores independentes.

4.5 Análise Semi-Quantitativa da Imuno-histoquímica

A análise semi-quantitativa e não-automatizada da intensidade de imunomarcção do epitélio odontogênico neoplásico e do estroma foi realizada empregando um sistema de escore: ausente (-), leve (+), moderado (++) ou intenso (+++). Além disso, empregamos um sistema de escore para a extensão da imunomarcção (aumento de 200x), agora considerando apenas o epitélio neoplásico, segundo os seguintes critérios: I) 0-10% (negativo); II) 10-50%; III) 50-75%; e IV) 75-100%. Esta análise foi realizada por dois avaliadores independentes

Anticorpo	Tipo do Anticorpo	Animal Hospedeiro	Empresa	Código	Bloqueio Interações Inespecíficas	Diluição AC Primário e Concentração	Kit de Visualização	Tempo de DAB (min)	Tecido Controle Positivo
MMP-2*	Policlonal	Coelho	Abcam	ab37150	Solução Bloqueadora	1:250 (4 µg/mL)	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
MMP-7	Policlonal	Coelho	Novus Biologicals	NB600-1153	Leite	1:500 (2 µg/mL)	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
MMP-9	Monoclonal	Coelho	Abcam	ab76003	Solução Bloqueadora	1:200	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
MMP-14	Monoclonal	Coelho	Novus Biologicals	NB110-57216	Leite	1:500 (0,2 µg/mL)	EnVision	5	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
TIMP-2	Monoclonal	Camundongo	Calbiochem	IM56	Leite	1:500 (2 µg/mL)	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
TIMP-3	Policlonal	Coelho	Abcam	ab39185	Leite	1:200 (5 µg/mL)	EnVision	5	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
TIMP-4	Policlonal	Coelho	Abcam	ab58425	Leite	1:200 (5 µg/mL)	EnVision	5	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
RECK	Monoclonal	Coelho	Cell Signaling	3433	Leite	1:50	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
Fibronectina	Monoclonal	Camundongo	Calbiochem	CP70	Leite	1:100 (2 µg/mL)	EnVision	5	Carcinoma de Colo humano
Vimentina	Monoclonal	Camundongo	Abcam	ab8069	Leite	1:500 (2 µg/mL)	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
α-SMA	Monoclonal	Camundongo	Abcam	ab54723	Leite	1:1.000 (0,45 µg/mL)	EnVision	5	Carcinoma Epidermóide de Boca humano
EMMPRIN/CD147	Policlonal	Coelho	Abcam	ab70062	Leite	1:500 (2 µg/mL)	EnVision	7	Carcinoma Epidermóide de Boca humano

N-caderina	Policlonal	Coelho	Abcam	ab12221	Leite	1:500 (4 µg/mL)	EnVision	7	Embrião de camundongo
SNAIL	Policlonal	Cabra	Abcam	ab53519	Leite	1:75 (7,5 µg/mL)	LSAB	7	Rim camundongo
SLUG	Policlonal	Coelho	Abcam	ab27568	Leite	1:100 (8 µg/mL)	EnVision	7	Rim camundongo

* Como indicação do fabricante, este anticorpo não passou pela etapa de recuperação antigênica.

Quadro 4.3 - Descrição dos anticorpos primários utilizados na reação de imuno-histoquímica

4.6 Análise Estatística da Imuno-histoquímica

A análise estatística foi realizada considerando dois aspectos: I) comparação da ausência (casos negativos) ou presença (casos positivos) encontrada para cada molécula avaliada em cada compartimento (epitélio ou estroma) no ameloblastoma e no TOCC (Teste Exato de Fisher^{•\$}); e II) tendência de associação entre as moléculas avaliadas nos tumores odontogênicos (Análise de Correlação de Spearman²). Para todos os testes, o critério de determinação de significância adotado foi de 5%, ou seja, quando o valor de p do teste estatístico é menor ou igual a 0,05 existe significância estatística. Utilizamos a planilha eletrônica MS-Excel, em sua versão do MS-Office 2010, para a organização dos dados, e o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 20.0, para a obtenção dos resultados.

^{•\$} Teste não-paramétrico: este teste é utilizado para comparar dados de grupos independentes em tabelas 2x2 quando o número total de casos é menor que 20.

² O coeficiente de correlação linear r entre as variáveis X e Y mede o grau de associação ou de relação linear mútua entre as variáveis X e Y.

5 RESULTADOS

Para todas as proteínas/enzimas empregadas neste trabalho, nós avaliamos a sua expressão no capuz dentário, no qual verificamos a presença do epitélio reduzido do órgão do esmalte e o tecido conjuntivo, geralmente, frouxo e ricamente vascularizado. As proteínas/enzimas ausentes foram MMP-9, RECK, TIMP-2, Snail e Slug. A α -SMA foi a única encontrada tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo (Figura 5.1A). A N-caderina e EMMPRIN/CD147 foram localizadas somente no epitélio reduzido do esmalte (Figura 5.1B e C, respectivamente). A MMP-2, MMP-7, TIMP-3, TIMP-4, fibronectina e vimentina somente no tecido conjuntivo (Figura 5.1D-I, respectivamente).

5.1 Análise Descritiva, Semi-quantitativa e Estatística da Imuno-histoquímica para os Ameloblastomas

O epitélio odontogênico neoplásico, bem como células do retículo estrelado foram categorizadas “epitélio” e o “estroma” foi considerado toda a área adjacente ao epitélio sem considerar o infiltrado inflamatório, e a análise “semi-quantitativa” está mostrada na Tabela 5.1.

5.1.1 MMPs, TIMPs, RECK e EMMPRIN/CD147

A MMP-2 foi detectada em todos os casos no epitélio e na maioria no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos (58% - 11) foram imunolocalizados de 10-50% das células, 32% (6) de 0-10% e 11% (2) de 50-75%, sendo a maioria dos casos, com intensidade moderada (69% - 13), leve em 26% (5) e intenso em 5% (1). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.2A e B). No compartimento estromal, a maioria dos casos apresentou intensidade leve (50% - 9), moderado em 16% (3) e intenso em 11% (2), em células endoteliais,

fibroblastos e na MEC. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.2C). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “moderado x ausente” e “moderado x fraco” (26% - 5, em cada), seguido de “leve x leve” (21% - 4), “moderado x intenso” (11% - 2) e “fraco x moderado”, “moderado x moderado” e “intenso x moderado” (5% - 1, em cada), respectivamente. Marcação difusa nas células, espaços intercelulares e MEC.

A MMP-7 foi detectada na maioria dos casos no epitélio e ausente na maioria do estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos (58% - 11) foi imunolocalizada de 0-10%, 37% (7) de 10-50% e 11% (2) de 50-75%, sendo com a maioria com intensidade leve (53% - 10), 26% (5) moderada e 5% (1) intensa. Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.2D e E). No compartimento estromal, a maioria dos casos não houve detecção (84% - 16), 11% moderado e 5% leve e intenso (1 caso em cada), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.2F). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “leve x ausente” (58% - 11), seguido de “moderado x ausente” (16% - 3), “moderado x moderado” (11% - 2) e “ausente x leve” e “intenso x intenso” (5% - 1, em cada) respectivamente. Marcação difusa nas células, espaços intercelulares e MEC.

A MMP-9 não foi detectada na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, em todos os casos as células foram imunolocalizadas de 0-10%, sendo apenas 1 caso positivo (5%) com intensidade moderada. Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.2G e H). No compartimento estromal, verificamos o mesmo padrão observado para o epitélio, tendo apenas 1 caso positivo (5%) com intensidade moderada (Figura 5.2G e H). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos (Figura 5.2G e H). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “ausente x ausente” (95% - 18) e “moderado x moderado” (5% - 1).

A MMP-14 foi detectada em todos os casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos (63% - 12) foram imunolocalizados de 75-100% das células, 21% (4) de 10-50% e 16% (3) de 50-75%, sendo a maioria dos casos, com intensidade intensa (53% - 10), moderada em 42% (8) e leve em 5% (1). Na maioria dos casos, encontramos um padrão homogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.3A e B). No compartimento estromal, a maioria dos casos apresentou intensidade moderada em 47% (9) dos casos, leve em 42% (8) e intenso em 11% (2), em células endoteliais e fibroblastos (Figura 5.3A e B). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.3C). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “moderado x fraco” (26% - 5), seguido de “intenso x moderado” (21% - 4), “moderado x moderado” e “intenso x intenso” (16% - 3, em cada), “fraco x moderado” (5% - 1), respectivamente.

A TIMP-2 foi detectada em todos os casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos (47% - 9) foram imunolocalizados de 10-50% das células, 32% (6) de 50-75%, 11% (2) de 75-100% e 11% (2) de 0-10%, sendo a maioria dos casos, com intensidade moderada (53% - 10), leve em 26% (5) e intensa em 21% (4). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.3D e E). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade intensa e moderada (45% - 9, em cada) dos casos e leve em 16% (3), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.3D e E). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.3F). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “moderado x moderado” (26% - 5), seguido de “moderado x intenso” (21% - 4), “leve x moderado” ou “intenso x intenso” (16% - 3, em cada), “leve x leve”, “leve x intenso”, “moderado x leve” e “intenso x leve” (5% - 1, em cada), respectivamente. Marcação difusa nas células, espaços intercelulares e MEC.

A TIMP-3 foi detectada em todos os casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 75-100% (47% - 9), 32% (6) de 50-75% e 21% (4) de 10-50%, sendo a maioria dos casos com intensidade intensa (69% - 13), 26% (5) moderada e 5% (1) leve. Na

maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.3G e H). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada (74% - 14) dos casos, intensa em 16% (3) e leve em 11% (2), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.3I). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “intenso x moderado” (58% - 11), seguido de “moderado x moderado” e “moderado x intenso” (11% - 2 em cada), “leve x moderado” ou “intenso x fraco” ou “intenso x intenso” (5% - 1, em cada), respectivamente. Marcação difusa nas células, espaços intercelulares e MEC.

A TIMP-4 foi detectada em todos os casos tanto no epitélio quanto no estroma. No comportamento epitelial, a maioria dos casos (63% - 12) imunolocalizados de 75-100% dos casos, 21% (4) de 50-75%, 11% (2) de 10-50% e 5% (1) de 0-10%, sendo a maioria com intensidade intensa (79% - 15) e 21% (4) moderada. Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.4A e B). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade intensa (89% - 17) e leve em 11% (2), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.4A e B). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.4C). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “intenso x moderado” (79% - 15), seguido de “moderado x moderado” e “moderado x leve” (11% - 2, em cada). Curiosamente, a maioria da imunomarcação foi localizada no núcleo, sendo esperada difusa nas células, espaços intercelulares e MEC.

O RECK foi detectado em cerca de metade dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (58% - 11), 16% (3) de 50-75%, 21% (4) de 10-50% e 5% (1) de 75-100%, sendo alguns casos com intensidade moderada (26% - 5), leve em 11% (2) e intensa em 5% (1). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.4D e E). No compartimento estromal, alguns casos com intensidade leve (42% - 8) e leve em 5% (12), em células endoteliais e fibroblastos. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o

osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.4F). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “ausente x ausente” (53% - 10), seguido de “moderado x leve” (26% - 5) e “ausente x leve”, “leve x leve”, “leve x moderado” e “intenso x leve” (5% - 1, em cada), respectivamente. Marcação de membrana e difusa nas células.

A EMMPRIN/CD147 não foi detectada na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (79%, 15), 16% (3) de 10-50% e 5% (1) de 50-75%, sendo em alguns casos com intensidade moderada (21% - 4) e leve em 11% (2). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.4G e H). No compartimento estromal, apenas em 1 caso (5%) com intensidade leve, em células endoteliais e fibroblastos. Não observamos imunomarcagem no fronte ósseo. Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “ausente x ausente” (68% - 13), seguido de “moderado x ausente” (16% - 3) e “moderado x leve” (5% - 1). Marcação de membrana e difusa nas células.

5.1.2 Marcadores da Transição Epitélio-Mesenquimal

A N-caderina foi detectada na maioria do epitélio e ausente no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (53%, 10), 32% (6) de 10-50% e 16% (3) de 50-75%, sendo a maioria dos casos com intensidade moderada (37% - 7) e leve em 32% (6). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.5A e B). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.5C). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “moderado x ausente” (37% - 7), seguido de “leve x ausente” (32% - 6), “ausente x ausente” (26% - 4) e “intenso x ausente” (11% - 2). Marcação citoplasmática de forma granular e difusa nas células.

O Snail foi detectado na maioria dos casos no epitélio e em alguns casos no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (63% - 12), 16% (3) de 10-50%, 26% (4) de 50-75%, sendo a maioria dos

casos com intensidade leve (37% - 7), moderada e intensa em 11% (2, em cada). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.4D e E). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade leve e moderada (16% - 3, em cada) e intenso em 5% (1), em células endoteliais e fibroblastos. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.5F). Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “ausente x ausente” (42% - 8), seguido de “leve x ausente” e “leve x leve” (21% - 4, em cada), “moderado x moderado”, “intenso x moderado” e “intenso x intenso” (5% - 1, em cada). Marcação predominantemente nuclear e também difusa no citoplasma celular.

O Slug foi detectado em alguns casos no epitélio e estroma, mas, a maioria ausente em ambos. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (84% - 17), 5% (1) de 10-50% e 5% (1) de 50-75%, sendo com intensidade leve e moderada (5% - 1, em cada). Na maioria dos casos, encontramos um padrão heterogêneo de positividade das células epiteliais odontogênicas e do retículo estrelado (Figura 5.5G). No compartimento estromal, os casos positivos com intensidade leve e moderada (5% - 1, em cada), em células endoteliais e fibroblastos. Não encontramos células positivas junto ao fronte ósseo. Os padrões “epitélio x estroma” encontrados foram: “ausente x ausente” (63% - 12), seguido de “leve x ausente” (26% - 5), “moderado x leve” e “intenso x leve” (5% - 1, em cada). Marcação predominantemente nuclear e também difusa no citoplasma celular.

A fibronectina foi ausente na maioria dos casos no epitélio (84% - 17) e, ao contrário, presente na maioria dos casos no estroma (84% - 17). No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram imunolocalizados de 0-10% (84% - 17) e 11% (2) de 10-50%, sendo com intensidade leve (11% - 2). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade leve em 74% (14) e moderada em 16% (3) (Figura 5.6A e B). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram moderadamente marcadas (Figura 5.6C). O padrão “epitélio x estroma” mais encontrado foi “ausente x moderado” (37% - 7), seguido de “ausente x leve” (32% - 6), “ausente x intenso” (21% - 4) e “ausente x ausente” (11% - 2). Marcação de MEC e espaços intercelulares.

A vimentina foi ausente no epitélio de todos os casos e presente no estroma de todos os casos. No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada (37% - 7), leve (32% - 6) e intensa (26% - 4), em fibroblastos, células endoteliais e MEC (Figura 5.6D e E). O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram intensamente marcadas (Figura 5.6F). O padrão “epitélio x estroma” mais encontrado foi “ausente x leve” (68% - 13), seguido de “ausente x moderado” e “leve x moderado” (11% - 2, para cada) e “ausente x ausente” e “leve x leve” (5% - 1, em cada), respectivamente.

A α -SMA foi detectada na maioria dos casos no epitélio e em todos os casos no estroma. No compartimento epitelial, a maioria dos casos foram de 10-50% e 50-75% (32% - 6, em cada), de 0-10% (26% - 5) e de 75-100% (11% - 2), sendo a maioria dos casos com intensidade moderada em 37% (7), leve em 32% (6) e intenso em 11% (2) (Figura 5.6G e H). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada em 47% (9) dos casos, leve em 32% (6) e intenso em 21% (4). O padrão “epitélio x estroma” mais encontrado foi “fraco x moderado” (26% - 5), seguido de “moderado x fraco” (16% - 3), “ausente x leve”, “ausente x moderado”, “moderado x moderado” e “moderado x intenso” e “moderado x intenso” (11% - 2, em cada) e “leve x intenso”, “intenso x leve” e “intenso x intenso” (5%, - 1, em cada), respectivamente. O fronte ósseo foi observado em 42% (8) dos casos, onde verificamos o padrão onde células em contato com o osso foram intensamente marcadas (Figura 5.6I). Marcação citoplasmática.

Tabela 5.1 – Distribuição percentual da análise semi-quantitativa das imunomarcações das proteínas/enzimas nos ameloblastomas

Ameloblastoma (n=19)	Estroma					Epitélio					Epitélio (Extensão)				Padrão Epitélio x Estroma mais frequentes e N. Casos
	-	+	++	+++	Casos Positivos	-	+	++	+++	Casos Positivos	0-10%	10- 50%	50- 75%	75- 100%	
MMP-2	5 (26%)	9 (47%)	3 (16%)	2 (11%)	n=14 (74%)	-	5 (26%)	13 (69%)	1 (5%)	n=19 (100%)	6 (32%)	11 (58%)	2 (11%)	-	“Moderado x Ausente” (n=5 – 26%) e “Moderado x Fraco” (n=5 – 26%)
MMP-7	16 (84%)	1 (5%)	2 (11%)	1 (5%)	n=5 (26%)	4 (21%)	10 (53%)	5 (26%)	1 (5%)	n=16 (84%)	11 (58%)	7 (37%)	2 (11%)	-	“Leve x Ausente” (n=11 – 58%)
MMP-9	18 (95%)	-	1 (5%)	-	n=1 (5%)	18 (95%)	-	1 (5%)	-	n=1 (5%)	19 (100%)	-	-	-	Maioria sem marcação em ambos (n=18 – 95%)
MMP-14	-	8 (42%)	9 (47%)	2 (11%)	n=19 (100%)	-	1 (5%)	8 (42%)	10 (53%)	n=19 (100%)	-	4 (21%)	3 (16%)	12 (63%)	“Moderado x Leve” (n=5 – 26%) e “Intenso x Moderado” (n=4 – 21%)
TIMP-2	-	3 (16%)	8 (42%)	8 (42%)	n=19 (100%)	-	5 (26%)	10 (53%)	4 (21%)	n=19 (100%)	2 (11%)	9 (47%)	6 (32%)	2 (11%)	“Moderado x Moderado” (n=5 – 26%) e “Moderado x Intenso” (n=4 – 21%)
TIMP-3	-	2 (11%)	14 (74%)	3 (16%)	n=19 (100%)	-	1 (5%)	5 (26%)	13 (69%)	n=19 (100%)	-	4 (21%)	6 (32%)	9 (47%)	“Intenso x Moderado” (n=11 – 58%)
TIMP-4	-	2 (11%)	17 (89%)	-	n=19 (100%)	-	-	4 (21%)	15 (79%)	n=19 (100%)	1 (5%)	2 (11%)	4 (21%)	12 (63%)	“Intenso x Moderado” (n=15 – 79%)
RECK	9 (47%)	8 (42%)	1 (5%)	-	n=9 (47%)	11 (58%)	2 (11%)	5 (26%)	1 (5%)	n=8 (42%)	11 (58%)	4 (21%)	3 (16%)	1 (5%)	Maioria sem marcação (n=10 – 53%) – “Moderado x Leve” (n=5 – 79%)
EMMPRIN/CD14 7	18 (95%)	1 (5%)	-	-	n=1 (5%)	13 (69%)	2 (11%)	4 (21%)	-	n=6 (32%)	15 (79%)	3 (16%)	1 (5%)	-	Maioria sem marcação em ambos (n=13 – 68%) – “Moderado x Ausente” (n=3 – 16%)
N-Caderina	19 (100 %)	-	-	-	-	4 (26%)	6 (32%)	7 (37%)	2 (11%)	n=15 (79%)	10 (53%)	6 (32%)	3 (16%)	-	“Moderado x Ausente” (n=7 – 37%) e “Leve x Ausente” (n=6 – 32%)
Fibronectina	2 (11%)	14 (74%)	3 (16%)	-	n=17 (84%)	17 (84%)	2 (11%)	-	-	n=2 (11%)	17 (84%)	2 (11%)	-	-	“Ausente x Leve” (n=13 – 68%), “Ausente x Moderado” (n=2 – 11%) e “Leve x Moderado” (n=2 – 11%)
Vimentina		6 (32%)	7 (37%)	4 (26%)	n=17 (84%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	“Ausente x Moderado” (n=7 – 37%) e “Ausente x Leve” (n=6 – 32%)

α-SMA	-	6 (32%)	9 (47%)	4 (26%)	n=19 (100%)	4 (26%)	6 (32%)	7 (37%)	2 (11%)	n=15 (79%)	5 (26%)	6 (32%)	6 (32%)	2 (11%)	“Leve x Moderado” (n=5 – 26%)
Snail	12 (63%)	3 (16%)	3 (16%)	1 (5%)	n=7 (37%)	8 (42%)	7 (37%)	2 (11%)	2 (11%)	n=11 (58%)	12 (63%)	3 (16%)	4 (26%)	-	Maioria sem marcação em ambos (n=8 – 42%) e “Leve X Ausente” (n=4 – 21%) e “Leve x Leve” (n=4 – 21%)
Slug	17 (89%)	1 (5%)	1 (5%)	-	n=2 (11%)	12 (63%)	1 (5%)	1 (5%)	-	n=2 (11%)	17 (84%)	1 (5%)	1 (5%)	-	Maioria sem marcação em ambos (n=12 – 63%) e “Leve x Ausente” (n=5 – 26%)

Figura 5.1 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7, TIMP-3, TIMP-4, Fibronectina, Vimentina, EMMPRIN/CD147, N-caderina e α-SMA no capuz dentário. E: epitélio reduzido do órgão do esmalte, TC: tecido conjuntivo, VS: vasos sanguíneos. Barra: 200 μm.

Figura 5.2 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7 e MMP-9 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: frente ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.

Figura 5.3 - Imunolocalização das MMP-14, TIMP-2 e TIMP-3 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μm.

Figura 5.4 - Imunolocalização das TIMP-4, RECK e EMMPRIN/CD147 em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μ m.

Figura 5.5 - Imunolocalização das N-caderina, Snail e Slug em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: fronte ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.

Figura 5.6 - Imunolocalização das Fibronectina, Vimentina e α -SMA em ameloblastomas. Eo: epitélio odontogênico, Es: estroma, FO: frente ósseo, RE: retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.

5.2 Análise Descritiva, Semi-quantitativa e Estatística da Imuno-histoquímica para os Tumores Odontogênicos Cístico Calcificante (TOCC)

O compartimento epitelial foi caracterizado epitélio ameloblastomatoso caracterizado por células pré-ameloblásticas basais cubóides/baixas colunares e células tipo-retículo estrelado suprabasais com aglomerados dispersos de células-fantasma com metaplasia escamosa ocasional. Todos estes tipos celulares foram englobados como “epitélio” e o “estroma” foi considerado toda a área adjacente ao epitélio sem considerar o infiltrado inflamatório, e a análise “semi-quantitativa” está mostrada na Tabela 5.2.

5.2.1 – MMPs, TIMPs, RECK e EMMPRIN/CD147

A MMP-2 foi positiva em todos os casos no epitélio e, na maioria dos casos, no estroma. No compartimento epitelial, metade dos casos (50% - 9) foram imunolocalizados de 75-100% das células, 33% (6) de 50-75%, 11% (2) de 10-50% e 6% (1) de 0-10%, sendo a metade dos casos, com intensidade moderada e intensa (50% - 9, para cada). Na maioria dos casos, encontramos apenas as células-fantasma marcadas em seu interior, com intensidades variadas, mas predominantemente moderado/intenso e, as vezes, próximas de zonas de calcificação (Figura 5.7A). Em outros casos, observamos as células epiteliais basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas com células-fantasma positivas em seu interior (Figura 5.7B). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada em 61% (11) dos casos, intenso em 17% (3) e leve em 17%, em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.7B). Assim, verificamos os padrões de imunomarcção para “epitélio x estroma”: “intenso x moderado” (n=6 – 33%), seguido de “moderado x moderado” (n=5 – 27%), “moderado x leve” e “intenso x intenso” (n=3 - 17%, em cada) e “moderado x ausente” (n=1 - 5%).

A MMP-7 foi positiva tanto nas células do epitélio quanto do estroma de 100% (18) dos casos. No compartimento epitelial, 44% (8) dos casos foram

imunolocalizados de 75-100% das células, 27% (5) de 50-75% e 27% (5) de 10-50%, sendo a metade dos casos, com intensidade moderada em 50% (9) dos casos, leve em 33% (6) e intenso em 17% (3). Na maioria dos casos, encontramos as células epiteliais basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas com células-fantasma levemente positivas ou não (Figura 5.7D) e, em alguns casos, somente nas células-fantasma (Figura 5.7C). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada em 56% (10), leve em 33% (6) e intenso em 11% (2), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.7D). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “moderado x moderado” (n=6 – 33%), seguido de “leve x leve” (n=4 – 22%), “moderado x leve”, “intenso x moderado” e “leve x moderado” (n=2 – 11%, em cada) e “intenso x intenso” (n=1 – 5%).

A MMP-9 foi positiva na maioria dos casos no epitélio e negativa no estroma. No compartimento epitelial, 56% (10) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células, 27% (5) de 0-10%, 11% (2) de 50-75% e 5% (1) de 75-100%, sendo a maioria dos casos, com intensidade moderada em 44% (8), leve em 27% (5), intenso em 17% (3) e 11% (2). Na maioria dos casos, encontramos apenas algumas as células-fantasma marcadas em seu interior, com intensidades variadas (Figura 5.7E). No compartimento estromal, a maioria dos casos não houve marcação 84% (15), moderado em 11% (2) e fraco em 5% (1), em poucos fibroblastos e na MEC (Figura 5.7E). Como controle interno, observamos muitas áreas de inflamação com células intensamente positivas (Figura 5.7F). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “moderado x ausente” (n=7 – 39%), seguido de “leve x ausente” (n=5 – 27%), “ausente x ausente” (n=2 – 11%), “moderado x moderado”, “intenso x ausente”, “intenso x leve” e “intenso x moderado” (n=1 – 5%).

A MMP-14 foi encontrada na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, 39% (7) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células, 27% (5) de 50-75%, 22% (4) de 75-100% e 11% (2) de 0-10%, sendo a metade dos casos, com intensidade moderada (50% - 9), leve em 27% (5) e intenso em 22% (4). Na maioria dos casos, encontramos as células epiteliais basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas com algumas células-fantasma levemente positivas (Figura 5.7G e H). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade moderada em 61% (12) dos casos, leve em

22% (4) e intenso em 6% (1), em fibroblastos (Figura 5.7H). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “moderado x moderado” (n=7 – 39%), seguido de “leve x moderado” (n=3 – 17%), “leve x leve” e “intenso x moderado” (n=2 – 11%, em cada), “moderado x fraco”, “moderado x fraco”, “moderado x ausente”, “intenso x fraco” e “intenso x intenso” (n=1 – 5%, em cada).

A TIMP-2 foi encontrada na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, a imunomarcacão foi localizada apenas no interior de algumas células-fantasma (Figura 5.8A). No compartimento estromal, em fibroblastos e MEC. Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “leve x leve” (n=6 – 33%) e “leve x moderado” (n=6 – 33%), seguido de “ausente x ausente” (n=3 – 17%), “moderado x moderado”, “fraco x intenso” e “moderado x intenso” (n=1 – 5%, em cada).

A TIMP-3 foi positiva tanto nas células do epitélio quanto do estroma de 100% (18) dos casos. No compartimento epitelial, 44% (8) dos casos foram imunolocalizados de 75-100% das células, 44% (8) de 50-75% e 12% (2) de 10-50%, sendo a maioria dos casos, com intensidade intensa em 44% (8), moderada em 39% (7) e leve em 17% (3). Em todos os casos, encontramos as células epiteliais basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas com a maioria das células-fantasma positivas (Figura 5.8B e C). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade intensa em 44% (8), moderada em 39% (7) e leve em 17% (3), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.8B e C). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “intenso x intenso” (n=5 – 28%), seguido de “moderado x moderado” (n=4 – 22%), “moderado x intenso” (n=3 – 17%), “intenso x moderado” (n=2 – 11%), “leve x leve”, “moderado x leve” e “intenso x leve” (n=1 – 5%, em cada).

A TIMP-4 foi positiva tanto nas células do epitélio quanto do estroma de 100% (18) dos casos, tal qual a TIMP-3. No compartimento epitelial, 89% (16) dos casos foram imunolocalizados de 75-100% das células e 11% (2) de 50-75%, com a maioria dos casos, com intensidade intensa em 89% (16) e moderada em 11% (2). Na maioria dos casos, encontramos as células epiteliais basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas com a maioria das células-fantasma positivas no seu interior (Figura 5.8D e E). No compartimento estromal, a maioria dos casos com intensidade intensa em 61% (11), moderada em 33% (6) e leve em 6% (1), em células endoteliais, fibroblastos e na MEC (Figura 5.8D). Assim,

verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “intenso x intenso” (n=9 – 50%), seguido de “intenso x moderado” (n=5 – 27%), “moderado x leve” (n=2 – 11%) e “moderado x intenso” (n=1 – 5%). As células positivas apresentaram marcao citoplasmática, na MEC e, interessante­mente, também proeminente marcao nuclear, algo incomum para esta proteína.

O RECK não foi detectado na maioria dos casos no estroma (78% - 14) e expresso de forma variada no epitélio. No compartimento epitelial, metade dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células (50% - 9), 39% (7) de 0-10% e 11% (2) de 75-100%, sendo a maioria dos casos com intensidade leve em 61% (11) e moderada em 17% (3). Na maioria dos casos, encontramos algumas células positivas ao redor das células-fantasma e algumas delas marcadas em seu interior (Figura 5.8F e G) e, em poucos casos, também nas células epiteliais basais (Figura 5.8G). No compartimento estromal, os poucos casos positivos com intensidade leve de 17% (3) e moderado de 16% (1), ambos em fibroblastos (Figura 5.8F e G). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “leve x ausente” (n=11 – 61%), seguido de “ausente x ausente” (n=3 – 17%), “moderado x moderado” (n=2 – 11%), “ausente x leve” e “moderado x leve” (n=1 – 5%, em cada).

A EMMPRIN/CD147 não foi detectada na maioria dos casos no estroma (89% - 16) e expressa de forma variada no epitélio. No compartimento epitelial, 44% (8) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células, 33% (6) de 0-10%, 11% (2) de 50-75% e 11% (2) de 75-100%, sendo a maioria dos casos, com intensidade leve em 44% (8). Na maioria dos casos, encontramos algumas células positivas ao redor das células-fantasma e algumas delas marcadas em seu interior (Figura 5.9A). Em poucos casos, as células do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional positivas ao redor das células-fantasma (Figura 5.9B). No compartimento estromal, na maioria dos casos não detectamos marcao e apenas 11% (2) com intensidade leve em fibroblastos (Figura 5.9A). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “leve e ausente” (n=8 – 44%), seguido de “ausente x ausente” e “moderado x ausente” (n=3 – 17%, em cada), “intenso x ausente” (n=2 – 11%), “leve x leve” e “moderado x leve” (n=1 – 5%, em cada).

5.2.2 Marcadores da Transição Epitélio-Mesenquimal

A N-caderina foi detectada na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, 67% (12) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células, 22% (4) de 0-10% e 11% (2) de 50-75%, sendo a maioria dos casos com intensidade moderada em 56% (10), intenso em 22% (4) e leve em 17% (3). Em todos os casos, muitas células em torno das células-fantasma foram positivas (Figura 5.9D), entretanto, em poucos casos, as células do epitélio basal, as células do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional foram positivas e também no entorno das células-fantasma (Figura 5.9D). No compartimento estromal, alguns vasos sanguíneos e fibroblastos foram positivos, sendo leve em 44% (8) e moderado em 11% (2) dos casos (Figura 5.9C). Assim, verificamos os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “moderado x leve” (n=6 – 33%), seguido de “leve x ausente” e “moderado x ausente” (n=3 – 17%, em cada), “intenso x leve” (n=2 – 11%), “moderado x moderado”, “intenso x moderado” e “intenso x ausente” (n=1 – 5%, em cada). A imunomarcacão observada foi granular dispersa no citoplasma.

O Snail foi detectado na maioria dos casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, 33% (6) dos casos foram imunolocalizados de 50-75% das células, 28% (5) de 10-50%, 22% (4) de 75-100% e 17% (3) de 0-10%, sendo a maioria dos casos, com intensidade moderada em 39% (7), intenso em 28% (5) e leve em 28% (5). Em todos os casos, o interior das células-fantasma foram imunocorados com intensidades variadas (Figura 5.9E e F), entretanto, em poucos casos, as células basais, do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional foram positivas e também no entorno das células-fantasma (Figura 5.9F). No compartimento estromal, alguns vasos sanguíneos e fibroblastos foram positivos, sendo leve em 44% (8) e moderado em 33% (6) dos casos (Figura 5.9 E e F). Assim, os padrões de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “moderado x leve” (n=4 – 22%), seguido de “leve x ausente”, “moderado x moderado” e “intenso x moderado” (n=3 – 17%, em cada), “leve x leve” e “intenso x leve” (n=2 – 11%, em cada). Por ser um fator de transcriçã, a imunomarcacão foi, predominantemente, nuclear, mas também encontrada difusa no citoplasma.

O Slug foi detectado na maioria dos casos no epitélio e ausente na maioria dos casos no estroma. No compartimento epitelial, 39% (7) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células, 33% (6) de 0-10%, 17% (3) de 50-75% e 11% (2) de 75-100%, sendo a maioria dos casos, com intensidade leve em 67% (12) dos casos, moderado em 22% (4) e leve em 6% (1). Em todos os casos, somente o interior das células-fantasma foi imunocorados com intensidades variadas (Figura 5.9G). No compartimento estromal, a maioria dos casos foram negativos e, alguns vasos sanguíneos foram positivos, sendo leve em 17%. Assim, verificamos os padrões de imunomarcção para “epitélio x estroma”: “leve x ausente” (n=11 – 61%), seguido de “moderado x ausente” e “moderado x leve” (n=2 – 11%, em cada) e “leve x leve” e “intenso x ausente” (n=1 – 5%, em cada). Apesar de ser um fator de transcrição, a imunomarcção foi difusa no citoplasma.

A fibronectina foi localizada na maioria dos casos no epitélio e em metade dos casos no estroma. No compartimento epitelial, 67% (12) dos casos foram imunolocalizados de 10-50% das células e 33% (6) de 0-10%, sendo metade dos casos, com intensidade leve em 50% (9) e moderado em 17% (3). Em todos os casos, as células epiteliais basais foram positivas ou negativas, entretanto, células do retículo estrelado e metaplasia escamosa ocasional foram positivas e também no entorno das células-fantasma (Figura 5.10A). No compartimento estromal, na metade dos casos na MEC de fibroblastos e vasos sanguíneos foram positivos, sendo moderado em 33% (6) e leve em 33% (6) (Figura 5.10A). Assim, verificamos para a maioria dos casos um padrão de imunomarcção para “epitélio x estroma”: Maioria sem marcação em ambos (n=6 – 33%) – “Leve x Leve” (n=5 – 28%).

A vimentina foi detectada em todos os casos, sendo exclusivamente estromal. Em todos os casos, fibroblastos adjacentes a camada epitelial foram imunomarcados, sendo intenso em 44% (8), moderado em 44% (8) e leve em 11% (2) e também em vasos sanguíneos (Figura 5.10C e D). Assim, verificamos para a maioria dos casos um padrão de imunomarcção para “epitélio x estroma”: “Ausente x Moderado” (n=8 – 44%) e “Ausente x Intenso” (n=8 – 42%).

A α -SMA foi localizada em todos os casos tanto no epitélio quanto no estroma. No compartimento epitelial, 67% (12) dos casos foram imunolocalizados de 75-100% das células, 17% (3) de 50-75% e 17% (3) de 10-50%, sendo metade dos casos, com intensidade moderada em 50% (9), intenso em 44% (8) e leve em 6% (1). Observamos as células epiteliais basais, células do retículo estrelado,

metaplasia escamosa ocasional e células-fantasma positivas (Figura 5.10E) e, em alguns casos, com as células basais negativas (Figura 5.10F). No compartimento estromal, em todos os casos fibroblastos e vasos sanguíneos foram positivos, sendo intenso em 65% (10) e moderado em 44% (8) (Figura 5.10E e F). Assim, verificamos para a maioria dos casos um padrão de imunomarcacão para “epitélio x estroma”: “Intenso x Intenso” (n=8 – 44%) e “Moderado x Moderado” (n=7 – 39%).

Figura 5.7 - Imunolocalização das MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.

Figura 5.8 - Imunolocalização das TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 e RECK em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE:: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 mM.

Figura 5.9 - Imunolocalização da EMMPRIN/CD147, N-caderina, Snail e Slug em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μ m.

Figura 5.10 - Imunolocalização da Fibronectina, Vimentina e α-SMA em TOCC. Es: estroma, Ep: epitélio basal, CF: células fantasma, CI: células inflamatórias, CT: células escamosas em transição, RE: células do retículo estrelado. Barra: 50 e 200 μm.

Tabela 5.2 – Distribuição percentual da análise semi-quantitativa das imunomarcações das proteínas/enzimas no TOCC

TOCC (n=18)	Estroma					Epitélio					Extensão da Imunomarcção no Epitélio				Padrão Epitélio x Estroma e N. Casos
	-	+	++	+++	Casos Positivos	-	+	++	+++	Casos Positivos	0- 10%	10- 50%	50- 75%	75- 100%	
MMP-2	1 (6%)	3 (17%)	11 (61%)	3 (17%)	n=17 (94%)	-	-	9 (50%)	9 (50%)	n=18 (100%)	1 (6%)	2 (11%)	6 (33%)	9 (50%)	“Intenso x Moderado” (n=6 – 33%) e “Moderado x Moderado” (n=5 – 27%)
MMP-7	-	6 (33%)	10 (56%)	2 (11%)	n=18 (100%)	-	6 (33%)	9 (50%)	3 (17%)	n=18 (100%)	-	5 (27%)	5 (27%)	8 (44%)	“Moderado x Moderado” (n=6 – 33%)
MMP-9	15 (84%)	1 (6%)	2 (11%)	-	n=3 (17%)	2 (11%)	5 (27%)	8 (44%)	3 (17%)	n=16 (89%)	5 (27%)	10 (56%)	2 (11%)	1 (5%)	“Moderado x Ausente” (n=7 – 39%)
MMP-14	1 (6%)	4 (22%)	12 (61%)	1 (6%)	n=17 (94%)	-	5 (27%)	9 (50%)	4 (22%)	n=18 (100%)	2 (11%)	7 (39%)	5 (27%)	4 (22%)	“Moderado x Moderado” (n=7 – 39%)
TIMP-2	3 (17%)	6 (33%)	7 (39%)	2 (11%)	n=15 (83%)	3 (17%)	13 (72%)	2 (11%)	-	n=15 (83%)	6 (33%)	8 (44%)	1 (6%)	3 (17%)	“Leve x Leve” (n=6 – 33%) e “Leve x Moderado” (n=6 – 33%)
TIMP-3	-	3 (17%)	7 (39%)	8 (44%)	n=18 (100%)	-	2 (12%)	8 (44%)	8 (44%)	n=18 (100%)	-	-	5 (28%)	13 (72%)	“Intenso x Intenso” (n=5 – 28%) e “Moderado x Moderado” (n=4 – 22%)
TIMP-4	-	1 (6%)	6 (33%)	11 (61%)	n=18 (100%)	-	-	2 (11%)	16 (89%)	n=18 (100%)	-	-	2 (11%)	16 (89%)	“Intenso x Intenso” (n=9 – 50%)
RECK	14 (78%)	3 (17%)	1 (6%)	-	n=4 (22%)	4 (22%)	11 (61%)	3 (17%)	-	n=14 (78%)	7 (39%)	9 (50%)	-	2 (11%)	“Leve x Ausente” (n=11 – 61%)
EMMPRIN/CD147	16 (89%)	2 (11%)	-	-	n=2 (11%)	4 (22%)	8 (44%)	4 (22%)	2 (11%)	n=14 (78%)	6 (33%)	8 (44%)	2 (11%)	2 (11%)	“Leve e Ausente” (=8 – 44%)
N-Caderina	8 (44%)	8 (44%)	2 (11%)	-	n=10 (56%)	1 (6%)	3 (17%)	10 (56%)	4 (22%)	n=17 (94%)	4 (22%)	12 (67%)	2 (11%)	-	“Moderado x Leve” (n=6 – 33%)
Fibronectina	9 (50%)	6 (33%)	3 (17%)	-	n=9 (50%)	6 (33%)	9 (50%)	3 (17%)	-	n=12 (67%)	6 (33%)	12 (67%)	-	-	Maioria sem marcação em ambos (n=6 – 33%) – “Leve x Leve” (n=5 – 28%)
Vimentina	-	2 (11%)	8 (44%)	8 (44%)	n=18 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	“Ausente x Moderado” (n=8 – 44%) e “Ausente x Intenso” (n=8 – 44%)
α-SMA	-	-	8 (44%)	10 (65%)	n=18 (100%)	-	1 (6%)	9 (50%)	8 (44%)	n=18 (100%)	-	3 (17%)	3 (17%)	12 (67%)	“Intenso x Intenso” (n=8 – 44%) e “Moderado x Moderado” (n=7 – 39%)
Snail	4 (22%)	8 (44%)	6 (33%)	-	n=14 (78%)	-	5 (28%)	7 (39%)	5 (28%)	n=18 (100%)	3 (17%)	5 (28%)	6 (33%)	4 (22%)	“Moderado x Leve” (n=4 – 22%), “Leve x Ausente” (n=3 – 17%), “Moderado x

TOCC (n=18)	Estroma					Epitélio					Extensão da Imunomarcacão no Epitélio				Padrão Epitélio x Estroma e N. Casos
	-	+	++	+++	Casos Positivos	-	+	++	+++	Casos Positivos	0- 10%	10- 50%	50- 75%	75- 100%	
															Moderado” (n=3 – 17%) e “Intenso x Moderado” (n=3 – 17%)
Slug	15 (83%)	3 (17%)	-	-	n=3 (17%)	1 (6%)	12 (67%)	4 (22%)	1 (6%)	n=17 (94%)	6 (33%)	7 (39%)	3 (17%)	2 (11%)	“Leve x Ausente” (n=11 – 61%)

5.3 Comparação entre os Ameloblastomas e Tumores Odontogênicos Cístico Calcificante (TOCC)

Para o nosso primeiro questionamento: “Comparação da expressão de cada molécula avaliada entre o epitélio e o estroma no mesmo tumor individualmente”, nós verificamos 11 proteínas/enzimas que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o “epitélio x estroma”, sendo 5 (EMMPRIN/CD147, Vimentina, N-caderina, Snail e Slug) com diferença estatisticamente significativa em ambos ameloblastoma e no TOCC, 4 (MMP-2, MMP-7, Fibronectina e α -SMA) com diferença estatisticamente significativa somente em ameloblastoma e 2 (MMP-9 e RECK) com diferença estatisticamente significativa somente em TOCC (Tabela 5.3).

Para o nosso segundo questionamento: “Correlação entre as moléculas avaliadas independente dos tumores odontogênicos”, nós estabelecemos 5 possibilidades de associações diferentes: (I) MMPs x inibidores; (II) TIMP-2 x RECK; (III) MMPs x EMMPRIN/CD147; (IV) MMPs x marcadores mesenquimais; (V) Fatores de Transcrição (Snail e Slug) x MMPs, TIMPs, EMMPRIN/CD147, RECK e marcadores mesenquimais. No primeiro, segundo e terceiro casos, nós não observamos associação entre as “MMPs x inibidores”, “TIMP-2 x RECK” e “MMPs x EMMPRIN/CD147” em ambos os tumores. No segundo quarto caso (“MMPs x marcadores mesenquimais”), nós observamos, somente para o ameloblastoma, as seguintes relações estatisticamente significantes:

- MMP-2 estroma x Vimentina estroma: correlação positiva, quanto maior a expressão da MMP-2 maior a da Vimentina (Tabela 5.4);
- MMP-2 estroma x Fibronectina estroma: correlação positiva, quanto maior a expressão da MMP-2 maior a da Fibronectina (Tabela 5.4);
- MMP-7 epitélio x α -Sma epitélio: correlação positiva, quanto maior a expressão da MMP-7 maior a da α -SMA (Tabela 5.4).

No quinto e último caso (“Fatores de Transcrição (Snail e Slug) x MMPs, TIMPs, EMMPRIN/CD147, RECK e marcadores mesenquimais”), nós observamos, para o ameloblastoma, as seguintes relações estatisticamente significantes:

- Snail epitélio x MMP-7 epitélio: correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail maior a da MMP-7, então Snail pode ser um regulador positivo da expressão da MMP-7 (Tabela 5.5);
- Snail estroma x MMP-7 estroma: correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail maior a da MMP-7, então Snail pode ser um regulador positivo da expressão da MMP-7 (Tabela 5.5);
- Snail epitélio x N-caderina epitélio: correlação positiva, quanto menor a expressão do Snail maior a da N-caderina, então Snail pode ser um regulador negativo da expressão da N-caderina (Tabela 5.5)

Ainda, no quinto e último caso (“Fatores de Transcrição (Snail e Slug) x MMPs, TIMPs, EMMPRIN/CD147, RECK e marcadores mesenquimais”), nós observamos, para o TOCC, a seguinte relação estatisticamente significativa:

- Slug estroma x MMP-14 estroma: correlação negativa, quanto menor a expressão do Snail menor a da MMP-14, então Slug pode ser um regulador positivo da expressão da MMP-14 (Tabela 5.6);
- Snail estroma x TIMP-2 estroma: correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail maior a da TIMP-2, então Snail pode ser um regulador positivo da expressão da TIMP-2 (Tabela 5.6);
- Snail epitélio x EMMPRIN/CD147 epitélio: correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail maior a da EMMPRIN/CD147, então Snail pode ser um regulador positivo da expressão da EMMPRIN/CD147 (Tabela 5.6).

Tabela 5.3 – Comparação da expressão das proteínas/enzimas no “epitélio x estroma” individualmente no ameloblastoma e no TOCC com diferença estatisticamente significativa.

		MMP-2 (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
MMP-2 (Epitélio)	-	0	0	0	0
	+	5	14	0	18
Total		5	14	0	18
p valor		0,025			

		α -SMA (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
SMA (Epitélio)	-	0	4	0	0
	+	0	15	0	18
Total		0	19	0	18
p valor		0,046			

		MMP-7 (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
MMP-7 (Epitélio)	-	3	0	0	0
	+	13	3	0	18
Total		16	3	0	18
p valor		<0,001			

		N-caderina (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
N-caderina (Epitélio)	-	4	0	1	0
	+	15	0	7	10
Total		19	0	8	10
p valor		<0,001		0,008	

		MMP-9 (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
MMP-9 (Epitélio)	-	17	0	2	0
	+	1	1	13	3
Total		18	1	15	3
p valor				<0,001	

		Snail (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
Snail (Epitélio)	-	8	0	0	0
	+	4	7	4	14
Total		12	7	4	14
p valor		0,046		0,046	

		RECK (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
RECK (Epitélio)	-	10	1	3	1
	+	0	8	11	3
Total		10	9	14	4
p valor				0,004	

		Slug (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
Slug (Epitélio)	-	12	0	1	0
	+	5	2	14	3
Total		17	2	15	3
p valor		0,025		<0,001	

		Vimentina (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
Vimentina (Epitélio)	-	2	17	0	18
	+	0	0	0	0
Total		2	17	0	18
p valor		<0,001		<0,001	

		EMMPRIN/CD147 (Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
EMMPRIN /CD147 (Epitélio)	-	13	0	2	0
	+	5	1	14	2
Total		18	1	16	2
p valor		0,025		<0,001	

		Fibronectina(Estroma)			
		Ameloblastoma		TOCC	
		-	+	-	+
Fibronectina (Epitélio)	-	2	15	6	0
	+	0	2	3	9
Total		2	17	9	9
p valor		<0,001			

Tabela 5.4 - Correlação entre “MMPs x marcadores mesenquimais” no ameloblastoma com relação estatisticamente significativa

	MMP-2 (estroma)	Vimentina (estroma)	r	p valor	MMP-2 (estroma)	Fibronectina (estroma)	r	p valor	MMP-7 (epitélio)	α-SMA (epitélio)	r	p valor
-	5	2	0,574	0,010	5	2	0,574	0,010	3	4	0,484	0,036
+	14	17			14	17			16	15		
Total	19	19			19	19			19	19		

Tabela 5.5 - Correlação entre “Fatores de Transcrição (Snail e Slug) x MMPs, TIMPs, EMMPRIN/CD147, RECK e marcadores mesenquimais” em ameloblastoma com relação estatisticamente significativa

	Snail (epitélio)	MMP-7 (epitélio)	r	p valor	Snail (estroma)	MMP-7 (estroma)	r	p valor	Snail (epitélio)	N-caderina (epitélio)	R	p valor
-	8	3	0,058	0,026	12	16	0,567	0,011	12	4	0,606	0,006
+	11	16			7	3			7	15		
Total	19	19			19	19			19	19		

Tabela 5.6 - Correlação entre “Fatores de Transcrição (Snail e Slug) x MMPs, TIMPs, EMMPRIN/CD147, RECK e marcadores mesenquimais” em TOCC com relação estatisticamente significativa

	Slug (estroma)	MMP-14 (estroma)	r	p valor	Snail (estroma)	TIMP-2 (estroma)	r	p valor	Snail (epitélio)	EMMPRIN/CD 147 (epitélio)	r	p valor
-	15	1	-0,542	0,020	4	3	0,478	0,045	0	2	0,661	0,003
+	3	17			14	15			18	16		
Total	18	18			18	18			18	18		

6 DISCUSSÃO

Este trabalho mostra pela primeira vez, em conjunto, a descrição das MMPs, seus inibidores, seu ativador e marcadores de Transição Epitélio-Mesenquimal em ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC).

Muitos estudos mostram a participação das MMPs e TIMPs na progressão dos tumores odontogênicos pelo remodelamento da MEC (Takata et al., 2000a; Vaananen et al., 2001; Kubota et al., 2002; Bast et al., 2003; Kumamoto et al., 2003; Pinheiro et al., 2004a; Cavalcante et al., 2008; Miyagi et al., 2008; Gong et al., 2009; Nonaka et al., 2009; Ribeiro et al., 2009a; Zhang et al., 2009a; Leonardi et al., 2010; Qian et al., 2010; Shen et al., 2010; Siqueira et al., 2010; Henriques et al., 2011; Pinheiro et al., 2011; Ribeiro et al., 2011; Ribeiro et al., 2012).

Poucos trabalhos relatam a presença de MMPs e TIMPs (Gong et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Tsuneki et al., 2012a) nos tumores odontogênicos cístico calcificante (TOCC) e nada é sabido sobre a expressão de RECK, EMMPRIN/CD147 e sobre a participação da TEM no comportamento localmente invasivo deste tumor. Esta é a primeira vez que a TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, RECK, EMMPRIN/CD147, N-caderina, Vimentina, α -SMA, Snail e Slug são descritas nestes tumores.

No que diz respeito ao compartimento epitelial, a maioria (com exceção da vimentina) foi expressa de forma heterogênea nas células pré-ameloblásticas basais cubóides/baixas colunares, células tipo-retículo estrelado suprabasais com aglomerados dispersos de células-fantasma com metaplasia escamosa ocasional e, somente a MMP-9, TIMP-2 e Slug foram localizadas exclusivamente no interior das células-fantasma. Já no compartimento estromal, encontramos as mesmas proteínas/enzimas, sendo a vimentina exclusiva deste compartimento. Comparativamente, a MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, N-caderina, Snail e Slug foram presentes no epitélio do que no estroma ($p < 0,05$).

Nossos achados para a MMP-2, MMP-7 e MMP-14 corroboram com os descritos anteriormente (Pinheiro et al., 2011; Ribeiro et al., 2011), porém, para a MMP-9 nós a localizamos apenas nas células-fantasma em contraste com relatos anteriores nas outras células epiteliais (Gong et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Tsuneki et al., 2012a). A natureza das células-fantasma é ainda muito controversa, não se sabendo ao certo se estas células representam uma queratinização normal

ou aberrante (Lucchese et al., 2007), uma simples degeneração celular ou uma forma de matriz do esmalte em reabsorção (Takata et al., 2000a), células odontogênicas apoptóticas resultando em transformação metaplásica dos tumores odontogênicos (Kim et al., 2000; Lucchese et al., 2007). Durante a amelogênese, os ameloblastos produzem enzimas que são secretadas para a matriz extracelular do esmalte e estão envolvidas na modificação e degradação de proteínas do esmalte (Smith, 1998), tais como a MMP-2 e MMP-9 (Goldberg et al., 2002; Goldberg et al., 2003), MMP-3 (Hall et al., 1999; Septier et al., 2001) e MMP-20 (Bourd-Boittin et al., 2004) para a mineralização do esmalte. Assim, a presença das MMPs observada nestas células poder estar associada aos eventos de calcificação. As TIMPs -1 e -2 (Goldberg et al., 2003) também já foram descritas na amelogênese e nossos achados da TIMP-2 na células-fantasma pode estar envolvida também no processo de calcificação. Nós detectamos as TIMP-3 e TIMP-4 tanto no epitélio quanto no estroma de forma abundante e intensa, porém não houve relação estatisticamente significativa com MMPs analisadas. As TIMPs desempenham outras funções independentes da inibição das MMPs, tais como na angiogênese, proliferação e apoptose (Melendez-Zajgla et al., 2008). A TIMP-4 esta desregulada durante a progressão tumoral em diversos órgãos e, diversos estudos têm demonstrado que ela pode ser um marcador da transição para tumores invasivos. Este perfil também está correlacionado com a expressão da MMP-26, na qual é inibida por TIMP-4, provendo um importante eixo proteolítico de invasão (Zhao et al., 2004), já que a MMP-26 promove invasão pela degradação da membrana basal após a ativação da MMP-9, a TIMP-4 pode atuar como uma proteína anti-invasiva para prevenir a ativação da MMP-2 e MMP-9 de uma forma direta ou indireta (Zhao et al., 2004). A MMP-26 já foi detectada em TOCC (Ribeiro et al., 2011), podendo então explicar a detecção da TIMP-4.

Nosso grupo descreveu a detecção de RECK durante a amelogênese em ratos e ameloblastos secretores e células da papila dentária (camada formada pela fusão do retículo estrelado e o epitélio externo do órgão do esmalte) adjacente aos ameloblastos em transição ou em maturação foram positivos (Paiva et al., 2009). Neste contexto, a localização de RECK em todas as células da camada epitelial do TOCC pode estar associado a tentativa de controle da degradação da MEC pelas MMPs. A EMMPRIN/CD147 foi recentemente descrita na odontogênese, sendo uma importante reguladora da expressão de diversas MMPs (Xie et al., 2010) e nós

detectamos que está mais presente no epitélio do que no estroma, provavelmente estimulando as células do estroma a produzir MMPs. Os marcadores de TEM (N-caderina, Snail, Slug, Vimentina e Fibronectina) foram detectados, sendo mais encontrados no epitélio (N-caderina, Snail e Slug) e somente no estroma (vimentina – $p < 0,05$) com correlação positiva entre a expressão de Snail e EMMPRIN/CD147 no epitélio (quanto menor a expressão do Snail maior a da EMMPRIN/CD147), o que nos leva a acreditar que Snail pode ser um regulador positivo da expressão da EMMPRIN/CD147. Além disso, detectamos correlação negativa entre Slug e MMP-14 (quanto menor a expressão do Snail menor a da MMP-14) e correlação positiva entre Snail e TIMP-2 (quanto maior a expressão do Snail maior a da TIMP-2), o que sugerimos que o Snail e Slug podem ser reguladores positivos da TIMP-2 e MMP-14, respectivamente, ambos no estroma. Já é sabido que as MMPs, TIMPs e EMMPRIN/CD147 são alvos dos fatores de transcrição Snail e Slug durante a TEM (Talbot et al., 2012; Wu et al., 2011b).

Miofibroblastos são células especializadas que contém actinas b e g citoplasmáticas presentes em fibroblastos bem como a isoforma α -SMA, tipicamente expressa em células de músculo liso (Tomasek et al., 2002), sendo encontrados em tecidos normais e em lesões fibro-contráteis, tais como o estroma reacional de tumores epiteliais (Desmouliere et al., 2005). Várias moléculas estão relacionadas a diferenciação destas células, sendo o TGF- β o mais importante (Sobral et al., 2007). Nesta situação, os miofibroblastos estão associados à mecanismos de defesa ou isolamento da lesão e participação ativa na sua progressão por modular a angiogênese (facilitando a invasão das células tumorais) ou na promoção da metástase. Além de produzir colágeno, são responsáveis pela síntese de MMPs, favorecendo a invasividade local da lesão (Desmouliere et al., 2004). Pouco é conhecido sobre a função dos miofibroblastos em tumores odontogênicos (Lombardi et al., 1995; Vered et al., 2005). A α -SMA foi intensamente localizada tanto no epitélio quanto no estroma, podendo ser responsável também pela síntese das MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-14 no estroma do TOCC.

Em relação ao ameloblastoma, nada se sabe sobre a participação da TEM no comportamento localmente invasivo deste tumor. Esta é a primeira vez que as TIMP-3, TIMP-4, Vimentina, Snail e Slug são descritas neste tumor.

No que diz respeito ao compartimento epitelial, observamos a expressão de MMP-2, MMP-7, MMP-14, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, N-caderina, α -SMA, Snail na maioria dos casos e pouca ou ausência de expressão da MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, Fibronectina e Slug de forma heterogênea nas células odontogênicas neoplásicas e células do retículo estrelado. Já no compartimento estromal, encontramos a maioria das proteínas/enzimas, sendo a vimentina exclusiva deste compartimento, a MMP-7, MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, N-caderina, Snail e Slug com pouca ou ausência de expressão. Comparativamente, a MMP-2, MMP-7, EMMPRIN/CD147, N-caderina, Snail e Slug foram mais presentes no epitélio do que no estroma ($p < 0,05$) e a vimentina, fibronectina e α -SMA mais presentes no estroma do que no epitélio ($p < 0,05$).

Nossos resultados para a MMP-2, MMP-14, TIMP-2, RECK e EMMPRIN/CD147 corroboram com os encontrados anteriormente (Pinheiro et al., 2004b; Kumamoto; Ooya, 2006b; Ribeiro et al., 2009b; Khalifa et al., 2010; Shen et al., 2010; Henriques et al., 2011; Pinheiro et al., 2011; Yoon et al., 2011).

Verificamos correlações positivas entre a MMP-2 e Vimentina no estroma, MMP-2 e Fibronectina no estroma e MMP-7 e α -SMA no epitélio (quanto maior a expressão das MMPs maior dos componentes da MEC). A indução da TEM leva a alterações epigenéticas que conferem fenótipo invasivo e migratório (Dumont et al., 2008). Além disso, o estroma ao redor do tumor é ativamente remodelado por degradação proteolítica da MEC, o que leva a liberação de fatores de crescimento e outras moléculas que potencializam os sinais para a migração celular. A desregulação das MMPs contribui para a migração celular através de múltiplos mecanismos: liberação individual de células pela clivagem das junções intercelulares, degradação da MEC para permitir a mobilidade celular, trazer a tona sítios antes mascarados com novas funções na migração celular e a liberação de fatores de crescimento antes aprisionados na MEC, tais como bFGF, TGF- β 1, PDGF, HB-EGF/Anfiregulina e IFN-gama (Radisky et al., 2010b). Várias proteínas com potencial pró-migratório são reguladas positivamente em tecidos tumorais: colágenos tipo I e IV, lamininas, tenascina C, fibronectina e vitronectina. A habilidade de alterar o microambiente estromal está correlacionado com o potencial de invasão tumoral (Li et al., 2009; Soikkeli et al., 2010). Células tumorais induzem a alterações na expressão gênica em fibroblastos e outras células estromais para a produção de

moléculas da MEC que promovem a migração tumoral e aumento da expressão das MMPs “afrouxar” a MEC (Adam et al., 2006). Dependendo dos receptores de membrana celular presentes, as células tumorais podem utilizar diferentes componentes da MEC para potencializar a migração (Tysnes et al 1996; Mahesparan et al 1999). Além disso, a clivagem proteolítica da fibronectina, lamininas e colágenos competem com suas respectivas moléculas intactas pelos locais de adesão e facilitam o desprendimento celular (Cukierman et al., 2010).

Além disso, verificamos correlações positivas entre o Snail e MMP-7 no epitélio e estroma e Snail e N-caderina no estroma (quanto maior a expressão do Snail maior a MMP-7 ou N-caderina), o que nos leva a acreditar que Snail pode ser um regulador positivo da expressão da MMP-7 e N-caderina. A desregulação da E-caderina está freqüentemente, mas não sempre, associada com a regulação positiva da N-caderina, sugerindo a alternância de caderinas na TEM (*cadherin switch*) (Lehembre et al., 2008). Entretanto, a colocalização de ambas tem sido observada (Hazan et al., 2000) e, a superexpressão de N-caderina na ausência de alterações nos níveis de E-caderina pode induzir a migração e invasão de células tumorais através da sinalização via FGFR ou através de interações com a N-caderina expressa pelas células ao redor das células estromais. Assim, existem evidências que indicam a possível correlação entre a expressão das MMPs e os eventos de TEM no ameloblastoma.

Nós, ainda, verificamos a presença de células do estroma com intensidade moderada/intensa em contato com o osso cortical no fronte ósseo para a todas as proteínas/enzimas analisadas, exceto Slug. Existem relatos na literatura de que estas células em contato com o osso são α -SMA positivas e também MMP-2 positivas (Fregnani et al., 2009), levando a absorção óssea. Outro perfil observado é a presença de MMP-9 e RANKL (regulador chave da osteoclastogênese) nestes mesmos locais (Qian & Huang, 2010).

Comparando o ameloblastoma e o TOCC, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão das proteínas/enzimas do epitélio (MMP-9, RECK, EMMPRIN/CD147, Fibronectina, α -SMA, Snail e Slug) maior no TOCC do que no ameloblastoma. Já no estroma, constatamos mais MMP-2, MMP-7 e N-caderina no TOCC do que no ameloblastoma e mais fibronectina e Snail no ameloblastoma do que no TOCC.

Desta forma, este trabalho mostra pela primeira vez a distribuição tecidual em conjunto das MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, RECK, EMMPRIN/CD147, N-caderina, Vimentina, Fibronectina, α -SMA, Snail e Slug em tumores odontogênicos (ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante). Nós concluímos que o comportamento localmente invasivo destes tumores pode ser modulado pela presença das MMPs (-2, -7, -9 e -14), seu ativador (EMMPRIN/CD147), seus inibidores (TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 e RECK) e, alguns deles, são regulados pelos fatores de transcrição (Snail e Slug), marcadores da Transição Epitélio-Mesenquimal.

7 CONCLUSÕES

Concluimos que o comportamento localmente invasivo destes tumores pode ser modulado pela presença das MMPs (-2, -7, -9 e -14), seu ativador (EMMPRIN), seus inibidores (TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 e RECK) e, alguns deles, são regulados pelos fatores de transcrição (Snail e Slug) marcadores da TEM. Apesar da detecção dos marcadores da TEM, mais estudos são necessários para determinar se este processo está ocorrendo nestes tumores odontogênicos.

REFERÊNCIAS³

Abdel-Aziz A, Amin MM. EGFR, CD10 and proliferation marker Ki67 expression in ameloblastoma: possible role in local recurrence. *Diagn Pathol*. 2012. Feb 2;7:14.

Abiko, Y., Murata, M., Ito, Y., Taira, T., Nishimura, M., Arisue, M., Inoue, T., Shimono, M., Kuboki, Y., & Kaku, T.. Immunohistochemical localization of amelogenin in human odontogenic tumors, using a polyclonal antibody against bovine amelogenin. *Med. Electron Microsc.* 2001. 34, (3) 185-189.

Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J.Clin.Invest.* 2009. 119, (6) 1438-1449.

Adam, B., Toth, L., Pasti, G., Balazs, M., & Adany, R. Contact stimulation of fibroblasts for tenascin production by melanoma cells. *Melanoma Res.* 2006. 16, (5) 385-391.

Ahmad, M., Takino, T., Miyamori, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., & Sato, H. Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases. *J.Biochem.* 2006. 139, (3) 517-526.

Aimes, R.T. & Quigley, J.P.. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J.Biol.Chem.* 1995. 270, (11) 5872-5876.

Altruda, F., Cervella, P., Gaeta, M.L., Daniele, A., Giancotti, F., Tarone, G., Stefanuto, G., & Silengo, L. Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene*. 1989. 85, (2) 445-451.

Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Voeltzel, T., Selmi, A., Valsesia-Wittmann, S., Caron de, F.C., & Puisieux, A. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*. 2008. 14, (1) 79-89.

³ De acordo com Estilo Vancouver.

Apte, S.S., Olsen, B.R., & Murphy, G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J.Biol.Chem.* 1995. 270, (24) 14313-14318.

Arbelaez, L.F. & Stigbrand, T.. Purification of pregnancy zone protein and its receptor binding domain from human plasma. *Protein Expr.Purif.*1997. 10, (3) 301-308.

Ashworth, J.L., Murphy, G., Rock, M.J., Sherratt, M.J., Shapiro, S.D., Shuttleworth, C.A., & Kielty, C.M. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem.J.* 1999. 340 (Pt 1), 171-181.

Baker, A.H., Edwards, D.R., & Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J.Cell Sci.* 2002. 115, (Pt 19) 3719-3727.

Barnes, L., UniversitätsSpital, Z., Departement, P., International Academy of Pathology, World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of head and neck tumours. 2205. 9 ed. Lyon, IARC Press.

Bartlett, J.D. & Simmer, J.P. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 1999. 10, (4) 425-441.

Bast, B.T., Pogrel, M.A., & Regezi, J.A. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 2003. 61, (12) 1463-1466.

Bauer, H.J., ter, M., V, Koprowski, H., Argyrakakis, A., & Orthner, H.. Early sterile autopsy in etiological studies on multiple sclerosis. *J.Neurol.* 1975. 208, (3) 159-174.

Bauvois, B.. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim.Biophys.Acta.* 2012. 1825, (1) 29-36.

Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabieres, C., & Pantel, K.. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2012. 31, (3-4) 673-687.

Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M., & Birchmeier, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J.Cell Biol.* 1989. 108, (6) 2435-2447.

Belien, A.T., Paganetti, P.A., & Schwab, M.E.. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J.Cell Biol.* 1999a. 144, (2) 373-384.

Belien, A.T., Paganetti, P.A., & Schwab, M.E.. Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J.Cell Biol.* 1999b. 144, (2) 373-384.

Belkin, A.M., Akimov, S.S., Zaritskaya, L.S., Ratnikov, B.I., Deryugina, E.I., & Strongin, A.Y.. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J.Biol.Chem.* 2001. 276, (21) 18415-18422.

Bello, I.O., Soini, Y., Slootweg, P.J., & Salo, T.. Claudins 1, 4, 5, 7 and occludin in ameloblastomas and developing human teeth. *J.Oral Pathol.Med.* 2007. 36, (1) 48-54.

Benbow, U. & Brinckerhoff, C.E.. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?. *Matrix Biol.*1997. 15, (8-9) 519-526.

Berton, A., Lorimier, S., Emonard, H., Laurent-Maquin, D., Hornebeck, W., & Bellon, G.. Contribution of the plasmin/matrix metalloproteinase cascade to the retraction of human fibroblast populated collagen lattices. *Mol.Cell Biol.Res.Comm.* 2000. 3, (3) 173-180.

Bigg, H.F., Shi, Y.E., Liu, Y.E., Steffensen, B., & Overall, C.M.. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J.Biol.Chem.* 1997. 272, (24) 15496-15500.

Birkedal-Hansen, H.. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases6. *J.Periodontol.* 1993. 64, (5 Suppl) 474-484.

Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., & Nabeshima, K.. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 1995. 55, (2) 434-439.

Black, C.C., Addante, R.R., & Mohila, C.A. Intraosseous ameloblastoma. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2010. 110, (5) 585-592.

Blavier, L., Lazaryev, A., Shi, X.H., Dorey, F.J., Shackelford, G.M., & DeClerck, Y.A.. Stromelysin-1 (MMP-3) is a target and a regulator of Wnt1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cancer Biol.Ther.* 2010. 10, (2) 198-208.

Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., & Kuliopulos, A.. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell.* 2005. 120, (3) 303-313.

Bologna-Molina, R., Gonzalez-Gonzalez, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Damian-Matsumura, P., & Dominguez-Malagon, H.. Expression of syndecan-1 in papillary carcinoma of the thyroid with extracapsular invasion. *Arch.Med.Res.* 2010. 41, (1) 33-37.

Bourd-Boittin, K., Septier, D., Hall, R., Goldberg, M., & Menashi, S.. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. *J.Histochem.Cytochem.* 2004. 52, (4) 437-445.

Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Gunther, K., Hohenberger, W., & Kirchner, T.. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol.Res.Pract.* 1998. 194, (10) 701-704.

Brew, K. & Nagase, H.. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010a. 1803, (1) 55-71.

Brew, K. & Nagase, H.. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010b. 1803, (1) 55-71.

Brinckerhoff, C.E. & Matrisian, L.M.. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002. 3, (3) 207-214.

Brown, P.D., Levy, A.T., Margulies, I.M., Liotta, L.A., & Stetler-Stevenson, W.G.. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* 1990. 50, (19) 6184-619.

Butler, G.S. & Overall, C.M.. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry.* 2009. 48, (46) 10830-10845.

Buttner, F.H., Hughes, C.E., Margerie, D., Lichte, A., Tschesche, H., Caterson, B., & Bartnik, E. 1998. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem.J.* 1998. 333 (Pt 1), 159-165.

Caetano, A.D., Tjioe, K.C., Faustino, S.E., Hanemann, J.A., Belone, A.D., Soares, C.T., & Oliveira, D.T. 2012. Immunolocalization of podoplanin in benign odontogenic tumours with and without ectomesenchyme. *Arch.Oral Biol.* 2012.

Cairns, L., Naidu, A., Robinson, C.M., Sloan, P., Wright, J.M., & Hunter, K.D.. CD56 (NCAM) expression in ameloblastomas and other odontogenic lesions 103. *Histopathology.* 2010. 57, (4) 544-548.

Cao, J., Chiarelli, C., Richman, O., Zarrabi, K., Kozarekar, P., & Zucker, S.. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *J.Biol.Chem.* 2010. 283, (10) 6232-6240.

Cardeal, L.B., Boccardo, E., Termini, L., Rabachini, T., Andreoli, M.A., di, L.C., Longatto, F.A., Villa, L.L., & Maria-Engler, S.S.. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS.One.* 2012. 7, (3) e33585.

Carnelio, S. & Vij, H.. Expression of tenascin and nucleolar organizer region in ameloblastoma and ameloblastic fibroma. *J.Oral Pathol.Med.* 2010. 39, (3) 223-229.

Caterina, J.J., Yamada, S., Caterina, N.C., Longenecker, G., Holmback, K., Shi, J., Yermovsky, A.E., Engler, J.A., & Birkedal-Hansen, H.. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J.Biol.Chem.* 2000. 275, (34) 26416-26422.

Cavalcante, R.B., Pereira, K.M., Nonaka, C.F., Nogueira, R.L., & de Souza, L.B.. Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.*2008. 106, (1) 99-105.

Chirco, R., Liu, X.W., Jung, K.K., & Kim, H.R.. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006. 25, (1) 99-113.

Chung, T.T., Yeh, C.B., Li, Y.C., Su, S.C., Chien, M.H., Yang, S.F., & Hsieh, Y.H.. Effect of RECK gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathologic features. *PLoS.One.* 2012a. 7, (3) e33517.

Chung, T.T., Yeh, C.B., Li, Y.C., Su, S.C., Chien, M.H., Yang, S.F., & Hsieh, Y.H.. Effect of RECK gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathologic features. *PLoS.One.* 2012b. 7, (3) e33517.

Clark, J.C., Akiyama, T., Thomas, D.M., Labrinidis, A., Evdokiou, A., Galloway, S.J., Kim, H.S., Dass, C.R., & Choong, P.F.. RECK in osteosarcoma: a novel role in tumour vasculature and inhibition of tumorigenesis in an orthotopic model. *Cancer.* 2011. 117, (15) 3517-3528.

Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P., & Matrisian, L.M.. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene.* 1999. 18, (18) 2883-2891.

Crivelini, M.M., Felipini, R.C., Miyahara, G.I., & de Sousa, S.C.. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and amelogenin in odontogenic tumors: immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations. *J.Oral Pathol.Med.* 2012a. 41, (3) 272-280.

Crivelini, M.M., Felipini, R.C., Miyahara, G.I., & de Sousa, S.C.. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and amelogenin in odontogenic tumors: immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations. *J.Oral Pathol.Med.* 2012b. 41, (3) 272-280.

Cukierman, E. & Bassi, D.E.. Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. *Semin.Cancer Biol.* 2010. 20, (3) 139-145.

Curran, S. & Murray, G.I.. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J.Pathol.* 1999. 189, (3) 300-308.

d'Ortho, M.P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L., & Murphy, G.. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur.J.Biochem.* 1997. 250, (3) 751-757.

Dallas, S.L., Rosser, J.L., Mundy, G.R., & Bonewald, L.F.. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J.Biol.Chem.*1999. 277, (24) 21352-21360.

Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Kristensen, G.B., & Reich, R.. EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin.Exp.Metastasis.* 2003., 20, (2) 161-169.

Deng, Y.F., Zhou, D.N., Ye, C.S., Zeng, L., & Yin, P.. Aberrant expression levels of MTA1 and RECK in nasopharyngeal carcinoma: association with metastasis, recurrence, and prognosis. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 2012. 121, (7) 457-465.

Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Postnova, T.I., Rozanov, D.V., & Strongin, A.Y.. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J.Biol.Chem.* 2012. 277, (12) 9749-9756.

Desmouliere, A., Chaponnier, C., & Gabbiani, G.. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound.Repair Regen.* 2005. 13, (1) 7-12.

Desmouliere, A., Guyot, C., & Gabbiani, G.. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int.J.Dev.Biol.* 2004. 48, (5-6) 509-517.

Devilliers, P., Suggs, C., Simmons, D., Murrah, V., & Wright, J.T.. Microgenomics of ameloblastoma. *J.Dent.Res.* 2011. 90, (4) 463-469.

Ding, X., Fang, L., Zhang, H., Qiao, H., & Wang, Z.B.. Invasiveness of mouse embryos to human ovarian cancer cells HO8910PM and the role of MMP-9. *Cancer Cell Int.* 2012. 12, (1) 23.

Dodds, A.P., Cannon, R.E., Suggs, C.A., & Wright, J.T.. mRNA expression and phenotype of odontogenic tumours in the v-Ha-ras transgenic mouse. *Arch.Oral Biol.* 2003. 48, (12) 843-850.

Dorudi, S., Sheffield, J.P., Poulson, R., Northover, J.M., & Hart, I.R.. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am.J.Pathol.*1993. 142, (4) 981-986.

Dumont, N., Wilson, M.B., Crawford, Y.G., Reynolds, P.A., Sigaroudinia, M., & Tlsty, T.D.. Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008. 105, (39) 14867-14872.

Durbeej, M. & Ekblom, P.. Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. *Exp.Lung Res.* 1997. 23, (2) 109-118.

Ebralidze, A., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Afanasyeva, A., Senin, V., Revazova, E., & Lukanidin, E.. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev.* 1989. 3, (7) 1086-1093.

Egeblad, M. & Werb, Z.. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat.Rev.Cancer.* 2002. 2, (3) 161-174.

Ellerbroek, S.M. & Stack, M.S.. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays.* 1999. 21, (11) 940-949.

Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., & Sato, H.. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J.Biol.Chem.* 2003. 278, (42) 40764-40770.

English, W.R., Puente, X.S., Freije, J.M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C., & Murphy, G.. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2.. *J.Biol.Chem.* 2000. 275, (19) 14046-14055.

English, W.R., Velasco, G., Stracke, J.O., Knauper, V., & Murphy, G.. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett.* 2001. 491, (1-2) 137-142.

Ewald, S.E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogoy, M., & Barton, G.M.. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J.Exp.Med.* 2011. 208, (4) 643-651.

Fanelli, M.F., Chinen, L.T., Begnami, M.D., Costa, W.L., Jr., Fregnami, J.H., Soares, F.A., & Montagnini, A.L.. The influence of transforming growth factor-alpha, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer. *Histopathology*. 2012. 61, (2) 153-161.

Fata, J.E., Werb, Z., & Bissell, M.J.. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res*. 2004. 6, (1) 1-11.

Fernandez-Miranda, J.C., Gardner, P.A., Snyderman, C.H., Devaney, K.O., Stojan, P., Suarez, C., Genden, E.M., Rinaldo, A., & Ferlito, A.. Craniopharyngioma: a pathologic, clinical, and surgical review. *Head Neck*. 2012. 34, (7) 1036-1044.

Fernandez-Patron, C., Radomski, M.W., & Davidge, S.T.. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ.Res*. 1999. 85, (10) 906-911.

Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., & Delaisse, J.. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*. 2000. 486, (3) 247-251.

Fessler, L.I., Duncan, K.G., Fessler, J.H., Salo, T., & Tryggvason, K.. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J.Biol.Chem*. 1984. 259, (15) 9783-9789.

Fini, M.E., Cook, J.R., & Mohan, R.. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch.Dermatol.Res*.1998. 290 Suppl, S12-S23.

Fosang, A.J., Neame, P.J., Last, K., Hardingham, T.E., Murphy, G., & Hamilton, J.A.. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. . *J.Biol.Chem*. 1992. 267, (27) 19470-19474.

Fossum, S., Mallett, S., & Barclay, A.N.. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur.J.Immunol*. 1991. 21, (3) 671-679.

Fowlkes, J.L., Enghild, J.J., Suzuki, K., & Nagase, H.. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J.Biol.Chem*. 1994. 269, (41) 25742-25746.

Fregnani, E.R., Sobral, L.M., Alves, F.A., Soares, F.A., Kowalski, L.P., & Coletta, R.D.. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol.Oncol.Res.* 1999. 15, (2) 231-240.

Freitas, V.S., dos Santos, J.N., Oliveira, M.C., Santos, P.P., Freitas, R.A., & de Souza, L.B.. Intraoral granular cell tumors: clinicopathologic and immunohistochemical study. *Quintessence.Int.* 2012. 43, (2) 135-142.

Fukui, N., McAlinden, A., Zhu, Y., Crouch, E., Broekelmann, T.J., Mecham, R.P., & Sandell, L.J.. Processing of type II procollagen amino propeptide by matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* 2002. 277, (3) 2193-2201.

Gao, G., Plaas, A., Thompson, V.P., Jin, S., Zuo, F., & Sandy, J.D.. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J.Biol.Chem.* 2004. 279, (11) 10042-10051.

Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L., & .. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994. 370, (6490) 555-557.

Gialeli, C., Theocharis, A.D., & Karamanos, N.K.. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011. 278, (1) 16-27.

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., & Quaranta, V.. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 1997, 277, (5323) 225-228.

Godde, N.J., Galea, R.C., Elsum, I.A., & Humbert, P.O.. Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2010. 15, (2) 149-168.

Goldberg, M., Septier, D., Bourd, K., Hall, R., George, A., Goldberg, H., & Menashi, S.. Immunohistochemical localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the forming rat incisor. *Connect.Tissue Res.* 2003. 44, (3-4) 143-153.

Goldberg, M., Septier, D., Bourd, K., Hall, R., Jeanny, J.C., Jonet, L., Colin, S., Tager, F., Chaussain-Miller, C., Garabedian, M., George, A., Goldberg, H., & Menashi, S.. The dentino-enamel junction revisited. *Connect.Tissue Res.* 2003. 43, (2-3) 482-489.

Gomes, L.R., Terra, L.F., Wailemann, R.A., Labriola, L., & Sogayar, M.C.. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC.Cancer.* 2012. 12, 26.

Gomis-Ruth, F.X., Gomez-Ortiz, M., Vendrell, J., Ventura, S., Bode, W., Huber, R., & Aviles, F.X.. Crystal structure of an oligomer of proteolytic zymogens: detailed conformational analysis of the bovine ternary complex and implications for their activation. *J.Mol.Biol.* 1997. 269, (5) 861-880.

Gong, Y., Wang, L., Wang, H., Li, T., & Chen, X.. The expression of NF-kappaB, Ki-67 and MMP-9 in CCOT, DGCT and GCOC. *Oral Oncol.* 2009. 45, (6) 515-520.

Gorlin, R.J., Pindborg, J.J., ODONT, CLAUSEN, F.P., & VICKERS, R.A.. 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, 1235-1243.

Gross, J. & LAPIERE, C.M.. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1962. 48, 1014-1022.

Guo, H., Zucker, S., Gordon, M.K., Toole, B.P., & Biswas, C.. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* 1997. 272, (1) 24-27.

Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., & Winberg, J.O.. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* 2011. 278, (1) 28-45.

Hahn-Dantona, E.A., Aimes, R.T., & Quigley, J.P.. The isolation, characterization, and molecular cloning of a 75-kDa gelatinase B-like enzyme, a member of the matrix metalloproteinase (MMP) family. An avian enzyme that is MMP-9-like in its cell expression pattern but diverges from mammalian gelatinase B in sequence and biochemical properties. *J.Biol.Chem.* 2000. 275, (52) 40827-40838.

Hall, R., Septier, D., Embery, G., & Goldberg, M.. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem.J.* 2000. 31, (12) 761-770.

Hao, Y.Q., Niu, Z.Y., Wang, G.Q., Zhou, X.D., & Hu, T.. [Expression of matrixmetalloproteinase-8 on the bell-stage in human and rat tooth development]. *Hua Xi.Kou Qiang.Yi.Xue.Za Zhi.* 2004. 22, (1) 26-28.

Haro, H., Crawford, H.C., Fingleton, B., Shinomiya, K., Spengler, D.M., & Matrisian, L.M.. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J.Clin.Invest.* 2000. 105, (2) 143-150.

Harper, E., Bloch, K.J., & GROSS, J.. The zymogen of tadpole collagenase 22. *Biochemistry.* 1971. 10, (16) 3035-3041.

Hathaway, H.J. & Shur, B.D.. Mammary gland morphogenesis is inhibited in transgenic mice that overexpress cell surface beta1,4-galactosyltransferase. *Development.* 1996. 122, (9) 2859-2872.

Hayashi, H., Shimizu, R., Fujii, K., Itoh, S., Yang, D., & Onozaki, K.. Resistance to IL-1 anti-proliferative effect, accompanied by characteristics of advanced melanoma, permits invasion of human melanoma cells in vitro, but not metastasis in the nude mouse. *Int.J.Cancer.* 1997. 71, (3) 416-421.

Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., & Aaronson, S.A.. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J.Cell Biol.* 2000. 148, (4) 779-790.

Heikinheimo, K., Happonen, R.P., Miettinen, P.J., & Ritvos, O.. Transforming growth factor beta 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors 105. *J.Clin.Invest.* 1993a. 91, (3) 1019-1027.

Heikinheimo, K., Happonen, R.P., Miettinen, P.J., & Ritvos, O.. Transforming growth factor beta 2 in epithelial differentiation of developing teeth and odontogenic tumors 9. *J.Clin.Invest.* 1993b. 91, (3) 1019-1027.

Heikinheimo, K., Jee, K.J., Niini, T., Aalto, Y., Happonen, R.P., Leivo, I., & Knuutila, S.. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J.Dent.Res.* 2002. 81, (8) 525-530.

Heikinheimo, K., Voutilainen, R., Happonen, R.P., & Miettinen, P.J.. EGF receptor and its ligands, EGF and TGF- α , in developing and neoplastic human odontogenic tissues. *Int.J.Dev.Biol.* 1993c. 37, (3) 387-396.

Hendarmin, L., Sandra, F., Nakao, Y., Ohishi, M., & Nakamura, N.. TNF α played a role in induction of Akt and MAPK signals in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2005. 41, (4) 375-382.

Henkemeyer, M., Rossi, D.J., Holmyard, D.P., Puri, M.C., Mbamalu, G., Harpal, K., Shih, T.S., Jacks, T., & Pawson, T.. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature.* 1995. 377, (6551) 695-701.

Henriques, A.C., Vasconcelos, M.G., Galvao, H.C., de Souza, L.B., & de Almeida, F.R.. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2011. 112, (4) 468-475.

Herman, M.P., Sukhova, G.K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M.R., Libby, P., & Schonbeck, U.. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J.Clin.Invest.* 2001. 107, (9) 1117-1126.

Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A., & Tschesche, H.. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J.Biol.Chem.* 2000. 275, (42) 33008-33013.

Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R., & Weiss, S.J.. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell.* 2008. 95, (3) 365-377.

Hozumi, K., Suzuki, N., Nielsen, P.K., Nomizu, M., & Yamada, Y.. Laminin α 1 chain LG4 module promotes cell attachment through syndecans and cell spreading through integrin α 2 β 1. *J.Biol.Chem.* 2006. 281, (43) 32929-32940.

Hubmacher, D. & Apte, S.S.. The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2013. 25, (1) 65-70.

Hwang, I.K., Park, S.M., Kim, S.Y., & Lee, S.T.. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. *Biochim.Biophys.Acta.* 2004. 1702, (1) 79-87.

Ida-Yonemochi, H., Ahsan, M.S., & Saku, T.. Differential expression profiles between alpha-dystroglycan and integrin beta1 in ameloblastoma: two possible perlecan signalling pathways for cellular growth and differentiation. *Histopathology*. 2011. 58, (2) 234-245.

Ida-Yonemochi, H., Ikarashi, T., Nagata, M., Hoshina, H., Takagi, R., & Saku, T.. The basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in ameloblastomas: its intercellular localization in stellate reticulum-like foci and biosynthesis by tumor cells in culture. *Virchows Arch*. 2002. 441, (2) 165-173.

Iezzi, G., Piattelli, A., Rubini, C., Artese, L., Goteri, G., Fioroni, M., & Carinci, F.. CD10 expression in stromal cells of ameloblastoma variants. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod*. 2008. 105, (2) 206-209.

Illman, S.A., Lehti, K., Keski-Oja, J., & Lohi, J.. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J.Cell Sci*. 2006. 119, (Pt 18) 3856-3865.

Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M.D., & Okada, Y.. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem.J*. 1997. 322 (Pt 3), 809-814.

Ito, Y., Abiko, Y., Tanaka, Y., Rahemtulla, F., & Kaku, T.. Immunohistochemical localization of large chondroitin sulfate proteoglycan in odontogenic tumor. *Med.Electron Microsc*. 2002. 35, (3) 173-177.

Itoh, M., Osaki, M., Chiba, T., Masuda, K., Akizawa, T., Yoshioka, M., & Seiki, M.. Flow injection analysis for measurement of activity of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 1997. 15, (9-10) 1417-1426.

Itoh, Y. & Seiki, M.. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J.Cell Physiol*. 2006. 206, (1) 1-8.

Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., & Grunert, S.. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J.Cell Biol*. 2002. 156, (2) 299-313.

Joseph, M.J., Dangi-Garimella, S., Shields, M.A., Diamond, M.E., Sun, L., Koblinski, J.E., & Munshi, H.G.. Slug is a downstream mediator of transforming growth factor-beta1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells. *J.Cell Biochem.* 2009. 108, (3) 726-736.

Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., & Seiki, M.. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J.Cell Biol.* 2001a. 153, (5) 893-904.

Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., & Seiki, M.. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J.Cell Biol.* 2001b. , 153, (5) 893-904.

Kalluri, R. & Weinberg, R.A.. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J.Clin.Inves.* 2009. 119, (6) 1420-1428.

Kanekura, T., Chen, X., & Kanzaki, T.. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int.J.Cancer.* 2002. 99, (4) 520-528.

Kang, H.G., Kim, H.S., Kim, K.J., Oh, J.H., Lee, M.R., Seol, S.M., & Han, I.. RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. *J.Orthop.Res.* 2007. 25, (5) 696-702.

Karathanasi, V., Tosios, K.I., Nikitakis, N.G., Piperi, E., Koutlas, I., Trimis, G., & Sklavounou, A.. TGF-beta1, Smad-2/-3, Smad-1/-5/-8, and Smad-4 signaling factors are expressed in ameloblastomas, adenomatoid odontogenic tumors, and calcifying cystic odontogenic tumors: an immunohistochemical study. *J.Oral Pathol.Med.* 2012.

Karsdal, M.A., Larsen, L., Engsig, M.T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Delaisse, J.M., & Foged, N.T.. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2002. 277, (46) 44061-44067.

Kasinrerk, W., Fiebiger, E., Stefanova, I., Baumruker, T., Knapp, W., & Stockinger, H.. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J.Immunol.* 1992. 149, (3) 847-854.

Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., & Biswas, C.. Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res.* 1993. 53, (13) 3154-3158.

Kato, K., Long, N.K., Makita, H., Toida, M., Yamashita, T., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., & Shibata, T.. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br.J.Cancer.* 2008. 99, (4) 647-654.

Kerebel, B. & Kerebel, L.M.. Ghost cells in complex odontoma: a light microscopic and SEM study. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1985. 59, (4) 371-378.

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z.. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010. 141, (1) 52-67.

Khalifa, G.A., Shokier, H.M., & Abo-Hager, E.A.. Evaluation of neoplastic nature of keratocystic odontogenic tumor versus ameloblastoma. *J.Egypt.Natl.Canc.Inst.* 2010. 22, (1) 61-72.

Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., & Werb, Z.. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science.* 1998., 280, (5365) 898-902.

Kiemer, A.K., Takeuchi, K., & Quinlan, M.P.. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene.* 2001. 20, (46) 6679-6688.

Kim, J., Lee, E.H., Yook, J.I., Han, J.Y., Yoon, J.H., & Ellis, G.L.. Odontogenic ghost cell carcinoma: a case report with reference to the relation between apoptosis and ghost cells. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2000. 90, (5) 630-635.

Kim, N.Y., Lee, J.E., Chang, H.J., Lim, C.S., Nam, D.H., Min, B.H., Park, G.H., & Oh, J.S.. Gamma-irradiation enhances RECK protein levels in Panc-1 pancreatic cancer cells. *Mol.Cells.* 2008. 25, (1) 105-111.

Kim, S.Y., Park, S.M., & Lee, S.T.. Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2006. 339, (1) 47-54.

Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., & Quaranta, V.. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J.Cell Biol.* 2007. 148, (3) 615-624.

Kowalski, P.J., Rubin, M.A., & Kleer, C.G.. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 2003. 5, (6) R217-R222.

Krekoski, C.A., Neubauer, D., Graham, J.B., & Muir, D.. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J.Neurosci.* 2002. 22, (23) 10408-10415.

Kubota, Y., Oka, S., Nakagawa, S., & Shirasuna, K.. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. *J.Dent.Res.* 2002. 81, (1) 23-27.

Kumamoto, H.. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J.Oral Pathol.Med.* 2002. 35, (2) 65-74.

Kumamoto, H. & Ohki, K.. Detection of Notch signaling molecules in ameloblastomas. *J.Oral Pathol.Med.* 2008. 37, (4) 228-234.

Kumamoto, H. & Ohki, K.. Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. *J.Oral Pathol.Med.* 2010. 39, (1) 87-93.

Kumamoto, H. & Ooya, K.. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in epithelial odontogenic tumors: an immunohistochemical study. *J.Oral Pathol.Med.* 1999. 28, (4) 152-157.

Kumamoto, H. & Ooya, K.. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J.Oral Pathol.Med.* 2004. 33, (1) 46-52.

Kumamoto, H. & Ooya, K.. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2006a. 12, (2) 163-170.

Kumamoto, H. & Ooya, K.. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. *J.Oral Pathol.Med.* 2006b, 35, (6) 345-351.

Kumamoto, H., Yamauchi, K., Yoshida, M., & Ooya, K.. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J.Oral Pathol.Med* 2003. 32, (2) 114-120.

Kusafuka, K., Hirobe, K., Wato, M., Tanaka, A., & Nakajima, T.. CD56 expression is associated with neuroectodermal differentiation in ameloblastomas: an immunohistochemical evaluation in comparison with odontogenic cystic lesions. *Med.Mol.Morphol.* 2011. 44, (2) 79-85.

Kwan, J.A., Schulze, C.J., Wang, W., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D.E., Sawicki, G., & Schulz, R.. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J.* 2004. 18, (6) 690-692.

Ledesma-Montes, C., GORLIN, R.J., Shear, M., Prae, T.F., Mosqueda-Taylor, A., Altini, M., Unni, K., Paes de, A.O., Carlos-Bregni, R., Romero de, L.E., Phillips, V., Delgado-Azanero, W., & Meneses-Garcia, A.. International collaborative study on ghost cell odontogenic tumours: calcifying cystic odontogenic tumour, dentinogenic ghost cell tumour and ghost cell odontogenic carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2008. 37, (5) 302-308.

Lehembre, F., Yilmaz, M., Wicki, A., Schomber, T., Strittmatter, K., Ziegler, D., Kren, A., Went, P., Derksen, P.W., Berns, A., Jonkers, J., & Christofori, G.. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J.* 2008. 27, (19) 2603-2615.

Lemaitre, V. & D'Armiento, J.. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today.* 2006. 78, (1) 1-10.

Leonardi, R., Matthews, J.B., Caltabiano, R., Greco, M., Lombardo, C., Loreto, C., Santarelli, A., & Lo, M.L.. MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumour associated with NBCCS and sporadic keratocysts. *Oral Dis.* 2010. 16, (8) 795-800.

Levi, E., Fridman, R., Miao, H.Q., Ma, Y.S., Yayon, A., & Vlodavsky, I.. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010. 93, (14) 7069-7074.

Li, M.X., Xiao, Z.Q., Liu, Y.F., Chen, Y.H., Li, C., Zhang, P.F., Li, M.Y., Li, F., Peng, F., Duan, C.J., Yi, H., Yao, H.X., & Chen, Z.C.. Quantitative proteomic analysis of differential proteins in the stroma of nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal epithelial tissue. *J.Cell Biochem.* 2009. 106, (4) 570-579.

Li, N., Tang, B., Zhu, E.D., Li, B.S., Zhuang, Y., Yu, S., Lu, D.S., Zou, Q.M., Xiao, B., & Mao, X.H.. Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK. *FEBS Lett.* 2012. 586, (6) 722-728.

Li, Y., Zhang, Y., & Zheng, Q.. Expression of RECK gene and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma and its clinical significance. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* 2005a. 25, (5) 552-554.

Li, Y., Zhang, Y., & Zheng, Q.. Expression of RECK gene and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma and its clinical significance. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci.* 2005b. 25, (5) 552-554.

Lightner, V.A. & Erickson, H.P.. Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. *J.Cell Sci.* 1990. 95 (Pt 2), 263-277.

Limb, G.A., Matter, K., Murphy, G., Cambrey, A.D., Bishop, P.N., Morris, G.E., & Khaw, P.T.. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am.J.Pathol.* 2005. 166, (5) 1555-1563.

Lin, H.C., Chang, J.H., Jain, S., Gabison, E.E., Kure, T., Kato, T., Fukai, N., & Azar, D.T.. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2001. 42, (11) 2517-2524.

Liu, Y.E., Wang, M., Greene, J., Su, J., Ullrich, S., Li, H., Sheng, S., Alexander, P., Sang, Q.A., & Shi, Y.E.. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J.Biol.Chem.* 1997. 272, (33) 20479-20483.

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., & Bissell, M.J.. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J.Cell Biol.* 1997. 139, (7) 1861-1872.

Lohela, M. & Werb, Z.. Intravital imaging of stromal cell dynamics in tumors. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2010. 20, (1) 72-78.

Lohler, J., Timpl, R., & Jaenisch, R.. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell.* 2004. 38, (2) 597-607.

Lombardi, T. & Morgan, P.R.. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. *J.Oral Pathol.Med.* 1995. 24, (4) 170-176.

Long, N.K., Kato, K., Yamashita, T., Makita, H., Toida, M., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., & Shibata, T.. Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2008. 44, (11) 1052-1058.

Lopez-Otin, C., Palavalli, L.H., & Samuels, Y.. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle.* 2009. 8, (22) 3657-3662.

Lu, C.Y. & Lai, S.C.. Matrix metalloproteinase-2 and -9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2012.

Lucchese, A., Scivetti, M., Pilolli, G.P., & Favia, G.. Analysis of ghost cells in calcifying cystic odontogenic tumors by confocal laser scanning microscopy. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2007. 104, (3) 391-394.

Luo, D., Mari, B., Stoll, I., & Anglard, P.. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J.Biol.Chem.* 2002. 277, (28) 25527-25536.

Malemud, C.J.. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006. 11, 1696-1701.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., & Weinberg, R.A.. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008. 133, (4) 704-715.

Mannello, F., Luchetti, F., Falcieri, E., & Papa, S.. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis*. 2005. 10, (1) 19-24.

Mannello, F. & Medda, V.. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog.Histochem.Cytochem*. 2012. 47, (1) 27-58.

Mannello, F., Tonti, G.A., Bagnara, G.P., & Papa, S.. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006. 24, (3) 475-481.

Masloub, S.M., Abdel-Azim, A.M., & Elhamid, E.S.. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Diagn.Pathol*. 2011a. 6, 44.

Masloub, S.M., Abdel-Azim, A.M., & Elhamid, E.S.. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Diagn.Pathol*. 2011b. 6, 44.

Masui, T., Doi, R., Koshiba, T., Fujimoto, K., Tsuji, S., Nakajima, S., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Ito, D., Kami, K., Mori, T., Wada, M., Noda, M., & Imamura, M.. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin.Cancer Res*. 2003. 9, (5) 1779-1784.

Matsuzaka, K., Inoue, T., Nashimoto, M., Takemoto, K., Ishikawa, H., Asaka, M., Shimono, M., Fujikawa, M., & Noma, H.. A case of an ameloblastic fibro-odontoma arising from a calcifying odontogenic cyst. *Bull.Tokyo Dent.Coll*. 2001. 42, (1) 51-55.

McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., & Overall, C.M.. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*. 2000. 289, (5482) 1202-1206.

Mecham, R.P., Broekelmann, T.J., Fliszar, C.J., Shapiro, S.D., Welgus, H.G., & Senior, R.M.. Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. *J.Biol.Chem*. 1997. 272, (29) 18071-18076.

Melendez-Zajgla, J., Del, P.L., Ceballos, G., & Maldonado, V.. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. *Mol.Cancer*. 2008. 7, 85.

Miyagi, S.P., Hiraki, K.R., Martins, M.D., & Marques, M.M.. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. *J.Oral Sci*. 2008. 50, (2) 187-192.

Miyamoto, S., Yano, K., Sugimoto, S., Ishii, G., Hasebe, T., Endoh, Y., Kodama, K., Goya, M., Chiba, T., & Ochiai, A.. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 2004. 64, (2) 665-671.

Miyauchi, T., Kanekura, T., Yamaoka, A., Ozawa, M., Miyazawa, S., & Muramatsu, T.. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J.Biochem.* 1990. 107, (2) 316-323.

Miyazaki, K., Hasegawa, M., Funahashi, K., & Umeda, M.. A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature.* 1993. 362, (6423) 839-841.

Modolo, F., Martins, M.T., Loducca, S.V., & de Araujo, V.C.. Expression of integrin subunits alpha2, alpha3, alpha5, alphav, beta1, beta3 and beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium. *Oral Dis.* 2004. 10, (5) 277-282.

Monea, S., Jordan, B.A., Srivastava, S., DeSouza, S., & Ziff, E.B.. Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J.Neurosci.* 2006. 26, (8) 2300-2312.

Moreira, S.M., Andrade, F.K., Domingues, L., & Gama, M.. Development of a strategy to functionalize a dextrin-based hydrogel for animal cell cultures using a starch-binding module fused to RGD sequence. *BMC.Biotechnol.* 2008. 8, 78.

Morgan, P.R.. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol.2000.* 2011a. 57, (1) 160-176.

Morgan, P.R.. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol.2000.* 2011b. 57, (1) 160-176.

Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S., & Banda, M.J.. Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J.Biol.Chem.* 2000. 275, (2) 1384-1390.

Murphy, G., Segain, J.P., O'Shea, M., Cockett, M., Ioannou, C., Lefebvre, O., Chambon, P., & Basset, P.. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J.Biol.Chem.* 1993. 268, (21) 15435-15441.

Muschler, J., Levy, D., Boudreau, R., Henry, M., Campbell, K., & Bissell, M.J.. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res.* 2002. 62, (23) 7102-7109.

Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., & Sameshima, T.. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol.Int.* 2002. 52, (4) 255-264.

Nagai, N., Yamachika, E., Nishijima, K., Inoue, M., Shin, H.I., Suh, M.S., & Nagatsuka, H.. Immunohistochemical demonstration of tenascin and fibronectin in odontogenic tumours and human fetal tooth germs. *Eur.J.Cancer B Oral Oncol.* 1994. 30B, (3) 191-195.

Nagase, H.. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol.Chem.* 1997. 378, (3-4) 151-160.

Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G.. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc.Res.* 2006a. 69, (3) 562-573.

Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G.. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc.Res.* 2006b. 69, (3) 562-573.

Nagase, H. & Woessner, J.F., Jr.. Matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* 1999. 274, (31) 21491-21494.

Nakano, K., Siar, C.H., Nagai, N., Naito, I., Sado, Y., Nagatsuka, H., Hoh, C., Kurada, K., Tsujigiwa, H., & Gunduz, M.. Distribution of basement membrane type IV collagen alpha chains in ameloblastoma: an immunofluorescence study. *J.Oral Pathol.Med.* 2002. 31, (8) 494-499.

Namwat, N., Puetkasichonpasutha, J., Loilome, W., Yongvanit, P., Techasen, A., Puapairoj, A., Sripa, B., Tassaneeyakul, W., Khuntikeo, N., & Wongkham, S.. Downregulation of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is associated with enhanced expression of matrix metalloproteinases and cholangiocarcinoma metastases. *J.Gastroenterol.* 2011. 46, (5) 664-675.

Netzer, K.O., Suzuki, K., Itoh, Y., Hudson, B.G., & Khalifah, R.G.. Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. *Protein Sci.* 1998. 7, (6) 1340-1351.

Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Seshimo, I., Tsujino, T., Man-i M, Ikeda, J.I., Konishi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., & Monden, M.. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br.J.Cancer*. 2007. 96, (6) 986-992.

Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M., & Mareel, M.. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J.Cell Sci*. 2001. 114, (Pt 1) 111-118.

Nonaka, C.F., Augusto Vianna Goulart, F.J., Cristina da Costa, M.M., Batista de, S.L., & Pereira, P.L.. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in odontogenic myxoma and dental germ papilla. *Pathol.Res.Pract*. 2009. 205, (7) 458-465.

Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D.E., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G., & Raz, A.. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry*. 1994. 33, (47) 14109-14114.

Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., & Noda, M.. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 2001a. 107, (6) 789-800.

Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., & Noda, M.. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 2001b. 107, (6) 789-800.

Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y.. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J.Biol.Chem*. 1997. 272, (4) 2446-2451.

Omura, A., Matsuzaki, T., Mio, K., Ogura, T., Yamamoto, M., Fujita, A., Okawa, K., Kitayama, H., Takahashi, C., Sato, C., & Noda, M.. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J.Biol.Chem*. 1999. 274, (6) 3461-3469.

Ouyang, G., Wang, Z., Fang, X., Liu, J., & Yang, C.J.. Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells. *Cell Mol.Life Sci.* 2010. 67, (15) 2605-2618.

Overall, C.M.. Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. *Biochem.J.* 2004. 383, (Pt. 3) e5-e7.

Paiva, K.B., Zambuzzi, W.F., Accorsi-Mendonca, T., Taga, R., Nunes, F.D., Sogayar, M.C., & Granjeiro, J.M.. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. *J.Mol.Histol.* 2009. 40, (3) 201-207.

Parikka, M., Kainulainen, T., Tasanen, K., Bruckner-Tuderman, L., & Salo, T.. Altered expression of collagen XVII in ameloblastomas and basal cell carcinomas. *J.Oral Pathol.Med.* 2001. 30, (10) 589-595.

Pavloff, N., Staskus, P.W., Kishnani, N.S., & Hawkes, S.P.. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J.Biol.Chem.* 1992. 267, (24) 17321-17326.

Pei, D. & Weiss, S.J.. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature.* 1995. 375, (6528) 244-247.

Peinado, H., Quintanilla, M., & Cano, A.. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J.Biol.Chem.* 2003. 278, (23) 21113-21123.

Pindborg, J.J.. Is submucous fibrosis a precancerous condition in the oral cavity? *Int.Dent.J.* 1972. 22, (4) 474-480.

Pinheiro, J.J., Freitas, V.M., Moretti, A.I., Jorge, A.G., & Jaeger, R.G.. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology.* 2004a. 45, (1) 65-72.

Pinheiro, J.J., Freitas, V.M., Moretti, A.I., Jorge, A.G., & Jaeger, R.G.. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology.* 2004b. 45, (1) 65-72.

Pinheiro, J.J., Nascimento, C.F., Freitas, V.M., de Siqueira, A.S., Junior, S.M., & Jaeger, R.G.. Invadopodia proteins, cortactin and membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are expressed in ameloblastoma. *Histopathology.* 2011. 59, (6) 1266-1269.

Poomsawat, S., Punyasingh, J., & Vejchapipat, P.. Expression of basement membrane components in odontogenic tumors. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2007. 104, (5) 666-675.

Poomsawat, S., Punyasingh, J., Vejchapipat, P., & Larbcharoensub, N.. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-met in epithelial odontogenic tumors. *Acta Histochem.* 2012. 114, (4) 400-405.

Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M., & Thompson, E.W.. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin.Exp.Metastasis.* 1997. 15, (2) 111-120.

Qian, Y. & Huang, H.Z.. The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2010. 39, (8) 592-598.

Rabien, A., Ergun, B., Erbersdobler, A., Jung, K., & Stephan, C.. RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. *Prostate.* 2012. 72, (9) 948-954.

Rabien, A., Jung, M., Fritzsche, F., Loening, S.A., Kristiansen, G., & Jung, K.. [Tumor suppressor RECK in prostate carcinoma. Decreased RECK expression as indicator of proteolytic imbalance]. *Urologe A.* 2007. 46, (9) 1081-1082.

Radisky, E.S. & Radisky, D.C.. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2010a. 15, (2) 201-212.

Radisky, E.S. & Radisky, D.C.. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2010b. 15, (2) 201-212.

Raymond, W.A. & Leong, A.S.. Vimentin--a new prognostic parameter in breast carcinoma?. *J.Pathol.* 1989. 158, (2) 107-114.

Reis, S.T., Pontes-Junior, J., Antunes, A.A., Dall'Oglio, M.F., Dip, N., Passerotti, C.C., Rossini, G.A., Morais, D.R., Nesrallah, A.J., Piantino, C., Srougi, M., & Leite, K.R.. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. *BMC.Urol.* 2012. 12, 14.

Ren, C., Diniz, M.G., Piazza, C., Amm, H.M., Rollins, D.L., Rivera, H., Devilliers, P., Kestler, D.P., Waite, P.D., Mamaeva, O.A., & Macdougall, M.. Differential enamel and osteogenic gene expression profiles in odontogenic tumors. *Cells Tissues.Organs.* 2011. 194, (2-4) 296-301.

Ribeiro, A.L., Nobre, R.M., Alves-Junior, S.M., Kataoka, M.S., Barroso, R.F., Jaeger, R.G., & Pinheiro, J.J.. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and growth factors regulate the aggressiveness and proliferative activity of keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.* 2012. 114, (4) 487-496.

Ribeiro, B.F., Ferreira de Araujo, C.R., dos Santos, B.R., & de Almeida, F.R.. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 7, 9, and 26 in the calcifying cystic odontogenic tumor. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2011. 112, (5) 609-615.

Ribeiro, B.F., Iglesias, D.P., Nascimento, G.J., Galvao, H.C., Medeiros, A.M., & Freitas, R.A.. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.* 2009a. 15, (7) 472-477.

Ribeiro, B.F., Iglesias, D.P., Nascimento, G.J., Galvao, H.C., Medeiros, A.M., & Freitas, R.A.. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.* 2009b. 15, (7) 472-477.

Rifes, P., Carvalho, L., Lopes, C., Andrade, R.P., Rodrigues, G., Palmeirim, I., & Thorsteinsdottir, S.. Redefining the role of ectoderm in somitogenesis: a player in the formation of the fibronectin matrix of presomitic mesoderm. *Development.* 2007. 134, (17) 3155-3165.

Rodriguez, D., Morrison, C.J., & Overall, C.M.. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010. 1803, (1) 39-54.

Rohrbach, D.H., Robinson, L.K., & Murrah, V.A.. Loss of the basement membrane matrix molecule, bamin, in diphenylamine-treated mice. *Matrix.* 1993. 13, (5) 341-350.

Rosenthal, E.L., Shreenivas, S., Peters, G.E., Grizzle, W.E., Desmond, R., & Gladson, C.L.. Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2003. 113, (8) 1406-1410.

Saku, T., Okabe, H., & Shimokawa, H.. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumors. *J.Oral Pathol.Med*. 1992a. 21, (3) 113-119.

Saku, T., Okabe, H., & Shimokawa, H.. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumors. *J.Oral Pathol.Med*. 1992b. 21, (3) 113-119.

Salehinejad, J., Saghafi, S., Sharifi, N., Zare-Mahmoodabadi, R., Saghravanian, N., Ghazi, N., & Shakeri, M.T.. Evaluation of osteopontin and CD44v6 expression in odontogenic cystic lesions by immunohistochemistry. *Pathol.Res.Pract*. 2012. 208, (7) 410-414.

Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B.P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., Koono, M., & Wakisaka, S.. Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int.J.Cancer*. 2000. 88, (1) 21-27.

Sasahara, R.M., Brochado, S.M., Takahashi, C., Oh, J., Maria-Engler, S.S., Granjeiro, J.M., Noda, M., & Sogayar, M.C.. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer Detect.Prev*. 2002. 26, (6) 435-443.

Sasahara, R.M., Takahashi, C., & Noda, M.. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 1999a. 264, (3) 668-675.

Sasahara, R.M., Takahashi, C., Sogayar, M.C., & Noda, M.. Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. *Braz.J.Med.Biol.Res*. 1999b. 32, (7) 891-895.

Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., & Seiki, M.. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*. 1996. 393, (1) 101-104.

Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., & Bernfield, M.. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J.Cell Biol.* 1989. 108, (4) 1547-1556.

Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M.F., Mihalik, D., Gotte, M., Malle, E., Schaefer, R.M., & Grone, H.J.. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J.Clin.Invest.* 2005. 115, (8) 2223-2233.

Septier, D., Torres-Quintana, M.A., Menashi, S., George, A., & Goldberg, M.. Inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, alters the distribution of dentin matrix protein 1 in cultured embryonic mouse tooth germs. *Eur.J.Oral Sci.* 2001. 109, (3) 198-203.

Seulberger, H., Lottspeich, F., & Risau, W.. The inducible blood--brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J.* 1990. 9, (7) 2151-2158.

Shen, L.C., Chen, Y.K., Hsue, S.S., & Shaw, S.Y.. Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2010. 39, (3) 242-249.

Si, A.I., Huang, L., Xu, J., Kumta, S.M., Wood, D., & Zheng, M.H.. Expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in giant cell tumor of bone. *J.Cell Biochem.* 2003. 89, (6) 1154-1163.

Siar, C.H., Kawakami, T., Buery, R.R., Nakano, K., Tomida, M., Tsujigiwa, H., Han, P.P., Nagatsuka, H., & Ng, K.H.. Notch signaling and ghost cell fate in the calcifying cystic odontogenic tumor. *Eur.J.Med.Res.* 2011. 16, (11) 501-506.

Siar, C.H., Nagatsuka, H., Han, P.P., Buery, R.R., Tsujigiwa, H., Nakano, K., Ng, K.H., & Kawakami, T.. Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. *J.Oral Pathol.Med.* 2012. 41, (4) 332-339.

Siqueira, A.S., Carvalho, M.R., Monteiro, A.C., Freitas, V.M., Jaeger, R.G., & Pinheiro, J.J.. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology.* 2010. 57, (1) 128-137.

Smit, M.A. & Peeper, D.S.. Deregulating EMT and senescence: double impact by a single twist. *Cancer Cell.* 2008. 14, (1) 5-7.

Smith, C.E.. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 1998. 9, (2) 128-161.

Sobral, L.M., Montan, P.F., Martelli-Junior, H., Graner, E., & Coletta, R.D.. Opposite effects of TGF-beta1 and IFN-gamma on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures. *J.Clin.Periodontol.* 2007. 34, (5) 397-406.

Soikkeli, J., Podlasz, P., Yin, M., Nummela, P., Jahkola, T., Virolainen, S., Krogerus, L., Heikkila, P., von, S.K., Saksela, O., & Holtta, E.. Metastatic outgrowth encompasses COL-I, FN1, and POSTN up-regulation and assembly to fibrillar networks regulating cell adhesion, migration, and growth. *Am.J.Pathol.* 2010. 177, (1) 387-403.

Sommers, C.L., Gelmann, E.P., Kemler, R., Cowin, P., & Byers, S.W.. Alterations in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994. 54, (13) 3544-3552.

Song, S.Y., Son, H.J., Nam, E., Rhee, J.C., & Park, C.. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur.J.Cancer.* 2006. 42, (1) 101-108.

Sottrup-Jensen, L. & Birkedal-Hansen, H.. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J.Biol.Chem.* 1989. 264, (1) 393-401.

Span, P.N., Sweep, C.G., Manders, P., Beex, L.V., Leppert, D., & Lindberg, R.L.. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer.* 2003. 97, (11) 2710-2715.

Stenzinger, A., von, W.M., Rabien, A., Warth, A., Kamphues, C., Dietel, M., Weichert, W., Klauschen, F., & Wittschieber, D.. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif (RECK) expression: an independent prognostic marker of survival in colorectal cancer. *Hum.Pathol.* 2012. 43, (8) 1314-1321.

Sternlicht, M.D., Lochter, A., Simpson, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J., & Werb, Z.. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 1999. 98, (2) 137-146.

Sternlicht, M.D. & Werb, Z.. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2001. 17, 463-516.

Stetler-Stevenson, W.G.. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci.Signal.* 2008. 1, (27) re6.

Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., & Bode, W.. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 1995. 4, (5) 823-840.

Sulzbacher, I., Wick, N., Pichlhofer, B., & Mazal, P.R.. Expression of platelet-derived growth factor-AA and platelet-derived growth factor-alpha receptor in ameloblastomas. *J.Oral Pathol.Med.* 2008. 37, (4) 235-240.

Takagi, S., Simizu, S., & Osada, H.. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer Res.* 2009. 69, (4) 1502-1508.

Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T.P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R.M., Horimoto, A., Ikawa, Y., Ratzkin, B.J., Arakawa, T., & Noda, M.. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998. 95, (22) 13221-13226.

Takahashi, M., Tsunoda, T., Seiki, M., Nakamura, Y., & Furukawa, Y.. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene.* 2002. 21, (38) 5861-5867.

Takata, T., Zhao, M., Uchida, T., Wang, T., Aoki, T., Bartlett, J.D., & Nikai, H.. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. *J.Dent.Res.* 2000a. 79, (8) 1608-1613.

Takata, T., Zhao, M., Uchida, T., Wang, T., Aoki, T., Bartlett, J.D., & Nikai, H.. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. *J.Dent.Res.* 2000b. 79, (8) 1608-1613.

Takemoto, N., Tada, M., Hida, Y., Asano, T., Cheng, S., Kuramae, T., Hamada, J., Miyamoto, M., Kondo, S., & Moriuchi, T.. Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2007. 58, (3) 376-383.

Takeuchi, T., Hisanaga, M., Nagao, M., Ikeda, N., Fujii, H., Koyama, F., Mukogawa, T., Matsumoto, H., Kondo, S., Takahashi, C., Noda, M., & Nakajima, Y.. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* 2004. 10, (16) 5572-5579.

Taki, M., Verschueren, K., Yokoyama, K., Nagayama, M., & Kamata, N.. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int.J.Oncol.* 2006. 28, (2) 487-496.

Talbot, L.J., Bhattacharya, S.D., & Kuo, P.C.. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int.J.Biochem.Mol.Biol.* 2006. 3, (2) 117-136.

Thiery, J.P.. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2003. 15, (6) 740-746.

Thompson, E.W., Yu, M., Bueno, J., Jin, L., Maiti, S.N., Palao-Marco, F.L., Pulyaeva, H., Tamborlane, J.W., Tirgari, R., Wapnir, I., & .. Collagen induced MMP-2 activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 1994. 31, (2-3) 357-370.

Tian, Q.S. & Li, D.C.. Lentivirus-mediated reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs gene transfer suppresses pancreatic cancer invasion in vitro. *Saudi.Med.J.* 2010. 31, (7) 752-758.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R.A.. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002. 3, (5) 349-363.

Toole, B.P.. Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr.Top.Dev.Biol.* 2003. 54, 371-389.

Toole, B.P. & Slomiany, M.G.. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist.Updat.* 2008. 11, (3) 110-121.

Trimboli, A.J., Fukino, K., de, B.A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., Ostrowski, M.C., & Leone, G.. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 2008. 68, (3) 937-945.

Tsuneki, M., Maruyama, S., Yamazaki, M., Cheng, J., & Saku, T.. Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. *Pathol.Res.Pract.* 2012a. 208, (3) 140-146.

Tsuneki, M., Maruyama, S., Yamazaki, M., Cheng, J., & Saku, T.. Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. *Pathol.Res.Pract.* 2012b. 208, (3) 140-146.

Tuuttila, A., Morgunova, E., Bergmann, U., Lindqvist, Y., Maskos, K., Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Tryggvason, K., & Schneider, G.. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 1998. 284, (4) 1133-1140.

Vaananen, A., Srinivas, R., Parikka, M., Palosaari, H., Bartlett, J.D., Iwata, K., Grenman, R., Stenman, U.H., Sorsa, T., & Salo, T.. Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. *J.Dent.Res.* 2001. 80, (10) 1884-1889.

van den Oord, J.J., Paemen, L., Opdenakker, G., & de Wolf-Peeters, C.. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am.J.Pathol.* 1997. 151, (3) 665-670.

van der Jagt, M.F., Sweep, F.C., Waas, E.T., Hendriks, T., Ruers, T.J., Merry, A.H., Wobbes, T., & Span, P.N.. Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2006. 237, (2) 289-297.

Vered, M., Shohat, I., & Buchner, A.. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2003. 39, (2) 138-143.

Vered, M., Shohat, I., Buchner, A., & Dayan, D.. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol.* 2005. 41, (10) 1028-1033.

Vincenti, M.P., Coon, C.I., Mengshol, J.A., Yocum, S., Mitchell, P., & Brinckerhoff, C.E.. Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). *Biochem.J.* 1998. 331 (Pt 1), 341-346.

Vinothini, G., Aravindraja, C., Chitrathara, K., & Nagini, S.. Correlation of matrix metalloproteinases and their inhibitors with hypoxia and angiogenesis in premenopausal patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin.Biochem.* 2011. 44, (12) 969-974.

Visse, R. & Nagase, H.. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ.Res.* 2003. 92, (8) 827-839.

Vogel, W.F., Aszodi, A., Alves, F., & Pawson, T.. Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol.Cell Biol.* 2001. 21, (8) 2906-2917.

Wang, H. & Keiser, J.A.. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2000. 272, (3) 900-905.

Wang, Y.P. & Liu, B.Y.. Expression of osteopontin and its receptors in ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2009. 45, (6) 538-542.

Weinberg, R.A.. Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat.Cell Biol.* 2008. 10, (9) 1021-1023.

Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B., & Murphy, G.. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J.Biol.Chem.* 1996. 271, (29) 17119-17123.

Williamson, R.A., Martorell, G., Carr, M.D., Murphy, G., Docherty, A.J., Freedman, R.B., & Feeney, J.. Solution structure of the active domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. A new member of the OB fold protein family. *Biochemistry.* 1994. 33, (39) 11745-11759.

Wittschieber, D., Stenzinger, A., Klauschen, F., Stephan, C., Jung, K., Erbersdobler, A., & Rabien, A.. Decreased RECK and Increased EMMPRIN expression in urothelial carcinoma of the bladder are associated with tumor aggressiveness. *Pathobiology.* 2011. 78, (3) 123-131.

Wu, J., Ru, N.Y., Zhang, Y., Li, Y., Wei, D., Ren, Z., Huang, X.F., Chen, Z.N., & Bian, H. HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF-beta signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene*. 2011a. 30, (43) 4410-4427.

Wu, J., Ru, N.Y., Zhang, Y., Li, Y., Wei, D., Ren, Z., Huang, X.F., Chen, Z.N., & Bian, H.. HAb18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF-beta signaling and is transcriptionally regulated by Slug. *Oncogene*. 2011b. 30, (43) 4410-4427.

Xie, M., Jiao, T., Chen, Y., Xu, C., Li, J., Jiang, X., & Zhang, F.. EMMPRIN (basigin/CD147) is involved in the morphogenesis of tooth germ in mouse molars. *Histochem.Cell Biol*. 2010. 133, (5) 585-594.

Xu, Z.Y., Gao, J.P., Sun, Y.H., Zhang, Z.Y., Ge, J.P., Xu, C.L., & Wang, L.H.. [Nonsteroidal anti-inflammatory drug NS398 induces RECK expression in the animal model of prostate cancer]. *Zhonghua Nan.Ke.Xue*. 2010. 16, (12) 1079-1082.

Xue, C., Plieth, D., Venkov, C., Xu, C., & Neilson, E.G.. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2003a. 63, (12) 3386-3394.

Xue, W.C., Feng, H.C., Tsao, S.W., Chan, K.Y., Ngan, H.Y., Chiu, P.M., Maccalman, C.D., & Cheung, A.N.. Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int.J.Gynecol.Cancer*. 2003b. 13, (6) 879-888.

Yang, J. & Weinberg, R.A.. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev.Cell*. 2008. 14, (6) 818-829.

Yang, Z., Strickland, D.K., & Bornstein, P.. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J.Biol.Chem*. 2001. 276, (11) 8403-8408.

Yokoyama, K., Kamata, N., Fujimoto, R., Tsutsumi, S., Tomonari, M., Taki, M., Hosokawa, H., & Nagayama, M.. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int.J.Oncol*. 2003. 22, (4) 891-898.

Yoon, H.J., Jo, B.C., Shin, W.J., Cho, Y.A., Lee, J.I., Hong, S.P., & Hong, S.D.. Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 2011. 112, (6) 767-776.

Zeisberg, M. & Neilson, E.G.. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J.Clin.Invest.* 2009. 119, (6) 1429-1437.

Zhang, B., Zhang, J., Xu, Z.Y., & Xie, H.L.. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC.Cancer.* 2009a. 9, 427.

Zhang, B., Zhang, J., Xu, Z.Y., & Xie, H.L.. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC.Cancer.* 2009b. 9, 427.

Zhang, Y., Cheng, S., Zhang, G., Ma, W., Liu, Y., Zhao, R., Zhang, Q., & Pang, D.. Low expression of RECK indicates a shorter survival for patients with invasive breast cancer. *Cancer Sci.* 2012. 103, (6) 1084-1089.

Zhao, Y.G., Xiao, A.Z., Park, H.I., Newcomer, R.G., Yan, M., Man, Y.G., Heffelfinger, S.C., & Sang, Q.X.. Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2004. 64, (2) 590-598.

Zucker, S., Hymowitz, M., Rollo, E.E., Mann, R., Conner, C.E., Cao, J., Foda, H.D., Tompkins, D.C., & Toole, B.P.. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am.J.Pathol.* 2001. 158, (6) 1921-1928.

Zustin, J., Scheuer, H.A., & Friedrich, R.E.. Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. *J.Oral Pathol.Med.* 2010. 39, (1) 115-120.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 82/11
CAAE 0094.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Perfil de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMP e RECK) em tumores odontogênicos benignos**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Fábio César Prosdócimi e Profa. Dra. Katiúca B.S. Paiva, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Fábio Daumas Nunes.

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, 08 de agosto de 2011.

Prof. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP