SUELI PATRICIA HARUMI MIYAGI

ANÁLISE *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ
EXTRACELULAR (MEC) E DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ (MMPs)
EM CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA

São Paulo
2008

Sueli Patricia Harumi Miyagi

Análise in vitro da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células-tronco de polpa dentária humana

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Miyagi SPH. *Análise in vitro da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células-tronco adultas de polpa dentária humana* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo,   /   /

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof. Dr. _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À Deus, pela oportunidade de aprender, evoluir e vivenciar esta experiência ímpar em minha vida.

Aos meus pais, Julia e Issaku Miyagi (*in memoriam*) pelo amor e incentivo diário às nossas conquistas. O nosso diferencial realmente é a união e a perseverança. Sem vocês não seria quem sou, não estaria onde estou e tão pouco alcançaria mais este objetivo de vida. Muito obrigada.

Aos meus irmãos, Paulo, Karen e Samara Miyagi pelo carinho e amizade que há entre nós. Cada um a sua maneira foi fundamental para a conclusão desta tese.

Ao meu noivo Laurencio Cara, companheiro inseparável de todas as horas. Amoroso, paciente, gentil e compreensivo, esta conquista também é sua. Amo muito você.

Aos meus cunhados Tais, Thiago e Roberto pelo incentivo em todos os momentos.

Quando se conta com alguém com menos qualidades que as suas, há a degeneração.
Quando se conta com alguém com qualidades iguais às suas, há a estagnação.
Somente quando se conta com alguém com qualidades superiores às suas é que se atinge a evolução."

(Dalai Lama)

À Prof. Dra. Márcia Martins Marques que acreditou no meu potencial de pesquisa, desde primeira curva de crescimento no projeto de iniciação científica da graduação, sempre incentivando minha evolução no ambiente universitário com muita generosidade, paciência, carinho e dedicação. Desde então, alegra-se a cada nova conquista, independente do tamanho dela. Em muitos momentos a Professora confunde-se com uma “mãe coruja” que é capaz de defender seus filhotes quando os vê injustiçados. Passei por isso, e sei que não é qualquer professor que o faz por seus alunos. Apesar disso, sabe cobrar um trabalho duro quando o mesmo se faz necessário, mas sem autoritarismo, pois seu lema é “conversando a gente se entende”, e o engraçado é que tudo sempre dá certo no final. Tem um estilo próprio de encarar a vida, sabe tornar o complicado, simples e não sabe fazer as coisas de outra maneira. Enfrenta os obstáculos como uma “formiguinha” batalhadora que sabe que nem sempre seu empenho será reconhecido, mas já que deve de ser feito, “let’s do it!”. Agora que ganhei sua atenção (risos), agradeço por tudo de coração e espero ter sua amizade sempre.

"Uma maneira de ser feliz é ter amigos, se você se sente só é porque construiu muros ao invés de pontes".

(Anônimo)

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra, mas quando parte, leva um pouco de nós e deixa um pouco de si mesmo."

(Kalil Gibran)

À Profa. Dra. Irina Kerkis, responsável pelo Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Genética do Instituto Butantan. Seu apoio e generosidade em compartilhar sua amizade, conhecimentos, alunos, funcionários e laboratório foram essenciais para que este sonho se tornasse realidade. Admiro muito seu entusiasmo científico e dedicação à pesquisa de novas fontes de células-tronco. Seus trabalhos certamente serão de grande importância para muitas áreas da Odontologia. Muito obrigada por esta oportunidade única e espero ter sempre sua amizade.

Ao Prof. Alexandre Kerkis, professor extremamente gentil e dedicado à pesquisa, que associado ao profissionalismo da Profa Irina, faz com que o grupo de pesquisa do Instituto Butantan, seja unido e coeso. Agradeço pelas dicas e pela atenção dispensada durante todo este período.

Aos meus queridos amigos Carlos Magno da Costa Maranduba e Nelson Foresto Lizier pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos da execução desta tese. Amizade pode ser personificada nessas duas pessoas. Muito obrigada por vocês existirem.

À amiga Bábyla Geraldles Monteiro pelo apoio nos momentos que mais precisei durante este ano que passou, sempre muito gentil e prestativa. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos do Instituto Butantan Profa. Adriana Neves, Lisley Mambelli, Sonja Lobo, Thais Lavagnolli, Fernando de Sá, Enrico Jardim e Filomena. Excelentes profissionais e dedicados pesquisadores, muito obrigada pelo apoio em todos os momentos desta jornada.

Às amigas e técnicas do Instituto Butantan Zenaide e Vera Lucia. Sempre companheiras e dedicadas aos alunos e professores, fizeram o possível e impossível para que nada me faltasse durante a execução dos experimentos no Laboratório de Cultura. Muito obrigada pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

À amiga Adriana Fernandes Paisano. Você é um exemplo de pessoa que ama o que faz, e o faz bem feito. É uma amiga sincera para todas as horas, a mais organizada de todas, tudo esquematizado, inclusive os finais de semana. De vez em quando um ou outro relatório semestral passava, mas ninguém é perfeito (risos). Parece que foi ontem que nos conhecemos e conversávamos sobre os alertas de prazo do sistema Fênix. Nosso dia realmente teria que ter 48 horas para dar conta todos os compromissos, muita adrenalina! Mas, se não fosse assim, não teria graça, não é?

À amiga Isabel Mello. Sinto muita saudade da fase de créditos do curso quando nos encontrávamos todas as semanas. Apesar da distância e da correria, sei que sempre poderemos contar uma com a outra.

Às amigas Eliana Barbosa, Dirce Sakaguti e Andréa Yamazaki. A amizade que há entre vocês é única, personalidades distintas que se completam. Tentei ser a “quarta mosqueteira” de todas as formas (risos), espero que vocês alcancem todos seus objetivos de vida.

À amigas do coração Maria Stella Moreira Katayama, Karen Renata Nakamura Hiraki e Patricia Leonel Galdino pela amizade fiel nos bons e maus momentos de minha vida profissional e pessoal. A felicidade e cumplicidade de vocês a cada conquista sempre me servem de estímulo para seguir adiante.

À amiga e Profa. Manoela Domingues Martins que gentilmente me apresentou o Laboratório de Cultivo Celular, logo após uma de nossas aulas de Patologia Bucal na graduação da FOU SP, nem vou falar quando foi isso (risos!). Seu incentivo me fez procurar a Profa. Márcia e iniciar minha vida acadêmica. Hoje sou pesquisadora, professora e estou finalizando o doutorado! Muito obrigada por tudo!

À Profa. Kristianne Porta Santos Fernandes (Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, SP; UNINOVE, São Paulo, SP) que generosamente abriu as portas para uma nova fase na minha vida, a docência.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Bombana, Coordenador do curso da Pós-Graduação da Disciplina de Endodontia da FOU SP. Professor generoso e educador da maior

competência é um exemplo a todos da nova geração de pós-graduandos de nossa faculdade. Muito obrigada por ter acreditado em meu trabalho. Tentei dar o máximo de mim, para que viesse a ter orgulho desta que lhe admira muito.

Aos amigos de Pós-graduação Denise Pontes Raldi, Marina Beloti, Crys Amorim, Lieni Okino, Alexandre Bezerra, Carmo Aun, Soraia Santana, Eduardo Akisue e Ângela Araki pela ótima convivência em todos os momentos.

Aos professores Carlos Eduardo Aun, Celso Luis Caldeira, Giulio Gavini, Igor Prokopowitsch, João Humberto Antoniazzi, José Luis da Silva Lage Marques, Manoel Eduardo de Lima Machado e Marcelo dos Santos pelo agradável convívio durante os créditos do curso de Pós-Graduação na Disciplina de Endodontia da FOU SP.

Aos funcionários Ana Maria, Sr. Aldo, Davi, Soninha, Sr. Arnaldo e Luisinho pela atenção que dedicam aos alunos de graduação e pós-graduação da Disciplina de Endodontia da FOU SP.

Às funcionárias Catia Tiezzi dos Santos, Nair H. T. Costa e Alessandra que atendem a todos os alunos com profissionalismo e competência no setor de Pós-Graduação da FOU SP.

À funcionária da Biblioteca da FOU SP Glauci, pelo cuidado e atenção na correção desta tese para elaboração da ficha catalográfica.

À Comissão de Pós-Graduação da FOU SP.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida durante parte do curso de doutorado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por acreditar neste projeto.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOU SP) por me acolher carinhosamente da graduação até os dias de hoje.

Miyagi SPH. Análise *in vitro* da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células-tronco adultas de polpa dentária humana [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Células-tronco adultas podem ser isoladas de vários tecidos, dentre eles a polpa dentária humana, tecido originado na papila dentária do dente em desenvolvimento. Estas linhagens multipotentes podem ser estudadas sob vários aspectos, como na elucidação da histogênese de tumores. O objetivo deste estudo foi inferir a histogênese do mixoma odontogênico, neoplasia odontogênica benigna, analisando a expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células-tronco adultas de polpa dentária humana. Três linhagens diferentes de células-tronco originadas de polpas dentárias humanas IDPSCs (DL-1, DL-2 e DL4) foram utilizadas. As proteínas analisadas foram as mesmas expressas na neoplasia: vimentina, colágeno tipo I, fibronectina, tenascina, ácido hialurônico e MMPs (MMP-1, MMP-2 e MMP-9). Imunofluorescência e ensaios enzimáticos foram utilizados para analisar a presença de proteínas nas células cultivadas e no meio de cultura condicionado por estas células, respectivamente. Todas as linhagens celulares expressaram a vimentina e nenhuma expressou o ácido hialurônico. A linhagem celular DL-1 expressou todas as outras proteínas da matriz extracelular estudadas, enquanto que na linhagem DL-2 apenas não foi observada a expressão do colágeno tipo I. Fibronectina e tenascina não foram observados na linhagem DL-4. Todas as linhagens expressaram todas as MMPs, sendo

que a produção de MMP-2 nas três linhagens foi significativamente maior que a de todas outras MMPs. Baseado nas condições deste estudo, é possível concluir que a expressão de proteínas da MEC e de MMPs em células-tronco de polpa dentária humana apresentaram perfil similar àquela apresentada no mixoma odontogênico, exceto pela ausência de marcação do ácido hialurônico em todas as linhagens. A ausência de secreção de ácido hialurônico pelas IDPSCs poderia indicar que o mixoma odontogênico deriva de uma célula mais diferenciada que as células-tronco.

Palavras-Chave: Células-tronco adultas - Polpa dentária - Metaloproteinases da matriz - Matriz extracelular - Mixoma odontogênico

Miyagi SPH. Analysis of ECM proteins and MMPs expression in human dental pulp stem cells [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008

ABSTRACT

Adult stem cells can be isolated from different tissues including the human dental pulp, a structure originated from the dental papillae. These cell lineages are of importance in a series of studies, as the analysis of tumors histogenesis. The aim of this study was to infer the histogenesis of odontogenic myxoma, a benign odontogenic neoplasia by analyzing the ECM and MMPs molecules expressed in human dental pulp stem cells. Three different lineages of immature dental pulp stem cells (IDPSCs) (DL-1, DL-2 and DL-4) were used. The proteins searched were those expressed by the tumoral cells: vimentin, type I collagen, fibronectin, tenascin and hialuronic acid (HA) and the matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9). Immunofluorecence and enzymatic assays were used for analyzing the presence of the proteins in the cells and in the culture media conditioned by the cells, respectively. All the lineages expressed vimentin; however none expressed HA. DL-1 lineage expressed all the other ECM proteins, and the expression of type I collagen was not observed in the DL-2 lineage. Fibronectin and tenascin were not observed in the DL-4 lineage. All the lineages expressed all the MMPs. The release of MMP-2 from all cell lineages was significantly higher than those of all other MMPs. Based on the conditions of this study its possible to conclude that the overall expression of MEC proteins and MMPs in the lineages of human dental pulp stem cells

were similar to those found in the odontogenic myxoma, except for the absence of hyaluronic acid. The absence of HA secretion by the IDPSCs could indicate that the odontogenic myxoma tumoural cells derive from a cell more differentiated than the stem cells.

Keywords: Adult stem cells - Dental pulp - Matrix metalloproteinases - Extracellular matrix - Odontogenic myxoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Localização esquemática dos domínios que compõem as metaloproteinases da matriz (MMPs).....	58
Figura 4.1 -	Fotomicrografia de contraste de fase das três linhagens celulares	71
Figura 4.2 -	Esquema do ensaio de atividade de MMPs	78
Figura 5.1 -	Fotomicrografias de fluorescência para vimentina e componentes da MEC na linhagem celular DL-1	84
Figura 5.2 -	Fotomicrografias de fluorescência para MMPs na linhagem celular DL-1 ..	85
Figura 5.3 -	Análise quantitativa de atividade de MMPs (ng/mL) detectado nos meios condicionados pelas células-tronco das linhagens provenientes de polpas dentárias humanas (DL-1, DL-2 e DL-4)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - MMPs humanas conhecidas divididas por grupo, numeração, peso molecular e outras nomenclaturas descritas na literatura	49
Tabela 4.1 - Características dos anticorpos primários utilizados para as reações de imunofluorescência nas células-tronco de polpa dentária humana	73
Tabela 5.1 - Resultados das reações de imunofluorescência realizadas nas linhagens DL-1, DL-2 e DL-4	81
Tabela 5.2 - Conteúdo de MMPs (ng/ml) detectado nos meios condicionados pelas células-tronco das linhagens provenientes de polpa dentária humana (DL-1, DL-2 e DL-4).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
APMA	<i>p-aminophenylmercuric acetato</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> Albumina Sérica Bovina
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
DL	Linhagem de células-tronco de polpa dentária humana
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i> Dimetilsulfóxido
DSPP	<i>Dentin sialophosphoprotein</i> Sialofosfoproteína da dentina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzymatic-linked immunosorbant assay</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> Fator de crescimento fibroblástico
FTTC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> Isotiocianato de fluoresceína
IDPSCs	<i>Immature Dental Pulp Stem Cells</i> Células-tronco imaturas de polpas dentárias
kDa	kiloDalton

LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i> Fator inibitório de leucemia
MEC	Matriz extracelular
MEPE	<i>Matrix extracellular phosphoglycoprotein</i> Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
Mix1	Linhagem celular derivada do mixoma odontogênico humano
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i> Metaloproteínas da matriz
MO	Mixoma odontogênico
MT-MMPs	<i>Membrane-type metalloproteinases</i> Metaloproteínas tipo membrana
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBSA	<i>Phosphate buffered saline, calcium and magnesium free</i> Solução tampão fosfato salina, sem cálcio e sem magnésio
pH	Cologarítmo de concentração hidrogeniônica de uma solução Potencial Hidrogeniônico
proMMP	Proenzima, zimógeno, forma latente ou forma inativa da metaloproteínase da matriz
rpm	rotações por minuto
SHED	<i>Stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
SSEA-3	<i>Stage specific embryonic Antigen 3</i>
SSEA-4	<i>Stage specific embryoinic Antigen 4</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> Solução tampão Tris
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TRA-1-60	<i>Tumour Rejection Antigen 1-60</i>

TRA-1-81	<i>Tumour Rejection Antigen</i> 1-81
TRIS	Tris-hidroxi-metil-aminometano
α 2-M	alfa 2-macroglobulina
μ m	micrômetro

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 Células-tronco	29
2.1.1 Células-tronco embrionárias	32
2.1.2 Células-tronco adultas	33
2.1.2.1 células-tronco adultas de polpas dentárias.....	34
2.1.3 Dificuldades de cultivo.....	37
2.2 Mixoma odontogênico	39
2.2.1 Características clínicas	41
2.2.2 Características histológicas	42
2.2.3 Características radiográficas	45
2.2.4 Tratamento e prognóstico	46
2.3 Metaloproteínases da matriz (MMPs)	47
2.3.1 Classificação	48
2.3.1.1 colagenases.....	50
2.3.1.2 gelatinases.....	51
2.3.1.3 estromelisinases	53
2.3.1.4 metaloproteínases tipo membrana.....	53
2.3.1.5 outras MMPs	54
2.3.2 Características das MMPs.....	55
2.3.3 MMPs e Processos.....	59
2.3.4 Regulagem da atividade.....	60
2.3.4.1 transcrição gênica.....	60
2.3.4.2 ativação de proenzimas	61
2.3.4.3 inibição de MMPs	62
3 PROPOSIÇÃO	65
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 Cultivo celular	68
4.2 Imunofluorescência	72
4.3 Ensaio de atividade de MMPs	74
4.3.1 Condicionamento do meio pelas células.....	74
4.3.2 Preparo de soluções.....	75
4.3.3 Dias experimentais.....	76
4.4 Análise estatística	79

5 RESULTADOS	80
5.1 Imunofluorescências	81
5.1.1 Vimentina	81
5.1.2 Proteínas da matriz extracelular.....	82
5.1.3 Metaloproteinases da matriz	83
5.2 Ensaio de atividade de MMPs	86
5.2.1 Comparação de produção entre as MMPs.....	87
5.2.2 Comparação de produção em função das linhagens celulares	87
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	104
ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

Desde que foi desenvolvida a primeira linhagem de células-tronco embrionárias (CTEs) humanas, isolada a partir de um blastocisto, o tema tem despertado a atenção e interesse da comunidade científica, tanto pelo potencial terapêutico quanto pelos conceitos éticos e legais envolvidos na manipulação dessas células (THOMSON et al., 1998).

Na área odontológica, uma importante fonte de células-tronco adultas (CTAs) é a polpa dentária, que da mesma forma que a medula-óssea, contém células não diferenciadas no interior de um tecido já diferenciado (BIANCO; ROBEY, 2000). Acredita-se que as CTAs de polpa dentária estejam localizadas na região perivascular, mas outras origens não podem ser excluídas (SHI; GRONTHOS, 2003).

Uma das possíveis utilizações clínicas dessas células seria no reparo do osso craniofacial e também na regeneração ou substituição de dentes (GRONTHOS et al., 2000; KREBSBACH; ROBEY, 2002; MIURA et al., 2003; MAO et al., 2006).

As opções de estudo com células-tronco (CTs) são inúmeras, principalmente pela escassez de dados na literatura a respeito de CTAs de polpa dental humana. Além disso, esse estudo se justifica pela importância que essas células representam na área odontológica, em especial no entendimento da biologia de tumores odontogênicos.

O objetivo do trabalho foi utilizar CTAs de polpa dentária humana na tentativa de compreender melhor a histogênese de uma neoplasia odontogênica originada da papila dentária, tecido que origina a polpa dentária, através da comparação da expressão de

moléculas da MEC e de MMPs específicas detectadas previamente em células do mixoma odontogênico (JAEGER et al., 2000; MIYAGI, 2002; MIYAGI et al., 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar a compreensão dos assuntos abordados, a revisão da literatura foi dividida em três tópicos principais: **2.1 Células-tronco**; **2.2 Mixoma odontogênico** e **2.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs)**.

2.1 Células-tronco

Em 1981, Evans e Kaufman isolaram pela primeira vez células-tronco embrionárias (CTEs) de camundongos. Mas somente quando se tornou pública a clonagem da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997) e após a primeira clonagem de CTEs humanas por Thomson et al. (1998), as células-tronco (CTs) se tornaram objeto de muitas discussões na sociedade e na comunidade científica (CONRAD; HUSS, 2005).

As CTs apresentam três características principais, a saber: a) capacidade de produzir CTs filhas idênticas por um grande número de divisões (auto-renovação); b) capacidade de diferenciação em células maduras com morfologia e função específicas e, c) capacidade de repor células mortas ou danificadas durante o remodelamento tecidual, processo altamente regulado e organizado (SLACK, 2000; ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE; HU, 2005; LAKSHIPATHY; VERFAILLIE, 2005; MOORE; MILLS; THORNTON, 2006; DALERBA; CHO; CLARKE, 2007).

Esse processo de reposição pode ser observado em células do sangue e do sistema imunológico, onde todas as células descendem das células-tronco hematopoiéticas (CTH). As CTs representam menos de 0,01% de todas as células da medula óssea do adulto. Cada CT origina dois tipos celulares, uma célula progenitora com diferenciação intermediária que se divide e se diferencia até formar as células maduras e funcionais e outra que permanece em estado indiferenciado. Dessa forma, o número de CTs permanece constante, enquanto as células progenitoras intermediárias proliferam continuamente (LAKSHIPATHY; VERFAILLIE, 2005; CLARKE; BECKER, 2006).

Acredita-se que a proliferação celular esteja relacionada à regulação da atividade da enzima telomerase. Telômero é a porção terminal de cromossomos eucarióticos (seqüência TTAGGG) que protege contra fusão celular e à mistura de material genético (BODNAR et al., 1998; TAM; ANG; LIM, 2007). A telomerase é a enzima responsável pela manutenção do comprimento dos telômeros e pela estabilidade estrutural cromossômica de células eucariontes. A diminuição de sua atividade resulta no encurtamento do telômero, diminuição da taxa de proliferação celular e posterior senescência da célula (NUGENT et al., 1998; TAM; ANG; LIM, 2007).

O papel da telomerase na manutenção da proliferação celular é o que difere a CT de outros tipos celulares. Na maior parte das células somáticas essa enzima é ativa apenas durante a embriogênese, sendo suprimida após o nascimento. Em CTs e células progenitoras a telomerase se mantém ativa estimulando a reposição e auto-renovação celular (GREIDER; BLACKBURN, 1985; TAM; ANG; LIM, 2007).

A plasticidade das CTs pode estar relacionada a dois mecanismos: diferenciação e fusão celular. Na diferenciação a CT de uma linhagem se diferencia em um tipo celular de linhagem distinta, com a perda de marcadores de superfície específicos e função da

célula original. Na fusão celular há a união do conteúdo de CTs com o material de células locais, o que resulta na formação de uma célula híbrida com potencial de diferenciação, mas que ainda apresenta marcadores genéticos da célula hospedeira local (RAFF, 2003; WAGERS; WEISSMAN, 2004; FORTIER, 2005).

A fusão celular pode formar 3 tipos distintos de células: **a) Sincício:** onde células *da mesma linhagem* sofrem fusão e formam uma célula com múltiplos núcleos ($n \geq 2$). A célula neoformada pode apresentar fenótipo alterado e novas funções; **b) Heterocarion:** onde células *de diferentes linhagens* sofrem fusão e formam célula única com múltiplos núcleos ($n \geq 2$) e **c) Sincarion:** onde células da mesma linhagem ou de linhagens diferentes fundem e formam uma célula com *núcleo único*. Dentre as novas funções da célula podem incluir mudança de fenótipo, transdiferenciação e proliferação (OGLE; CASCALHO; PLATT, 2005).

A formação de sincícios ocorre espontaneamente no organismo podendo ser encontrados em tecidos normais, enquanto que os heterocarions formam-se apenas em sistemas experimentais *in vitro*. Apesar disso, em estudo recente de transplante de fibroblastos e CTs *in vivo* mostrou a formação espontânea de heterocarions, sem a necessidade de manipulação em cultura (GIBSON et al., 1995; OGLE; CASCALHO; PLATT, 2005).

Para facilitar o entendimento, as CTs podem ser divididas em dois tipos: CTs embrionárias e adultas.

2.1.1 Células-tronco embrionárias (CTEs)

As CTEs são aquelas isoladas da mórula compacta ou da massa celular interna de blastocistos (NIH, 2001). As CTEs são pluripotentes, ou seja, apresentam potencial para diferenciar-se em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), além da possibilidade de formarem teratomas (THOMSON et al., 1998). Os teratomas são tumores compostos por uma variedade de células parenquimais representativas de mais de uma camada germinativa, geralmente de todas as três. No seu interior podem ser encontrados tecidos maduros como pele, músculo, gordura e até mesmo estruturas dentárias (COTRAN et al., 1996).

Alguns marcadores específicos para identificação para CTEs são: os marcadores de superfície SSEA-3 (*Stage Specific Embryonic Antigen 3*), SSEA-4 (*Stage Specific Embryonic Antigen 4*), TRA-1-60 (*Tumour Rejection Antigen 1-60*) e TRA-1-81 (*Tumour Rejection Antigen 1-81*) (THOMSON et al., 1995; THOMSON et al., 1998). Fosfatase alcalina e marcadores moleculares de indiferenciação tais como Oct-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) e Nanog também podem ser utilizados para se identificar estas células (NICHOLS et al., 1998; PESCE; SCHÖLER, 2001; KUES; CARNWATH; NIEMANN, 2005).

2.1.2 Células-tronco adultas (CTAs)

As células-tronco adultas (CTAs) são células indiferenciadas isoladas de tecidos de um indivíduo adulto (ou já formado), tais como medula óssea, sangue, córnea e retina do olho, cérebro, músculo esquelético, polpa dental, fígado, pele, no cordão umbilical e a placenta (NIH, 2001; KERKIS et al., 2004; TARNOWSKI; SIERON, 2006).

Essas células apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação mais restrita (multipotente) e possuem menor potencial teratogênico quando comparado às CTEs (PRESTON et al., 2003; ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE; HU, 2005).

O foco das pesquisas mundiais até pouco tempo eram as CTEs, pois acreditava-se que estas seriam as únicas com plasticidade suficiente para diferenciação nos diversos tipos celulares do organismo, enquanto que as CTAs estariam programadas a se diferenciarem apenas em células do tecido de origem.

Atualmente, sabe-se que o potencial de diferenciação de CTAs é maior do que se imaginava (BLAU; BRAZELTON; WEIMANN; 2001). As CTAs de medula-óssea além de poderem fazer a reconstituição hematopoiética, têm mostrado capacidade de regenerar estruturas como o fígado, rins e coração (BRAZELTON et al., 2000; MEZEY et al.; 2000) e potencial de diferenciação para células musculares (FERRARI et al., 1998) e neuronais (EGLITIS; MEZEY, 1997; KREBSBACH; ROBEY, 2002; RAFF, 2003).

Uma das grandes vantagens dos estudos com CTAs é evitar os problemas éticos que envolvem as CTEs. Além disso, dependendo do caso, podem-se tentar a utilização de células do próprio paciente que necessita do tratamento, evitando-se a rejeição imunológica e reduzindo-se o potencial de formação de tumores, frequentemente

relacionados nos transplantes de células-tronco embrionárias e progenitoras em camundongos (SMITH, 2001).

CTAs estão sujeitas ao envelhecimento por possuírem atividade de telomerase limitada, que resulta no encurtamento dos telômeros e no limitado potencial de auto-renovação em cultura. As CTEs parecem estar livres desse processo, sendo aparentemente imortais *in vitro* (TAM; ANG; LIM, 2007).

Alguns marcadores de CTAs mesenquimais humanos conhecidos e utilizados são: SH-2 (CD105), SH-3 e SH-4 (reconhecem diferentes epítomos do CD73) (PITTENGER; MARSHAK, 2001; KERKIS et al., 2004).

2.1.2.1 células-tronco adultas de polpa dentária

As CTs provenientes de medula óssea são as células mais estudadas entre as CTAs, apesar de ser considerada uma fonte muito invasiva (HOUGHTON et al., 2004).

Gronthos et al. (2000) visando estudar novas fontes dessas células no corpo humano desenvolveram e analisaram 2 culturas de polpas dentárias humanas extraídas a partir de polpas de terceiros molares inclusos. Foram realizadas análises imunohistoquímica e estrutural comparando-se CTs de medula óssea e as culturas primárias de polpa dentária. A análise imunohistoquímica mostrou falta de uniformidade nas marcações indicando a heterogeneidade celular, independentemente da fonte. A negatividade para o marcador específico de odontoblastos DSPP (*dentin sialophosphoprotein*) sugeriu o fenótipo indiferenciado das culturas de polpa. Adicionalmente, essas células

apresentaram taxa de proliferação celular maior que a apresentada pelas CTs de medula. A análise estrutural mostrou a formação de nódulos esporádicos densamente calcificados na cultura de polpa enquanto que as de medula apresentaram freqüente calcificação associada à presença de adipócitos. Por fim, quando as culturas de polpa foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos, houve a formação de estruturas semelhantes à dentina, a odontoblastos e tecido pulpar. Em contraste, as CTs de medula formaram osso lamelar contendo no seu interior osteócitos e osteoblastos na porção mais periférica, associado à formação de tecido vascular fibroso e adipócitos. Os autores concluíram que as células obtidas a partir de polpa dentária humana apresentaram características de CTs por apresentarem capacidade de auto-replicação, alta taxa proliferativa e capacidade de regenerar tecidos.

Miura et al. (2003) visando obter fontes mais acessíveis de CTs analisaram as CTAs provenientes de polpa de dentes decíduos (SHED - *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*). Essas células caracterizaram-se por apresentar alta proliferação e capacidade de se diferenciar em células neuronais, adipócitos e odontoblastos. Após o transplante *in vivo* essas células induziram a formação óssea e a formação de dentina. A análise imunohistoquímica mostrou marcações de superfície de CTs mesenquimais tais como STRO-1 e CD146. Marcadores de células estromais e endoteliais tais como fosfatase alcalina, MEPE (*Matrix extracellular phosphoglycoprotein*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) e endostatina, também foram observados. O trabalho mostrou que os SHEDs podem ser uma fonte acessível de células-tronco, capaz de fornecer células para uma potencial aplicação clínica, apesar de apenas 9% das células apresentarem marcação de indiferenciação.

CTs de dentes decíduos têm apresentado maior potencial proliferativo quando comparado àquelas obtidas de dentes permanentes (MIURA et al., 2003). No entanto, quando transplantadas *in vivo* na calvária de camundongos, as CTs de dentes decíduos não tiveram a capacidade de formar o complexo dentinopulpar, estrutura observada quando CTs provenientes de dentes permanentes são transplantadas nesses tecidos (GRONTHOS et al., 2000).

Comparando CTAs de origens diversas, Shi et al. (2005) observaram que as CTAs provenientes de polpa dentária de dentes terceiros molares permanentes têm potencial proliferativo muito maior quando comparado às de medula óssea.

Kerkis et al. (2006) aprofundando os estudos com CTs de dentes decíduos conseguiram isolar populações celulares mais imaturas e homogêneas (IDPSCs – *Immature Dental Pulp Stem Cells*) que as observadas por Miura et al. (2003). As IDPSCs mostraram ser capazes de expressar positividade para marcadores de CTEs Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81, como também marcadores de CTAs mesenquimais tais como o SH-2, SH-3 e SH-4, por pelo menos 25 passagens, com cariótipo e taxa de proliferação típicos de CTs. Além disso, essas novas linhagens mostraram maior plasticidade, sendo capazes de se diferenciar em células de músculo liso, células musculares esqueléticas, neurônios, cartilagem e osso.

2.1.3 Dificuldades de cultivo

Originalmente, as CTs necessitavam de ser cultivadas sobre culturas de fibroblastos embrionários de camundongos irradiados que serviam como camada de alimentação (*feeder layer*). Essa camada de fibroblastos fornecia fatores solúveis desconhecidos que mantinham o estado de indiferenciação celular. Posteriormente, um desses fatores críticos foi identificado como LIF (*leukaemia inhibitory factor*), que é um membro da família das interleucinas (IL-6). Assim, apesar de ainda serem utilizados os *feeders* para alguns tipos de experimentos, os meios de cultivo mais atuais suplementados com LIF são capazes de manter a pluripotência e proliferação de muitos tipos celulares (SMITH, 2001; SMITH; HOOPER, 1987).

Ainda não se têm total conhecimento da biologia das CTs, de forma que ainda estão sendo estabelecidos todos os protocolos de diferenciação e manutenção dessas células. Sabe-se que o meio tem um importante papel neste processo (KREBSBACH; ROBEY, 2002). As CTs precisam de meios de cultura específicos para a manutenção da indiferenciação ou para diferenciação em determinados tipos celulares (CLARKE; BECKER, 2006). Outros fatores que podem influenciar no comportamento dessas células são ação prolongada de solução de tripsina durante o subcultivo e a confluência celular (KERKIS et al., 2006).

Alguns autores relatam a diminuição do potencial proliferativo após o congelamento das CTs em nitrogênio líquido, procedimento indispensável em qualquer laboratório de cultivo celular para a manutenção dos estoques e utilização de acordo com a necessidade dos experimentos (VAN WYK; OLIVIER; MARITZ, 2001).

Zhang et al. (2006) analisando a influência da criopreservação no potencial de diferenciação de CTs de polpa dentária humana de terceiros molares, observaram que não houve diferença na capacidade de diferenciação entre células previamente congeladas e aquelas que nunca passaram por este procedimento. Todos os grupos experimentais diferenciaram-se em neurônios, osteoblastos, adipócitos, células musculares e condrócitos de forma similar. O tempo de congelamento não foi mencionado. Na mesma linha de pesquisa, Papaccio et al. (2006) observaram que após crioconservação de 2 anos, CTs de polpas dentárias obtidas de indivíduos adultos extraídas por motivos diversos continuaram proliferativas, com potencial de diferenciação para osteoblastos e capacidade de produção de estrutura mineralizada.

Outros empecilhos seriam as questões éticas, morais, políticas e legais envolvendo o tema, principalmente quando se fala de CTEs, que para serem obtidas promovem a destruição dos embriões de origem. Na verdade, as CTs levantam um questionamento similar ao que acontece quando o assunto é o aborto: Quando a vida se inicia? Alguns indivíduos acham que o estudo com CTEs leva a destruição de vidas humanas, enquanto outros crêem que essas pesquisas visam um bem maior onde apenas material de descarte de clínicas de reprodução humana são utilizados (MOORE; MILLS; THORNTON, 2006).

CTs em estágio embrionário, obtidas a partir de pele humana (tecido adulto), surgiram como a mais nova alternativa para se evitar a utilização das CTEs (TAKAHASHI et al., 2007). Para que retornassem ao estágio embrionário os autores introduziram um vírus em células epiteliais já diferenciadas. Todavia, ainda não existem dados que comprovem a segurança desta terapia a longo prazo, devido à imprevisibilidade de comportamento desses vírus no organismo.

2.2 Mixoma odontogênico

O termo mixoma foi utilizado pela primeira vez na literatura por Virchow (1871). O autor denominava como mixoma toda neoplasia caracterizada pela proliferação de células mesenquimais primitivas capazes de produzir uma substância intercelular amorfa semelhante à substância mixomatosa do cordão umbilical (VIRCHOW, 1871, CANALIS; SMITH; KONRAD, 1976). Dessa forma, devido à ausência de um critério mais preciso de classificação, muitos patologistas utilizavam o mesmo termo para designar patologias diferentes.

Com o objetivo de se estabelecer um critério histológico internacional de classificação para esta e outras neoplasias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 1971 a primeira Classificação Histológica de Tumores Odontogênicos, Cistos e Lesões Associadas (PINDBORG; KRAMER, 1971). Nesse trabalho, as neoplasias foram divididas em três grandes grupos: 1) Neoplasias e lesões relacionadas ao aparato odontogênico; 2) Neoplasias e lesões associadas ao osso; e 3) Cistos epiteliais. Dentre as neoplasias relacionadas ao aparato odontogênico, o mixoma odontogênico foi classificado como uma neoplasia benigna, localmente invasiva, resultante da proliferação de células fusiformes ou arredondadas dispersas em matriz mixomatosa abundante (PINDBORG; KRAMER, 1971).

Somente em 1992, a OMS divulgou a segunda edição dessa classificação (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992). Apesar da estrutura básica da primeira edição ter sido mantida, houve a inclusão de novas lesões e a atualização de alguns conceitos de neoplasias citadas anteriormente (KRAMER, 1992). Os tumores odontogênicos benignos

foram subdivididos em três grupos: 1) lesões derivadas do epitélio odontogênico sem a presença do ectomesênquima odontogênico; 2) lesões derivadas do epitélio odontogênico com presença do ectomesênquima odontogênico identificável, havendo ou não a formação de tecido duro; e 3) lesões com predomínio do ectomesênquima odontogênico, havendo ou não a presença de epitélio odontogênico. Com base nessa nova classificação, o mixoma que apresenta de forma ocasional epitélio odontogênico em sua composição, foi incluso no terceiro grupo de lesões benignas, juntamente com o fibroma odontogênico e o cementoblastoma benigno (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992).

Em 2005, foi disponibilizada a última edição da Classificação Histológica de Tumores Odontogênicos (BARNES et al., 2005). Na estrutura geral não houve modificações significantes, de forma que a classificação do mixoma permaneceu inalterada. Uma das novidades dessa edição foi a reclassificação do queratocisto, antes cisto odontogênico, agora denominado como tumor odontogênico queratocístico (BARNES et al., 2005; SLOOTWEG, 2006; JING et al., 2007).

Tumores odontogênicos são neoplasias que derivam de células remanescentes da odontogênese e possuem características histológicas que refletem alguns estágios deste processo (REGEZI; SCIUBBA, 2000; OLGAC; KOSEOGLU; AKSAKALLI, 2006).

A origem do mixoma é ainda controversa, acredita-se que seja a partir do ectomesênquima odontogênico (NEVILLE et al., 1998) ou de estruturas como a papila ou folículo dental (SHAFFER; HINE; LEVY, 1987).

2.2.1 Características clínicas

Os tumores odontogênicos representam 1,1 a 3,7% dos casos de neoplasias que acometem a cavidade bucal. Desses casos, apenas 3 a 5% são mixomas odontogênicos (BARKER, 1999).

Essa porcentagem pode variar de acordo com a região geográfica analisada. Em 349 casos de tumores odontogênicos ocorridos no México (MOSQUEDA-TAYLOR et al., 1997), o mixoma foi a terceira lesão mais comum, representando 17,7% dos casos, sendo precedido apenas pelos odontomas, que representavam 34,6%, e pelos ameloblastomas que compunham 23,7% dos casos.

Daley, Wysocki e Pringle (1994) analisando a incidência de tumores odontogênicos e lesões císticas na população canadense, observaram que dentre os 445 casos de tumores odontogênicos, 51,43% eram odontomas, 13,52% ameloblastomas e 8,93% fibromas odontogênicos periféricos, de forma que os mixomas ficaram apenas na quarta posição, compondo 5,1% dos casos.

Os mixomas na maioria das vezes são unilaterais (SUAREZ; BATSAKIS; EL-NAGGAR, 1996). Os dados na literatura mostram que há uma leve predileção para a região posterior da mandíbula em relação à maxila, e pelo sexo feminino (ALLPHIN et al., 1993; KAFFE; NAOR; BUCHNER, 1997).

Essa neoplasia afeta geralmente adultos jovens entre a 2ª e a 3ª década de vida (KATZ; UNDERHILL, 1994; EVRARD et al., 1997). Na literatura recente, poucos são os trabalhos que avaliam a incidência de mixomas em crianças e adolescentes (KESZLER; DOMINGUES; GIANNUNZIO, 1995; KAFFE; NAOR; BUCHNER, 1997).

Keszler, Domingues e Giannunzio (1995) analisando 80 casos de mixoma ocorridos na Universidade de Buenos Aires observaram que 10 desses casos - 12,5% - acometeram pacientes com menos de 16 anos de idade e que essas lesões eram geralmente mais extensas que as encontradas em adultos apresentando, em média, diâmetros maiores que 4 cm.

Kaffe, Naor e Buchner (1997) analisando 164 casos de mixomas intra-ósseos, observaram que 7% dos casos ocorreram em crianças com menos de 10 anos de idade. Com base nesses dados, os autores sugeriram que o mixoma deveria ser considerado no diagnóstico diferencial de lesões intra-ósseas radiolúcidas em crianças e adolescentes.

Embora o mixoma seja classificado como uma neoplasia benigna, ele pode ocasionalmente infiltrar e destruir o osso (ZHAO et al., 1999; OYGÜR et al., 2001). O crescimento é geralmente lento e indolor, sendo descoberto na maioria das vezes durante o exame radiográfico de rotina (NEVILLE et al., 1998; SUMI et al., 2000).

Os mixomas estão freqüentemente associados a dentes inclusos (SHAFER; HINE; LEVY, 1987). Apesar de lesões mais extensas estarem sujeitas ao deslocamento dentário, raramente é observada a ocorrência de reabsorção radicular (KATZ; UNDERHILL, 1994).

2.2.2 Características histológicas

Histologicamente, o mixoma é composto por células arredondadas, fusiformes ou estrelárias, dispostas em abundante estroma mixomatoso frouxo. As células tumorais

são positivas para vimentina, colágeno tipo I, fibronectina, tenascina, condroitina sulfato e principalmente ácido hialurônico (SLOOTWEG; VAN DEN BOS; STRAKS, 1985; SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1994; JAEGER et al., 2000).

A positividade para vimentina é uma marcação já esperada para estas células, uma vez que é uma proteína de citoesqueleto característica de células mesenquimais, essencial para a estabilidade celular (ERIKSSON; OPAL; GOLDMAN, 1992).

Os colágenos são proteínas fibrosas secretadas na matriz extracelular principalmente por fibroblastos. Constituem aproximadamente 25% do total de proteínas do organismo. Dos 15 tipos de colágenos conhecidos, o colágeno tipo I é um dos colágenos fibrilares mais comuns, estando presente em grandes quantidades na pele e nos ossos. Essas fibras colágenas formam estruturas capazes de resistir às forças compressivas (ALBERTS et al., 1994).

A fibronectina e a tenascina são proteínas adesivas, enquanto a primeira promove a adesão celular à matriz extracelular, a segunda pode promover ou inibir a adesão dependendo da situação. Essa propriedade da tenascina parece estar relacionada aos movimentos de migração das células (ALBERTS et al., 1994).

A condroitina sulfato e o ácido hialurônico são glicosaminoglicanos (ALBERTS et al., 1994). O ácido hialurônico é considerado a forma mais simples e primitiva deste grupo, encontrado em quantidades variáveis em todos os tecidos, sendo abundante em embriões e no mixoma odontogênico. Além disso, age como lubrificante em articulações e acredita-se que esteja envolvido na facilitação da migração celular durante o reparo de injúrias (ALBERTS et al., 1994).

É muito freqüente encontrarmos áreas de pouca celularidade no mixoma. Os núcleos são geralmente pequenos, uniformes e hipercromáticos e a atividade mitótica

pode ser observada em algumas células (SUAREZ; BATSAKIS; EL-NAGGAR, 1996; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000).

Outra característica histológica deste tumor é a presença ocasional de ilhotas de epitélio odontogênico, aparentemente inativas, dispersas pela neoplasia (CHUCHURRU et al., 1985; KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; SUAREZ; BATSAKIS; EL-NAGGAR, 1996; JAEGER et al., 2000). Essas ilhotas não são essenciais para o diagnóstico (SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1994; NEVILLE et al., 1998; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000). Acredita-se que elas representem apenas um remanescente embrionário, não sendo importante para a gênese do mixoma (HASLETON; SIMPSON; CRAIG, 1978).

Os termos mixofibroma e fibromixoma já foram utilizados por alguns autores, principalmente quando a neoplasia apresentava maior quantidade de fibras colágenas, fato que traduziria apenas mais o aspecto histológico da lesão (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992; KESZLER; DOMINGUES; GIANNUNZIO, 1995; BARKER, 1999; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000).

Hodson e Prout (1968) sugeriram o uso do termo mixoblasto para diferenciar as células produtoras de mucopolissacarídeos que compõem o mixoma, do fibroblasto produtor de colágeno. Pouco mais de trinta anos depois, Barker (1999) em revisão sobre os mixomas, ainda sugere e utiliza o termo para denominar as células do tumor.

2.2.3 Características radiográficas

Os mixomas geralmente apresentam-se como áreas radiolúcidas multiloculares, apesar do padrão unilocular também ser encontrado (PELTOLA et al., 1994; SUMI et al., 2000).

O padrão unilocular, quando ocorre, pode ser confundido com um cisto periapical ou cisto ósseo traumático, pois o tumor pode não apresentar trabéculas intralesionais visíveis. Na maioria das vezes, o padrão unilocular apresenta menor tamanho e acredita-se que seja menos agressivo quando comparado ao padrão multilocular (PELTOLA et al., 1994; CUESTAS-CARNERO; BACHUR; GENDELMAN, 1988).

Os mixomas quando multiloculares podem apresentar aparências radiográficas de “favo de mel” ou “bolha de sabão” (NEVILLE et al., 1998; REGEZI; SCIUBBA, 2000) que, se mal interpretado pode ser confundido como ameloblastoma, ou vice-versa (NEVILLE et al., 1998; BARKER, 1999).

A maior parte dos mixomas apresenta limites radiográficos bem definidos, todavia, a presença de uma cápsula contínua limitante no tumor ainda é contestada por alguns autores (SUAREZ; BATSAKIS; EL-NAGGAR, 1996; KAFFE; NAOR; BUCHNER, 1997). Canalis, Smith e Konrad (1976) acreditam que os limites observados radiograficamente podem muitas vezes não representar os verdadeiros limites histológicos do tumor.

2.2.4 Tratamento e prognóstico

Considerando-se que as margens observadas radiograficamente podem não representar os verdadeiros limites histológicos do tumor e a capacidade de infiltração local dos mixomas, o tratamento de escolha sugerida é a excisão cirúrgica com margem de segurança (FARMAN et al., 1977; BARKER, 1999; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A elevada taxa de recorrência - aproximadamente 25% - parece estar relacionada ao tratamento conservador da neoplasia (SCHNECK; GROSS; TABOR, 1993; EVRARD et al., 1997; NEVILLE et al., 1998; BARKER, 1999; REGEZI; SCIUBBA, 2000). Muitos autores preconizam enucleação seguida de criteriosa curetagem para lesões pequenas, reservando as excisões cirúrgicas com margem de segurança para as lesões extensas ou casos de recorrência (LO MUZIO et al., 1996; NEVILLE et al., 1998).

O mixoma parece não ser sensível à radioterapia (SHAFER; HINE; LEVY, 1987; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000). Todavia, esse tratamento foi sugerido por alguns autores como terapia alternativa, quando a excisão cirúrgica não for possível ou quando, por algum motivo, a lesão tornar-se inoperável (ALLPHIN et al., 1993). Attie, Catania e Brenner (1966) sugeriram seu uso no período pré-cirúrgico. O procedimento diminuiria o tamanho da lesão, deixaria as margens melhor definidas e facilitaria a remoção cirúrgica. Alguns autores acreditam que essa terapia poderia causar a transformação maligna da lesão, devido à presença de células indiferenciadas locais (CUESTAS-CARNERO; BACHUR; GENDELMAN, 1988).

Sistemas de diagnóstico computadorizados como tomografias ou ressonância magnética podem ser utilizados para definir as margens da neoplasia antes da cirurgia (FARMAN; NORTJÉ; WOOD, 1993; SPENCER; SMITH, 1998) como também ajudar no diagnóstico diferencial dessas lesões (KAFFE; NAOR; BUCHNER, 1997; ASAUMI et al., 2002).

O prognóstico para os mixomas é bom (REGEZI; SCIUBBA, 2000; HALFPENNY; VEREY; BARDSLEY, 2000), mas o controle pós-operatório deve ser realizado por pelo menos dois anos, período em que ocorre a maior parte das recorrências (CUESTAS-CARNERO; BACHUR; GENDELMAN, 1988; SUMI et al., 2000).

2.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs)

Metaloproteinases da matriz (MMPs - *Matrix metalloproteinases*), ou matrixinas, são proteinases zinco-dependentes, capazes de degradar, coletivamente, todos os componentes da matriz extracelular (MEC) (MAIDMENT et al., 1997; KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999; SOUZA; GERLACH; LINE, 2000).

2.3.1 Classificação

A história das MMPs pode ser dividida em dois períodos, antes e depois do ano de 1962 (BIRKEDAL-HANSEN, 1988). Antes desta data, o mecanismo de degradação de fibrilas colágenas e outros componentes da MEC era pouco conhecido (BIRKEDAL-HANSEN, 1988).

Gross e Lapière (1962) observaram que fibrilas colágenas reconstituídas em gel eram degradadas por uma enzima liberada pela cauda de girinos em processo de reabsorção. Essa enzima foi denominada de collagenase, representando dessa forma a primeira das MMPs a ser descoberta. O achado estimulou a procura pela enzima em mamíferos, identificada primeiramente em ossos de ratos (WALKER; LAPIÈRE; GROSS, 1964), e posteriormente em gengiva humana (FULLMER; GIBSON, 1966) e ossos humanos (FULLMER; LAZARUS, 1967).

Atualmente, existem pelo menos 20 MMPs humanas conhecidas, que podem ser divididas em 5 grupos, de acordo com a estrutura e especificidade de substratos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, MMPs tipo membrana e outras MMPs, que são aquelas que não se enquadram nos grupos descritos anteriormente ou que não foram completamente caracterizadas (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999; BODE et al., 1999; WOESSNER; NAGASE, 2000).

A literatura relata que a similaridade na sequência de aminoácidos dentro de cada grupo é de aproximadamente 80% e que essa similaridade diminui a 50% quando há comparação entre os grupos (THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999).

Tabela 2.1 - MMPs humanas conhecidas divididas por grupo, numeração, peso molecular e outras nomenclaturas descritas na literatura.

Grupo	MMP N°	Peso molecular kDa latente/ativa	Outras nomenclaturas
Colagenases	MMP-1	52/42	Colagenase intersticial
	MMP-8	85/64	Colagenase neutrofílica
	MMP-13	52/42	Colagenase 3
Gelatinases	MMP-2	72/66	Gelatinase A ou Colagenase tipo IV/ 72 kDa
	MMP-9	92/84	Gelatinase B ou Colagenase tipo IV/ 92 kDa
Estromelisinas	MMP-3	57/45	Estromelisina 1
	MMP-10	54/44	Estromelisina 2
	MMP-11	64/46	Estromelisina 3
Tipo membrana	MMP-14	66/54	MT1-MMP
	MMP-15	72/60	MT2-MMP
	MMP-16	64/53	MT3-MMP
	MMP-17	57/53	MT4-MMP
	MMP-24	64/58	MT5-MMP ou MMP-21
	MMP-25	57/47	MT6-MMP
Outras MMPs	MMP-7	28/19	Matrilisina-1
	MMP-26	30/19	Matrilisina-2
	MMP-28	48/58	Epilisina
	MMP-12	52/22	Metaloelastase
	MMP-19	54/45	RASI-1 ou MMP-18
	MMP-20	54/22	Enamelisina

A numeração das MMPs acompanha a sequência de descoberta de cada uma dessas enzimas. Essa forma de classificação foi proposta durante o *First International Symposium on Matrix Metalloproteinases* ocorrido em *Destin Beach*, Florida, em setembro de 1989 (NAGASE; BARRET; WOESSNER, 1992).

Não foram incluídas as MMPs 4, 5, 6, 18 e 21 nesta tabela, pois após criteriosa análise, percebeu-se que representavam enzimas já descritas anteriormente, MMP-2 (MMP-4 e MMP-6), MMP-3 (MMP-5), MMP-19 (MMP-18) e MMP-24 (MMP-21). Até o momento, pouco se sabe sobre as MMPs 22, 23 e 27 (WOESSNER JR, 1998; WOESSNER; NAGASE, 2000; AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

2.3.1.1 collagenases

O grupo das collagenases é composto pela MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase neutrofílica) e MMP-13 (colagenase 3) (WOESSNER; NAGASE, 2000).

MMP-1, ou colagenase intersticial, foi a primeira colagenase de vertebrados obtida a partir de fibroblastos humanos (STRICKLIN et al., 1977), mas também pode ser produzida por macrófagos (SAARIALHO-KERE et al., 1993; REYNOLDS, 1996) e queratinócitos (INOUE et al., 1995).

Sua função principal é degradar colágenos fibrilares nativos, como os colágenos tipo I, II, III, VII, VIII e X (NAGASE; BARRET; WOESSNER, 1992) cujos fragmentos de degradação são rapidamente denaturados por outras MMPs como as gelatinases (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993).

A velocidade de degradação pela MMP-1 varia para cada colágeno fibrilar nativo. O colágeno tipo III é degradado dez vezes mais rápido que o colágeno tipo I, e cem vezes mais rápido que o colágeno tipo II (WELGUS; JEFFREY; EISEN, 1981). A demora na degradação do colágeno tipo II levanta a hipótese de que a MMP-1 possa não ser a principal MMP envolvida na degradação deste colágeno (JEFFREY, 1998).

Inoue et al. (1995) estudando o envolvimento de collagenases na reparação tecidual induzida em humanos, observaram que o rompimento da membrana basal (MB) parece ser o estímulo inicial para induzir a expressão de collagenases por queratinócitos. Nesse processo, a MMP-1 é expressa por células que estão no *front* do processo de cicatrização, de modo que sua expressão vai diminuindo progressivamente a partir do

centro da lesão (PARKS et al., 1998). Após a completa re-epitelização há a diminuição da expressão dessa collagenase (SAARIALHO-KERE et al., 1993; AGREN, 1994; INOUE et al., 1995).

2.3.1.2 gelatinases

O grupo das gelatinase é composto por 2 membros: a MMP-2 (gelatinase A ou collagenase tipo IV/72 kDa) e a MMP-9 (gelatinase B ou collagenase tipo IV/92 kDa) (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999).

Os substratos das gelatinases são colágenos denaturados (gelatinas), elastina, fibronectina, proteoglicanas, laminina e o colágeno tipo IV que é um dos principais componentes da membrana basal, indicando o envolvimento dessas enzimas no processo de invasão (NAGASE, 1997; SHAPIRO, 1998).

As MMP-2 são constitutivamente produzidas (ZUCKER; CAO; CHEN, 2000) por células como fibroblastos (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999), mas também podem ser produzidas por osteoblastos (RIFAS et al., 1989).

A produção de MMP-9 é mais restrita quando comparada à MMP-2. Essa enzima é produzida geralmente por células epiteliais (SALO et al., 1991) e eosinófilos (STAHL-BÄCKDAHL; PARKS, 1993) e armazenada em grânulos de neutrófilos (VU; WERB, 1998; STAHL-BÄCKDAHL; PARKS, 1993). Dessa forma, elevadas concentrações de MMP-9 podem ser encontradas em processos de inflamação (DELCLAUX et al., 1996), artrite reumatóide (AHRENS et al., 1996), periodontite

(MÄKELÄ et al., 1994; SHIN et al., 2002), pulpíte (SHIN et al., 2002; GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002), feridas crônicas (WYSOCKI; STAIANO-COICO; GRINNELL, 1993) e cicatrização de feridas (AGREN, 1994).

Um diferencial no processo de ativação das progelatinases é que essas enzimas podem ser ativadas com auxílio de seus inibidores, os TIMPs (NAGASE; ITOH; BINNER, 1994). Alguns autores afirmam que o principal meio de ativação da proMMP-2 ocorra na porção pericelular, isso porque o TIMP-2 também pode agir no processo de ativação dessa gelatinase quando associado à MT1-MMP (MMP-14) na superfície celular, formando o complexo proMMP-2/TIMP-2/MT1-MMP (YU; MURPHY; STETLER-STEVENSON, 1998). Contudo, foi observado que o excesso de TIMP-2 teria um efeito inibitório nesse processo (ZUCKER; CAO; CHEN, 2000).

O processo de ativação de gelatinases via TIMPs apresenta algumas desvantagens. Existem trabalhos que relatam que após esse tipo de ativação a enzima apresenta apenas 10% de sua atividade (KOLKENBROCK et al., 1991; NAGASE; ITOH; BINNER, 1994). Outra desvantagem é que após a formação do complexo, este é liberado para o meio extracelular e, devido a um rearranjo de moléculas, o TIMP-2 passaria a ter efeito inibitório (YU; MURPHY; STETLER-STEVENSON, 1998).

2.3.1.3 estromelisinases

O termo estromelisina foi introduzido por Chin et al. em 1985. Existem três MMPs pertencentes a este grupo: a MMP-3 (estromelisina 1), MMP-10 (estromelisina 2) e MMP-11 (estromelisina 3) (WOESSNER; NAGASE, 2000).

Essas enzimas são produzidas geralmente por células do estroma (BASSET et al., 1990), mas também podem ser observadas nas margens de processos invasivos (KUSUKAWA et al., 1995) e em células epiteliais durante o processo de reparação tecidual (PARKS et al., 1998). Elas são capazes de degradar a proteína central de proteoglicanas, fibronectina e laminina (PARDO; SELMAN, 1996; SHAPIRO, 1998).

2.3.1.4 metaloproteinases tipo membrana

As metaloproteinases tipo membrana (MT-MMPs - *Membrane Type-Matrix Metalloproteinases*) são metaloproteinases ligadas à membrana de células neoplásicas (SATO et al., 1994) capazes de mediar a proteólise pericelular de componentes da matriz extracelular (MEC) (HOLMBECK et al., 1999). Diferentemente de outras MMPs, essas enzimas não são secretadas para o meio extracelular na forma de zimógenos (forma latente), e necessitam de uma ativação sequencial intracelular para terem algum efeito na matriz (PARSONS et al., 1997).

Existem seis membros conhecidos dessas enzimas MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24) e MT6-MMP (MMP-25) (SATO et al., 1994; HERNANDEZ-BARRANTES et al., 2002; LLANO et al., 1999; VELASCO et al., 2000).

Como as MMPs, todas as MT-MMPs também podem ser inibidas pelas TIMPs. As MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP são eficientemente inibidas pelas TIMP-2 e TIMP-3, enquanto que MT4-MMP e a MT6-MMP têm maior afinidade pela TIMP-1. Vale ressaltar que a MT1-MMP também pode ser inibida pela TIMP-4 (HERNANDEZ-BARRANTES et al., 2002).

2.3.1.5 outras MMPs

As MMP-7 e MMP-12 não foram classificadas nos grupos descritos anteriormente por apresentarem diferenças estruturais ou diferenças na ação sobre substratos (WOESSNER; NAGASE, 2000).

A MMP-7, ou matrilisina, é a menor MMP conhecida contendo apenas peptídeo sinalizante, propeptídeo e o domínio catalítico (WOESSNER; NAGASE, 2000). Devido à diferença estrutural causada pela ausência do domínio hemopexina, muitos autores preferem mantê-la em um grupo a parte (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999).

A MMP-12, ou metaloelastase, pode ser encontrada em macrófagos (SHAPIRO et al., 1992) e em células do estroma (SHAPIRO, 1998). Na sua composição podemos

observar a presença do peptídeo sinalizante, domínio propeptídeo, domínio catalítico, região *hinge* e um domínio hemopexina (MASSOVA et al., 1998).

As MMPs 19, 20, 22, 23, 26, 27 e 28 são proteinases descobertas que ainda não foram completamente caracterizadas (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

2.3.2 Características das MMPs

A maioria das MMPs são induzidas a se expressarem, enquanto que um pequeno número é expresso constantemente (PALOSAARI et al., 2003). Tecidos em formação ou que estejam sofrendo algum tipo de remodelação costumam expressar essas enzimas. No caso da estrutura dentária, as MMPs encontram-se expressas nas principais fases de desenvolvimento (FUKAE et al., 1998; PALOSAARI et al., 2003; KUMAMOTO et al., 2003) e após a erupção em processos inflamatórios (GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002) e lesões periapicais (SHIN et al., 2002).

Dentre as principais características das MMPs podemos citar: a) são secretadas na forma de proenzimas; b) são capazes de clivar um ou mais componentes da MEC; c) contêm um íon zinco no sítio ativo; d) são inibidas pelos TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMPs* - Inibidores teciduais de MMPs) (MATRISIAN, 1990; WOESSNER JR, 1991; MIGNATTI; RIFKIN, 1993), ou pela α 2-macroglobulina (α 2-M) (STETLER-STEVENSON; YU, 2001); e) após a ativação ocorre perda de peso molecular (WOESSNER JR, 1991); e f) possuem algumas seqüências homólogas de aminoácidos entre si (MATRISIAN, 1990).

As MMPs apresentam uma estrutura tridimensional contendo geralmente as seguintes regiões: peptídeo sinalizante, domínio propeptídeo, domínio catalítico e região *hinge*, ou “dobradiça”, que liga o domínio hemopexina ao domínio catalítico. Outros domínios ainda podem ser encontrados associados a essas enzimas, como o domínio de inserção fibronectina tipo II e o domínio transmembrânico que pertencem, respectivamente, às gelatinases e às metaloproteinases tipo membrana (NAGASE, 1997; THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999; KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999; CURRAN; MURRAY, 2000; WOESSNER; NAGASE, 2000).

O *peptídeo sinalizante* tem a função de orientar o produto de secreção para o retículo endoplasmático, no momento de exportar a enzima para fora da célula (STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993; WOESSNER JR, 1998). Após a secreção do zimógeno para o meio extracelular ocorre a remoção desse peptídeo sinalizante (WOESSNER JR, 1994).

O *domínio propeptídeo* contém um resíduo cisteína no seu interior que, em contato com o íon zinco do domínio catalítico, mantém a latência da enzima (WOESSNER JR, 1998).

Todas as MMPs contêm o *domínio catalítico*, também conhecido como *Domínio N-terminal*. Ele possui no seu interior um íon zinco que é essencial para a atividade enzimática, o que acaba caracterizando o nome dessas proteinases (STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; MCCAULEY; MATRISIAN, 2000). A latência de todas as proMMPs é devida à associação do íon zinco do domínio catalítico ao resíduo cisteína do domínio propeptídeo. Para ocorrer a ativação da MMP, o domínio propeptídeo deve ser removido expondo o íon zinco do domínio catalítico a H₂O (VAN WART; BIRKEDAL-

HANSEN, 1990; NAGASE, 1997; MASSOVA et al., 1998; THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999).

O *domínio de inserção fibronectina tipo II* só pode ser encontrado no interior do domínio catalítico das gelatinases A e B. Ele é composto por três módulos homólogos de fibronectina tipo II que parecem ser os responsáveis pela ligação das gelatinases aos substratos (WOESSNER JR, 1991; MASSOVA et al., 1998).

A *região hinge* ou “dobradiça” tem como função ligar o domínio catalítico ao domínio hemopexina (MURPHY; KNÄUPER, 1997; WOESSNER JR, 1998).

O *domínio hemopexina* recebe esse nome por apresentar uma sequência similar à proteína plasmática hemopexina (MASSOVA et al., 1998). Acredita-se que esse domínio esteja relacionado à especificidade de ligação a substratos e inibidores. No caso das gelatinases, a ligação com os TIMPs parece ocorrer neste domínio quando ainda estão em sua forma latente (WOESSNER JR, 1998; MASSOVA et al., 1998). No entanto, este domínio parece não ser essencial para a atividade catalítica, pois a MMP-7 (matrilisina) que é o menor membro do grupo das MMPs, não contém este domínio e ainda assim, é capaz de degradar componentes da MEC (MURPHY; KNÄUPER, 1997; MASSOVA et al., 1998).

Apenas as metaloproteinases tipo membrana possuem o *domínio transmembrânico*, que está localizado na porção final do *domínio hemopexina*. Esse domínio diferencia-se dos outros por apresentar um prolongamento citoplasmático (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999).

Figura 2.1 - Localização esquemática dos domínios que compõem as metaloproteinases da matriz (MMPs)

2.3.3 MMPs e processos

A expressão da maioria das metaloproteinases é menor ou quase indetectável em indivíduos adultos saudáveis (SHAPIRO, 1998; PARKS et al., 1998; MCCAWLEY; MATRISIAN, 2000). Entretanto, elas podem ser encontradas em concentrações elevadas em situações fisiológicas como: na reparação tecidual (INOUE et al., 1995; STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993; ZUCKER; CAO; CHEN, 2000), no ciclo do endométrio durante a menstruação (BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000), no desenvolvimento embrionário (MATRISIAN, 1990; WOESSNER JR, 1994) e na involução da glândula mamária e do útero após o parto (WERB et al., 1996; STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993).

Em processos patológicos podem ser encontradas elevadas concentrações de MMPs em casos de invasão neoplásica e metástase (WOESSNER JR, 1991; WERB et al., 1996), artrite reumatóide (KRANE, 1994), câncer de mama (BASSET et al., 1990), câncer de próstata (STEARNS; WANG, 1993), câncer de pulmão (URBANSKI et al., 1992), angiogênese (WOESSNER JR, 1994), doença periodontal (MÄKELÄ et al., 1994) e osteoporose (WOESSNER JR, 1991).

Para que haja o processo de metástase e invasão, antes da degradação de componentes da matriz extracelular através de enzimas como as metaloproteinases, é necessário que haja a perda do contato célula-célula.

A E-caderina é uma proteína transmembrânica expressa por células epiteliais que forma e promove a manutenção de contatos intercelulares. A ação de MMPs induz a perda desses contatos e à formação de E-caderinas solúveis (80 kDa). Essa forma solúvel

promove um *feedback* positivo na regulação de MMPs, resultando na superexpressão de MMPs 2 e 9 que criam um ambiente propício para a circulação de células cancerígenas (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004a; CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004b; KAPLAN et al., 2005; KAPLAN; RAFII; LYDEN, 2006; NOËL; JOST; MAQUOI, 2008).

2.3.4 Regulação da atividade

A atividade das MMPs pode ser regulada de três maneiras: 1) transcrição gênica (THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999); 2) ativação das proenzimas (DECLERK, 2000) ou 3) inibição pelas TIMPs e α 2-M (PARSONS et al., 1997; MURPHY et al., 1994).

2.3.4.1 transcrição gênica

Em indivíduos adultos saudáveis a expressão das MMPs é quase que indetectável, pois é rigorosamente controlada durante a transcrição (PARSONS et al., 1997). No entanto, em processos fisiológicos ou patológicos perde-se este controle, de modo que a presença de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, ésteres de forbol, interações célula-célula ou célula-matriz podem induzir o aumento da expressão dessas

enzimas (PARSONS et al., 1997; THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999; KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999; COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002).

Existem muitos trabalhos realizados em camundongos *knockouts* nos quais genes para determinada MMP são alterados. Na atualidade, existem camundongos *knockouts* que não expressam MMP-2 (ITOH et al., 1997), MMP-3 (MUDGETT et al., 1998), MMP-7 (WILSON et al., 1997), MMP-9 (VU et al., 1998) e MMP-12 (SHIPLEY et al., 1996), como também foram desenvolvidos *knockouts* que superexpressam MMPs isoladas, como por exemplo as MMP-1 e MMP-3 (SHAPIRO, 1997).

A deficiência isolada de MMPs não é letal em camundongos durante o desenvolvimento embrionário, neste caso, foi observado que essa deficiência resulta apenas em alterações fenotípicas suaves (ITOH et al., 1998; SHAPIRO, 1997; MUDGETT et al., 1998). Esse fato sugere que pode haver redundância na função de MMPs, onde a deficiência na expressão de determinada enzima, resulta na superexpressão de outra para suprir a falta (ERICKSON, 1993).

2.3.4.2 ativação de proenzimas

Todas as metaloproteinases são produzidas na forma latente - proenzimas ou zimógenos - sendo ativadas na porção extracelular por proteólise ou por outras MMPs (BRECKON et al., 1996; PARSONS et al., 1997), exceto as MMP-11 e as MT-MMPs que são ativadas intracelularmente, por proteinases furinas símile e serino-proteinases, respectivamente (SANTAVICCA et al., 1996; PEI; WEISS, 1996; NAGASE, 1997).

As serino-proteinases podem atuar também de forma indireta no processo de ativação das MMPs. Exemplos dessas proteinases são os ativadores de plasminogênio tipo uroquinase (uPa) e tipo tecidual (tPa), que convertem o plasminogênio em plasmina (MIGNATTI; RIFKIN, 1993). A plasmina é uma proteinase capaz de ativar muitas MMPs latentes como as proMMP-1, proMMP-3 e a proMMP-9 (THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999).

2.3.4.3 inibição de MMPs

O terceiro mecanismo regulatório de MMPs seria através da inibição de MMPs ativas pela ligação aos TIMPs (PARSONS et al., 1997) ou à α 2-macroglobulina (α 2-M) (MURPHY et al., 1994).

Os inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs - *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) são estruturas de baixo peso molecular (20,6 kDa a 22,3 kDa) capazes de inibir a ação de todas as MMPs ativas através de ligações de alta afinidade não covalentes na proporção de 1:1 (MURPHY; WILLENBROCK, 1995; CURRAN; MURRAY, 1999; ZUCKER; CAO; CHEN, 2000). Esses inibidores de MMPs atuam principalmente nos tecidos, mas também podem ser encontrados nos fluidos do corpo (GOMEZ et al., 1997).

Existem quatro membros nesta família conhecidos como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (WOESSNER; NAGASE, 2000). Esses inibidores podem ser

produzidos por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoblastos (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1999).

As MMPs são inibidas quando ocorre a ligação do *domínio* $\text{NH}_2\text{-terminal}$ dos TIMPs, que é o responsável pela atividade inibitória, ao *domínio* *hemopexina* das MMPs (WOESSNER; NAGASE, 2000). O equilíbrio da expressão de MMPs e TIMPs é um pré-requisito para a função normal em processos fisiológicos (MURPHY; DOCHERTY, 1992; PARSONS et al., 1997). Sabe-se que quando ocorre um desequilíbrio em favor das MMPs ocorre a degradação da matriz extracelular (PARSONS et al., 1997).

Apesar da principal função dos TIMPs ser participar do processo inibitório das MMPs ativas, algumas TIMPs mostraram ter capacidade de participar do processo de ativação de progelatinases (proMMP-2/ TIMP-2/ MT1-MMP e proMMP-9/ TIMP-1) (DENHARDT et al., 1993; NAGASE; ITOH; BINNER, 1994).

O segundo mecanismo de inibição de MMPs é realizado pelas $\alpha 2\text{-Ms}$. As $\alpha 2\text{-Ms}$ são glicoproteínas de grande peso molecular contendo aproximadamente 725 kDa (WOESSNER; NAGASE, 2000) e agem como reguladores de MMPs ativadas quando presentes no soro ou em fluidos do corpo (VU; WERB, 1998; BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000), diferentemente dos TIMPs que apresentam uma ação mais local (CAWSTON; MERCER, 1986).

Apesar dos TIMPs parecerem ser os maiores inibidores das MMPs nos tecidos, as $\alpha 2\text{-Ms}$ são responsáveis por mais de 95% da atividade anti-colagenolítica no plasma (WOOLLEY; ROBERTS; EVANSON, 1976; NAGASE; ITOH; BINNER, 1994).

As $\alpha 2\text{-Ms}$ possuem uma sequência *bait* “isca” no seu interior que é rompida na presença de MMPs ativas. O rompimento desta sequência resulta numa mudança conformacional na $\alpha 2\text{-M}$ que acaba englobando a MMP e bloqueando o sítio ativo da

enzima de forma irreversível na proporção de 1:1 (BARRET; STARKEY, 1973). Conseqüentemente, a mudança conformacional expõe sítios na superfície da α 2-M que favorecem uma posterior degradação dessas enzimas, ativas e já englobadas, por outros mecanismos (SOTTRUP-JENSEN, 1989).

Em estudos *in vitro*, ao ser analisada a afinidade de ligação da MMP-1 a seus inibidores, foi observado que essa enzima liga-se mais rapidamente a α 2-M do que ao TIMP-1 em meios contendo os dois inibidores (CAWSTON; MERCER, 1986).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Verificar se linhagens de células-tronco originadas de polpas dentárias humanas expressam componentes de matriz extracelular (colágeno tipo I, tenascina, fibronectina e ácido hialurônico) e metaloproteinases da matriz (1, 2 e 9) característicos do mixoma odontogênico. Dados previamente publicados pelo grupo (JAEGER et al., 2000; MIYAGI, 2002; MIYAGI et al., 2008).

3.2 Verificar pela expressão de proteínas da MEC e das MMPs se o mixoma odontogênico poderia ter sua origem a partir de células-tronco de polpa dentária humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 3 linhagens de células-tronco provenientes de polpas dentárias humanas previamente estabelecidas e caracterizadas pela Profa. Dra. Irina Kerkis, Laboratório de Genética - Instituto Butantan, São Paulo, SP (KERKIS et al., 2006).

O projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP e obteve o parecer de aprovação #39/06 (Anexo A).

4.1 Cultivo celular

Para o estudo foram utilizadas as linhagens de células-tronco DL-1 e DL-4 previamente obtidas a partir de polpas de dentes decíduos de crianças de 5 a 7 anos de idade, e linhagem DL-2 obtida a partir de terceiro molar incluso de um adolescente de 15 anos de idade (KERKIS et al., 2006).

Alíquotas congeladas em nitrogênio líquido e crioprotegidas por dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foram descongeladas em banho de água a 37°C por dois minutos. Essa suspensão de células foi diluída 10x em meio de cultivo DMEM/Ham's F-12, (1:1, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100µg/mL de streptomomicina (Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen) e 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen)(KERKIS et al., 2006). Após

centrifugação em tubos de ensaio a 300g por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os corpos de fundo foram ressuspensos em meio de cultura fresco preparado como descrito anteriormente. Alíquotas dessa suspensão foram plaqueadas em frascos de cultivo celular de 25 cm² de área cultivável, contendo o meio de cultivo descrito anteriormente. Foram incubados a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

O subcultivo era realizado quando cerca de 70% da área cultivável do frasco estava coberto por células. Para isso, 5 mL do meio de cultura foi removido e reservado em tubo de centrifugação e a monocamada celular era lavada duas vezes com PBSA (solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio), pH 7,2. Para a remoção da monocamada celular aderida no fundo do frasco, era utilizada solução de tripsina (Invitrogen) a 0,25%, contendo ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Invitrogen) 1mM, por 3 minutos a 37°C. A tripsina era inativada utilizando-se meio de cultura contendo soro fetal bovino, e as células em suspensão transferidas para tubos de ensaio de 15 mL e centrifugadas a 300g por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o precipitado de células ressuspenso em 1 mL de meio de cultura fresco. Alíquotas de 500 µL dessa suspensão de células eram distribuídas em frascos de 25cm², contendo 5 mL de meio de cultivo. Os frascos eram novamente mantidos em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares. Células das três linhagens foram utilizadas quando estavam entre a 6^a e a 10^a passagens.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (FRESHNEY, 2000). Vale ressaltar que o crescimento das células foi

monitorado diariamente em microscópio de fase invertido e que o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Figura 4.1 - Fotomicrografia de contraste de fase das três linhagens celulares: DL-1 (A), DL-2 (B) e DL-4 (C). As células apresentaram morfologia fusiforme ou estrelária com longos prolongamentos citoplasmáticos

4.2 Imunofluorescência

As células-tronco cultivadas foram removidas do frasco de cultura por tripsinização conforme descrito anteriormente para a obtenção de suspensão celular. O precipitado de células obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura fresco e alíquotas dessa suspensão foram plaqueadas em placas de Petri de 6 poços (Corning, New York, NY, EUA) sobre lamínulas de vidro de 20 x 20 mm de diâmetro (Glasscyto, São Paulo, SP, BR) estéreis. Essas culturas foram mantidas em estufa por 24 horas, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

As células aderidas sobre as lamínulas foram lavadas quatro vezes em solução de PBSA, duas vezes em água Milli-Q, e posteriormente, fixadas em solução de paraformaldeído em PBSA a 4% por 1 hora. A seguir, as células fixadas foram lavadas com solução tampão de lavagem TBS (*Tris Buffered Saline* - 0,15M NaCl (Sigma), 20mM Tris-HCl (Sigma), e 0,05% de Tween 20 (Sigma), pH 7,4). A membrana celular foi permeabilizada com solução de 0,1% Triton X-100 (Sigma) em TBS. Foi realizada uma nova sequência de lavagem em TBS e água Milli-Q, e posteriormente, as células foram incubadas em solução de soro albumina bovina (BSA, Sigma) a 5% em PBSA durante 30 minutos para o bloqueio de marcações inespecíficas.

Após esse bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários por 1 hora. Os anticorpos primários (Tabela 4.1) foram os mesmos utilizados por Jaeger et al. (2000) para a detecção de componentes da MEC e por Miyagi (2002) para a detecção de MMPs no mixoma odontogênico.

Na sequência, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em solução de BSA a 5% em PBSA na proporção de 1:500. Essa incubação teve a duração de uma hora em temperatura ambiente e, posteriormente, as células foram lavadas na mesma sequência de TBS e água Milli-Q descrita anteriormente. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por PBSA.

Tabela 4.1 - Características dos anticorpos primários utilizados para as reações de imunofluorescência nas células-tronco de polpa dentária humana

ANTICORPOS PRIMÁRIOS	TIPO	ORIGEM	DILUIÇÃO	PROCEDÊNCIA
Vimentina	Monoclonal	camundongo	1:250	Neonarkers, Lab Vision, MA, EUA
Colágeno tipo I	Monoclonal	camundongo	1:25	Chemicon, Victoria, Austrália
Fibronectina	Monoclonal	camundongo	1:50	Calbiochem, MA, EUA
Tenascina	Monoclonal	camundongo	1:100	Neonarkers
Ácido hialurônico	Monoclonal	camundongo	1:50	Biogenesis, Munique, Alemanha
MMP-1	Monoclonal	camundongo	1:50	Calbiochem
MMP-2	Monoclonal	camundongo	1:50	Calbiochem
MMP-9	Monoclonal	camundongo	1:150	NeoMarkers

As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, utilizando o meio de montagem específico para a imunofluorescência Vectashield H-100 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Fotomicrografias de fluorescência foram realizadas por epiluminação em microscópio de fluorescência (LSM 410 Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha). Foi analisado um mínimo de 100 células por reação para se observar a positividade das reações.

4.3 Ensaio de atividade de MMPs

Para os ensaios de atividade foram utilizados meios de cultivo condicionados pelas 3 linhagens celulares cultivadas. Meio condicionado é o meio de cultura que contém pequenos metabólitos moleculares e fatores de crescimento liberados pelas células (TAKAHASHI; OKADA, 1970).

Foram utilizados kits Biotrak Activity Assay (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) capazes de quantificar a presença de MMPs 1, 2, e 9, nos meios condicionados pelas células-tronco.

Cada kit continha uma placa de Petri de 96 poços previamente recoberta com a pro-forma (forma latente) de cada MMP. Segundo o fabricante, a efetividade e sensibilidade deste teste seriam equivalentes aos obtidos através da zimografia e do método ELISA. Diferentes tipos de amostras podem ser analisados por este kit de atividade tais como: soro, plasma, tecido, meio condicionados por células cultivadas e também o fluido sinuvial.

4.3.1 Condicionamento do meio pelas células

O condicionamento dos meios foi realizado em 3 placas de cultura de 24 poços (20 poços/placa/linhagem). Em cada poço foram plaqueadas 1×10^5 células em 2 mL de meio de cultura DMEM/Ham's F12 (1:1, Invitrogen), contendo apenas 1% de solução

antibiótica-antimicótica (100 U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina) (Invitrogen) livre de soro. Após incubação de 24 horas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C, os meios foram aplicados em tubos tipo Eppendorf e centrifugados a 15.000g (13.000 rpm) durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos tipo Eppendorf estéreis e estocados em freezer a -70°C.

4.3.2 Preparo de soluções

Para a detecção das enzimas foram preparadas as seguintes soluções: **1) tampão de ensaio** (50 mM Tris-HCl pH 7.6; 1,5 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1µM ZnCl₂ e 0,01% v/v BRIJ 35^{TM}); **2) tampão de lavagem** (0,01M tampão Na₂PO₄ pH 7,0; 0,05% Tween 20^{TM}); **3) 352mg de APMA** (p-Aminophenylmercuric acetato/ativador de MMPs); **4) reagente de detecção** (100 µL de solução concentrada de urokinase em 50 mM de tampão Tris-HCl; 1,5 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1µM ZnCl₂ e 0,01% v/v BRIJ 35^{TM}) e **5) solução substrato** (substrato peptídeo S-2444^{TM} em 50 mM Tris-HCl pH 7.6; 1,5 mM NaCl; 0,5 mM CaCl₂; 1µM ZnCl₂ e 0,01% v/v BRIJ 35^{TM}).

Para a detecção de baixas concentrações de MMPs presentes nos meios condicionados foram preparadas **soluções padrão** nas seguintes concentrações: a) **MMP-1**: 0,1 a 1,56 ng/mL de solução tampão de ensaio; b) **MMP-2**: 0,19 a 3 ng/mL de solução tampão de ensaio e c) **MMP-9**: 0,125 a 4 ng/mL de solução tampão de ensaio. As soluções descritas anteriormente deram origem às curvas padrão, que foram utilizadas para se comparar os dados das amostras.

4.3.3 Dias experimentais

A análise de atividade de MMPs envolve dois dias consecutivos de experimentos. No primeiro dia foram preparados: 1) a solução tampão de ensaio, 2) as soluções padrão e a 3) solução tampão de lavagem.

Dia 1

1) Preparo das soluções padrão em 7 tubos de polipropileno tipo Eppendorf:

MMP-1: 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,78 - 1,56 - 3,13 - 6,25 - 12,5 - 25 e 50 ng/mL;

MMP-2: 0,19 - 0,38 - 0,75 - 1,5 - 3 - 6 e 12 ng/mL;

MMP-9: 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 e 16 ng/mL;

a) Pipetagem de 500 μ L de solução tampão de ensaio em cada tubo;

b) Pipetagem de 500 μ L de solução padrão nos tubos Eppendorf de maior concentração de cada MMP: 50 ng/mL (MMP-1); 12 ng/mL (MMP-2) e 16 ng/mL (MMP-9).

Homogenização em Vórtex;

c) Pipetagem de 500 μ L da solução preparada no passo anterior nos tubos sequenciais de cada MMP: 25 ng/mL (MMP-1); 6 ng/mL (MMP-2) e 8 ng/mL (MMP-9).

Homogenização em Vórtex;

d) Diluição sucessiva nos tubos remanescentes. Essas diluições deram origem a 7 níveis de soluções padrão variando de: MMP-1 (0,1 a 6,25 ng/mL); MMP-2 (0,19 a 12 ng/mL) e MMP-9 (0,125 a 8 ng/mL). Descarte dos tubos de soluções (para a detecção de altas concentrações de MMPs) que não seriam utilizados nos experimentos: MMP-1 (12,5; 25 e 50 ng/mL); e MMP-9 (16 ng/mL);

- 2) Pipetagem ordenada de 100 μ L de solução tampão de ensaio (*blank*), soluções padrão e meios condicionados nos poços apropriados;
- 3) Cobertura da placa e incubação em geladeira a 2-8°C *overnight*;

Dia 2

No segundo dia foram preparadas as soluções: 1) APMA, 2) reagente de detecção e 3) substrato.

- 1) Aspiração e lavagem do conteúdo da placa por quatro vezes consecutivas, com solução tampão de lavagem, certificando-se de que foram completamente preenchidos e aspirados a cada procedimento;
- 2) Pipetagem de 50 μ L de APMA em todos os poços, inclusive onde haviam soluções padrão, visando ativar todas as MMPs e medir a quantidade total de proteína;
- 3) Pipetagem de 50 μ L de solução reagente de detecção em todos os poços;
- 4) Homogenização por 20 segundos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro para se obter os valores no tempo 0 (inicial);
- 5) Recobrimento da placa e incubação em estufa a 37°C por 6 horas;
- 6) Homogenização por 20 segundos e leitura da placa em espectrofotômetro para se obter os valores de quantificação finais.

Ao final das reações, toda a MMP presente aderiu ao fundo da placa permitindo a observação da quantidade total de MMP ativa de cada amostra. A atividade das MMPs foi diretamente proporcional à coloração apresentada pelos grupos analisados. A absorbância nos dois tempos experimentais foi detectada em espectrofotômetro utilizando filtro de 405 nm.

Figura 4.2 – Esquema do ensaio de atividade de MMPs. Meios condicionados pelas células foram armazenados em tubos tipo Eppendorf (A) e congelados em freezer a -70°C até o momento do experimento (B). Para observarmos a quantidade de MMPs totais ativadas presente nos meios condicionados foi aplicado o ativador de MMPs (solução de APMA) em todas as amostras (C). Imagens do kit de análise de atividade de MMPs (D), lavadora (E) e leitora (F) usados nos experimentos

4.4 Análise estatística

Os dados das concentrações de MMPs totais dos meios condicionados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (SEM). Esses dados, em ng/mL, foram comparados pelo método estatístico ANOVA complementado pelo teste de Tukey para identificação das diferenças, quando existentes. O nível de significância foi 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Imunofluorescências

Os resultados das reações de imunofluorescência estão expressos na Tabela 5.1.

Reações positivas estão ilustradas na Figura 5.1.

Tabela 5.1 - Resultados das reações de imunofluorescência realizadas nas linhagens DL-1, DL-2 e DL-4

ANTICORPOS PRIMÁRIOS	DL-1	DL-2	DL-4
Vimentina	Positivo	Positivo	Positivo
Colágeno tipo I	Positivo	Negativo	Positivo
Fibronectina	Positivo	Positivo	Negativo
Tenascina	Positivo	Positivo	Negativo
Ácido hialurônico	Negativo	Negativo	Negativo
MMP-1	Positivo	Positivo	Positivo
MMP-2	Positivo	-	Positivo
MMP-9	Positivo	Positivo	Positivo

5.1.1 Vimentina

Todas as linhagens expressaram vimentina, que é a proteína de citoesqueleto de células mesenquimais. A vimentina apareceu na forma de filamentos de espessuras variadas concentradas na região perinuclear (Figura 5.1A e Figura 5.1B). A imagem do mesmo campo enfocando a região nuclear com DAPI (Figura 5.1C).

5.1.2 Proteínas da Matriz Extracelular

A linhagem DL-1 apresentou expressão positiva de todas as moléculas da MEC estudadas, exceto o ácido hialurônico, glicosaminoglicano que não foi encontrado em nenhuma das três linhagens celulares. O colágeno tipo I apareceu na forma de pontos dispersos no citoplasma, que se concentravam na região perinuclear (Figura 5.1D e E). Tanto a fibronectina (Figura 5.1G e H) quanto a tenascina (Figura 5.1J e K) apareceram como pequenos pontos homogeneamente distribuídos pelo citoplasma. Além disso, nas imagens de fluorescência para fibronectina (Figura 5.1G e H), foi possível se observar nos lamelipódios celulares anéis fortemente marcados pelo anticorpo. Não houve diferenças na distribuição das proteínas de MEC quando estas estavam presentes nas diferentes linhagens celulares estudadas.

As imagens dos mesmos campos enfocando as regiões nucleares com DAPI estão representadas pela Figura 5.1F (Colágeno Tipo I), Figura 5.1I (Fibronectina) e Figura 5.1L (Tenascina).

Não foi possível a realização da imunofluorescência para detecção de MMP-2 na linhagem celular DL-2. A linhagem DL-2 não expressou colágeno tipo I, enquanto a DL-4, que expressou colágeno tipo I, não expressou as proteínas da MEC não colagênicas, fibronectina e tenascina.

5.1.3 Metaloproteinases da matriz

Todas as MMPs estudadas (1, 2 e 9) foram expressas por todas as linhagens celulares. Essas enzimas se distribuíam uniformemente por todo o citoplasma das células: MMP-1 (Figuras 5.2A e B), MMP-2 (Figuras 5.2D e E) e MMP-9 (Figuras 5.2G e H), respectivamente.

As imagens dos mesmos campos enfocando as regiões nucleares com DAPI estão representadas pelas Figuras 5.2.C (MMP-1), Figura 5.2F (MMP-2) e Figura 5.2.I (MMP-9).

Figura 5.1 - Fotomicrografias de fluorescência para vimentina e componentes da MEC na linhagem celular DL-1. Reações positivas para vimentina (A e B); colágeno tipo I (D e E); fibronectina (G e H) e tenascina (J e K). Imagens dos mesmos campos enfocando apenas regiões nucleares com DAPI estão representadas pela Figuras: 5.1F (Colágeno Tipo I), 5.1I (Fibronectina) e 5.1L (Tenascina)

Figura 5.2 - Fotomicrografias de fluorescência para MMPs na linhagem celular DL-1. Reações positivas para MMP-1 (A e B); MMP-2 (D e E) e MMP-9 (G e H). Imagens dos mesmos campos enfocando apenas regiões nucleares com DAPI estão representadas pela Figuras: 5.2C (MMP-1), 5.2F (MMP-2) e 5.2I (MMP-9)

5.2 - Ensaio de atividade de MMPs

Todas as metaloproteinases da matriz estudadas (MMPs 1, 2 e 9) foram detectadas nos meios condicionados pelas três linhagens de células-tronco provenientes de polpas dentárias humanas (DL-1, DL-2 e DL-4).

A análise estatística descritiva dos conteúdos de MMPs encontrados em meios condicionados pelas três linhagens e a análise pelo método estatístico (ANOVA complementado pelo teste de Tukey) encontram-se nos Anexos B e C, respectivamente. As médias $\pm$ o erro padrão encontram-se na Tabela 5.2 e ilustrado na Figura 5.3.

As diferentes MMPs foram detectadas na forma ativa em quantidades diversas, tanto entre MMPs, como entre as linhagens estudadas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Conteúdo de MMPs (ng/mL) detectado nos meios condicionados pelas células-tronco das linhagens provenientes de polpas dentárias (DL-1, DL-2 e DL-4). Letras diferentes indicam diferenças significantes ($p \leq 0,05$)

MMPs	DL-1	DL-2	DL-4
MMP-1	0.835 $\pm$ 0.0483 ^a	0.6094 $\pm$ 0.1009 ^a	4.9041 $\pm$ 0.2461 ^b
MMP-2	15.0967 $\pm$ 0.0871 ^{c,d}	15.82 $\pm$ 0.1998 ^c	13.4883 $\pm$ 0.857 ^d
MMP-9	0.0647 $\pm$ 0.0371 ^e	0.094 $\pm$ 0.0637 ^e	0.0335 $\pm$ 0.0226 ^e

5.2.1 Comparação de produção entre as MMPs

Houve diferença estatística na produção das 3 MMPs ($P \leq 0,05$). A produção de **MMP-2** em todas as linhagens foi significativamente maior que as demais MMPs ($p \leq 0,05$). A enzima **MMP-9** foi detectada nas menores concentrações, enquanto a **MMP-1** foi detectada em quantidades intermediárias (Figura 5.3).

5.2.2 Comparação de produção em função das linhagens celulares

A MMP-1 foi liberada pela linhagem **DL-4** em quantidades significativamente maiores ($4,90 \pm 0,2$ ng/mL) que as outras duas linhagens celulares ($p \leq 0,05$). Estas, por sua vez, produziram quantidades similares dessa enzima (**DL-1**: $0,83 \pm 0,04$ ng/mL; **DL-2**: $0,60 \pm 0,1$ ng/mL) ($p > 0,05$) (Figura 5.3, Tabela 5.2).

A concentração de MMP-2 no meio condicionado pela linhagem **DL-2** ($15,82 \pm 0,2$ ng/mL) foi significativamente maior que a encontrada no meio condicionado pela linhagem **DL-4** ($13,48 \pm 0,85$ ng/mL) ($p \leq 0,05$). A linhagem **DL-1** produziu quantidades intermediárias de MMP-2 ($15,09 \pm 0,08$ ng/mL), tendo similaridade estatística de produção com as outras duas linhagens (**DL-2** e **DL-4**) ($p > 0,05$) (Figura 5.3, Tabela 5.2).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na produção de MMP-9 pelas 3 linhagens estudadas (Figura 5.3, Tabela 5.2).

Figura 5.3 - Análise quantitativa de atividade de MMPs (ng/mL) detectado nos meios condicionados pelas células tronco das linhagens provenientes de polpas dentárias humanas (DL-1, DL-2 e DL-4). Letras diferentes significam diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Células-tronco adultas (CTAs) de polpas dentárias humanas são células pluripotentes que além de apresentarem grande plasticidade, são potencialmente importantes nos estudos da biologia da polpa. Essas células representam excelente fonte de estudos, pois podem ser obtidas de germes de dentes indicados para a exodontia, diferentemente das células-tronco embrionárias (CTEs) que dependem de um grande aparato legal e burocrático.

Adicionalmente, as CTAs de polpa dentária podem ajudar no entendimento da histogênese de tumores com suposta origem nos tecidos dentais. Um dos tumores odontogênicos (TOs) que ainda não tem sua histogênese totalmente elucidada é o mixoma odontogênico (MO). Acredita-se que sua origem seja na papila dentária, tecido precursor da polpa dentária na odontogênese.

Com o intuito de obter dados sobre a histogênese do MO, utilizamos três linhagens de CTAs provenientes de polpas dentárias humanas (linhagens DL-1, DL-2 e DL-4). A proposta do estudo foi comparar a expressão de um conjunto de moléculas que são características na neoplasia e em células cultivadas do MO (células Mix1) (JAEGER et al., 2000; MIYAGI, 2002) nas células-tronco, inferindo a possível origem desta neoplasia odontogênica.

Essas linhagens de CTAs foram previamente caracterizadas por Kerkis et al. (2006). Os autores mostraram que estas células, também conhecidas como IDPSCs (*Immature Dental Pulp Stem Cells*), além de expressarem marcadores para CTAs mesenquimais, expressaram diversos marcadores específicos de CTEs. Além disso,

apresentaram capacidade de diferenciação para neurônios e células de outras origens como células musculares lisas, células musculares esqueléticas, células cartilaginosas e ósseas. Esses dados mostraram que as IDPSCs, apesar de serem CTAs, são bastante indiferenciadas e apresentam grande plasticidade. Assim, acreditamos que estas células seriam um modelo de estudo importante na busca do entendimento da origem do MO, já que poderiam ser comparadas às aquelas presentes nos estágios iniciais da odontogênese.

Histologicamente, o MO é composto por células arredondadas, fusiformes ou estrelárias, dispostas em abundante estroma mixomatoso frouxo que contém colágeno tipo I, fibronectina, tenascina, e principalmente ácido hialurônico (AH), glicosaminoglicano que caracteriza a matriz do tumor (SLOOTWEG; VAN DEN BOS; STRAKS, 1985; SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1994; JAEGER et al., 2000). A matriz extracelular (MEC) apresenta papel bioativo na regulação do comportamento, desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função das células (ABRAHAMSON, 1986; ALBERTS et al., 1994).

Jaeger et al. (2000) desenvolveram a primeira linhagem celular derivada do MO relatada na literatura (células Mix1). Foram realizados experimentos de imunofluorescência, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão comparando-se cortes histopatológicos da neoplasia e a nova linhagem. As células cultivadas apresentaram as mesmas características morfológicas e funcionais do tumor de origem, com similaridade nas expressões de vimentina, colágeno tipo I, fibronectina, tenascina e ácido hialurônico.

Antes da pesquisa dos componentes da MEC, reação contra vimentina foi realizada a fim de verificar a natureza das células-tronco (CTs) utilizadas. A vimentina é um marcador de citoesqueleto de células mesenquimais, estrutura essencial para a

estabilidade celular (ERIKSSON; OPAL; GOLDMAN, 1992). Os resultados mostraram que todas as três linhagens de CTAs expressaram por imunofluorescência essa proteína. A vimentina foi expressa na forma de filamentos de espessuras variadas, comprovando a origem mesenquimal dessas células.

Certificada a origem mesenquimal das CTs estudadas, foi realizada a pesquisa dos diferentes componentes da MEC que estas células seriam capazes de sintetizar. Essa análise mostrou que todas as linhagens de CTAs pulparexpressaram o colágeno tipo I, exceto a linhagem celular DL-2. Segundo Kerkis¹ (comunicação pessoal) uma explicação para esse fato seria a existência de maior comprometimento das células DL-2 em diferenciar para condrócitos-símile [...]. Esse comprometimento explicaria a negatividade para o colágeno tipo I, uma vez que células cartilaginosas caracterizam-se por expressar grandes quantidades de colágeno do tipo II. Garcia et al. (2003) observaram que polpas de dentes não erupcionados expressaram menos colágeno tipo I que polpas de dentes erupcionados. Como a linhagem celular DL-2 é proveniente de polpa de dente incluso, este dado também explicaria a ausência de expressão deste colágeno.

Quando expresso, o colágeno tipo I se apresentou na forma de vesículas intracitoplasmáticas semelhantes às estruturas observadas por Jaeger et al. (2000) em células cultivadas Mix1. Essa forma de apresentação ilustra o processo de secreção do colágeno, onde a proteína é produzida na forma de procolágeno, empacotada no Complexo de Golgi e preparada para posterior secreção na MEC (FAWCETT, 1994).

---

¹Informação fornecida pela Profa. Irina Kerkis em São Paulo, 2008.

A positividade para colágeno tipo I na região nuclear das células-tronco parece ser uma marcação inespecífica do anticorpo utilizado nos experimentos, mesmo após o bloqueio com solução de BSA. Miyagi et al. (2002) observaram esse mesmo tipo de marcação nuclear em células cultivadas Mix1. Apesar da marcação do núcleo, quando este anticorpo primário foi substituído por solução de BSA (controle negativo) essa marcação não foi observada.

Nos experimentos analisando a presença de proteínas adesivas em CTAs de polpa dentária humana mostraram que nas linhagens DL-1 e DL-2, tanto a fibronectina quanto a tenascina apareceram como pequenos pontos homoganeamente distribuídos por todo o citoplasma celular. Nas reações de imunofluorescência para fibronectina foi possível se observar nos lamelipódios celulares anéis fortemente marcados pelo anticorpo. Acreditamos que este tipo de marcação indique áreas pontuais de adesão celular, sugerindo que as células-tronco utilizadas poderiam não aderir completamente ao substrato, o que favoreceria a mobilidade celular.

De todas as linhagens celulares, a DL-4 foi a única que não expressou as proteínas adesivas não colagênicas presentes em abundância no mixoma odontogênico (JAEGER et al., 2000). Uma explicação para esse fato seria o maior grau de indiferenciação desta linhagem em relação às duas outras analisadas. Apesar disso, não foi observada dificuldade de adesão em cultura, apenas alterações morfológicas sutis detectadas por microscopia de fase. Provavelmente haja um menor potencial de células desta linhagem para formação de tecidos mineralizados (THESLEFF et al., 1988; THESLEFF; VAINIO; JALKANEN, 1989; MACKIE; THESLEFF; CHIQUET-EHRISMANN, 1987)

Células desta linhagem poderiam ser utilizadas em trabalhos futuros como controles negativos, tanto para fibronectina quanto para tenascina, em análises comparativas de tumores. Além disso, estudos recentes *in vivo* utilizando-se células-tronco transplantadas para o reparo de córneas de coelhos danificadas, têm mostrado um maior comprometimento de diferenciação das células DL-4 para células epiteliais-símile (comunicação pessoal)².

A fibronectina é uma proteína adesiva que promove a adesão celular à matriz (ALBERTS et al., 1994) e está relacionada à organização de microfilamentos do citoplasma, influenciando na morfologia, espreadimento e promoção da migração celular (DUBAND et al., 1986).

A tenascina também é uma proteína adesiva, com distribuição mais restrita, abundante em tecidos embrionários, processos de cicatrização e reparação tecidual (MAKIE; HALFTER; LIVERANI, 1988; ALBERTS et al., 1994). Além disso, essa proteína parece estar relacionada à diferenciação de células mesenquimais em tecidos duros durante a odontogênese, osteogênese e condrogênese (THESLEFF et al., 1988; THESLEFF; VAINIO; JALKANEN, 1989; MACKIE; THESLEFF; CHIQUET-EHRISMANN, 1987). Chiquet-Ehrismann et al. (1988) tem estudado a propriedade antiadesiva da tenascina, todavia esse mecanismo ainda não foi completamente elucidado.

---

²Informação fornecida pela Profa. Irina Kerkis em São Paulo, 2008.

Nenhuma das 3 linhagens de CTs expressou o AH, principal componente do tecido mixóide que caracteriza o tumor. No MO o AH se expressou no citoplasma das células e estroma tumoral de forma marcante (JAEGER et al., 2000). Esta elevada expressão de AH no MO estaria relacionado à agressividade local do tumor, facilitando na infiltração das células neoplásicas entre as trabéculas ósseas (ZHAO et al., 1999). A negatividade para esse componente dificulta a possibilidade de relacionarmos a origem do tumor ao estágio de diferenciação apresentado pelas CTs estudadas.

Kerkis et al. (2006) observaram que apesar das IDPSCs apresentarem positividade para alguns marcadores de CTEs e serem pluripotentes, quando injetadas em camundongos não foram capazes de gerar teratomas. Complementarmente, a negatividade para o AH nas três linhagens de CTs deste trabalho sugere o menor potencial de migração dessas células, reforçando a ideia de utilização segura das IDPSCs em terapias celulares diversas. Novos experimentos deverão ser realizados verificando-se a expressão de AH em CTAs de medula óssea e CTEs para o melhor entendimento da função desta proteína no comportamento migratório das CTs.

Apesar das linhagens estudadas não serem capazes de expressar todos os componentes da MEC presentes no MO, principalmente o AH que é característico desta neoplasia, seguimos na pesquisa de mais elementos do tumor nas linhagens de CTs. Assim, realizamos reações de imunofluorescência para detectar a presença de metaloproteinases da matriz (MMPs) nestas células.

A análise da expressão de MMPs nas CTs de polpa dentária por imunofluorescência mostraram que todas as MMPs estudadas (1, 2 e 9) foram expressas pelas três linhagens celulares (DL-1, DL-2 e DL-4). A expressão dessas MMPs poderia indicar algum tipo de diferenciação das CTs, uma vez que células totalmente

indiferenciadas não seriam capazes de expressar estas enzimas. De fato, a expressão de MMPs e a variabilidade da expressão de moléculas da MEC nas diferentes linhagens de CTAs indicam que estas células estão em diferentes estágios de diferenciação

Miyagi (2002) dando continuidade aos experimentos iniciados por Jaeger et al. (2000), analisaram a expressão e a atividade de MMPs no MO e em células cultivadas dessa neoplasia (linhagem celular Mix1) visando elucidar o envolvimento dessas enzimas na invasividade local do tumor. Foram realizados experimentos de imunohistoquímica em cortes histológicos e imunofluorescência em células cultivadas Mix1 para MMPs 1, 2, 3 e 9. Essas MMPs foram escolhidas por serem enzimas capazes de degradar uma grande variedade de substratos frequentemente estarem relacionadas a processos invasivos de neoplasias malignas (WOESSNER JR, 1991; MÄKELÄ et al., 1994; REYNOLDS, 1996; AHRENS et al., 1996; MUDGETT et al., 1998). Houve positividade para as MMPs 1, 2, 3 e 9 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A análise zimográfica de meios condicionados pelas células Mix1 mostrou atividade dessas enzimas em gel de gelatina, com bandas representativas de MMP-2 na forma latente, e MMP-9 nas formas latente e ativa. A análise zimográfica em gel de caseína, específico para a detecção de collagenases e estromelisinases, não detectou a presença de MMP-1 ou da MMP-3, nos meios condicionados. Concluiu-se que as MMPs 2 e 9 poderiam estar envolvidas no processo de crescimento e infiltração do MO.

A zimografia em gel de gelatina tem a vantagem de medir quantitativamente a expressão de enzimas ativadas e latentes de meios condicionados verificando a quantidade de proteína produzida e liberada pelas células (SALO; TURPEENNIEMI-HUJANEN; TRYGGVASON, 1985). Essa técnica identifica a proteína analisada por comparação com

bandas padrão que se distribuem em gel após passagem de corrente, não é capaz de analisar qualitativamente.

Para finalizar nossos experimentos, foi realizada a análise do meio condicionado pelas três linhagens de CTs. Diferentemente da zimografia, os kits de atividade utilizam anticorpos específicos que favorecem a identificação precisa da proteína analisada nos meios condicionados pelas células-tronco. Apesar da elevada precisão deste teste, ele é um teste caro e são poucos os kits disponíveis comercialmente para serem estudados. Esses kits permitem a identificação das formas latentes ou ativas dependendo do interesse do estudo.

Foi observado que todas as linhagens liberaram para o meio todas as MMPs estudadas. Entre as MMPs, todas as linhagens produziram quantidades significativamente maiores de MMP-2, enquanto que a MMP-9 foi detectada nas menores concentrações, e a MMP-1 apresentou quantidades intermediárias.

As MMP-2 e MMP-9 degradam principalmente o colágeno tipo IV, que é o principal componente da membrana basal (NAGASE, 1997; SHAPIRO, 1998). Os elevados níveis de MMP-2 encontrados nos meios condicionados pelas CTAs em nossos experimentos vão de acordo aos experimentos realizados por Gusman, Santana e Zehnder (2002). Os autores compararam os níveis de MMP-2 em células cultivadas de polpas dentárias saudáveis e inflamadas. Foi observado que a MMP-2 se apresenta em baixos níveis em processos inflamatórios, sendo elevada em polpas saudáveis.

Resultados muito semelhantes foram observados por Huang et al. (2004). Os autores realizaram análise de meios condicionados por culturas primárias de polpa dentária humana de dentes terceiros molares e de extratos de citosol celulares. O meio condicionado mostrou que a principal gelatinase dos meios condicionados foi a MMP-2

na forma latente (72 kDa). Bandas gelatinolíticas muito discretas representativas da MMP-9 na forma latente (92 kDa) também foram observadas. Os extratos de citosol mostraram similaridade nos resultados, apesar dos níveis de MMPs intracelulares serem inferiores aos observados nos meios condicionados, indicando que todo o material produzido é rapidamente liberado para a MEC.

A expressão de baixos níveis de MMP-9 nos meios condicionados pelas CTs justifica-se por estas linhagens estudadas serem provenientes de polpas saudáveis. Os níveis de MMP-9 são elevados em polpas inflamadas, enquanto que em polpas normais, esses níveis são geralmente baixos (GUSMAN; SANTANA; ZEHNDER, 2002).

Os níveis de MMP-1 produzidos e liberados pelas CTAs nos meios condicionados foram considerados intermediários entre as três MMPs analisadas. Entre as linhagens, a MMP-1 foi liberada pela linhagem DL-4 em quantidades significativamente maiores que as outras linhagens de CTs. Por ser a linhagem DL-4 a mais indiferenciada dentre as três analisadas neste estudo, a expressão de MMP-1 pode ser um marcador de indiferenciação para CTs. A diminuição da expressão dessa enzima poderia indicar maior grau de diferenciação celular.

Avaliando-se os dados obtidos neste estudo, observou-se que apesar das três linhagens de CTs terem sido obtidas e cultivadas utilizando-se os mesmos materiais e métodos, elas apresentaram comportamentos de expressão de proteínas distintos, mesmo entre linhagens da mesma denteição (DL-1 e DL-4), linhagens provenientes de dentes decíduos funcionais. Enquanto a linhagem celular DL-1 expressou fibronectina e tenascina por imunofluorescência, a linhagem DL-4 foi negativa para estas proteínas. Outro dado observado foi a similaridade de expressão de proteínas entre linhagens de diferentes origens. Na análise do meio condicionado pelas CTs, onde não houve diferença

estatisticamente significativa na produção de MMP-1 entre a linhagem DL-1 (dente decíduo) e a DL-2 (dente permanente).

O momento de obtenção dessas polpas poderia justificar essas diferenças comportamentais. CTs provenientes de dentes em função (DL-1 e DL-4) podem comportar-se de maneira distinta das células provenientes de dentes inclusos (DL-2). Com o passar do tempo, as estruturas de dentes funcionais sofrem modificações fisiológicas, defensivas e patológicas. Os dentes inclusos estariam livres desses efeitos, pois como nunca erupcionaram, não reacionam como dentes em função (MORSE, 1991). Além disso, temos que lembrar que existem diferenças individuais tais como informações genéticas e grau de comprometimento de diferenciação de cada linhagem que podem influenciar no comportamento das células. As CTs analisadas puderam ser homogêneas para marcadores específicos que as caracterizam como sendo CTs, o que não impediu de apresentarem diferenças na expressão de outros marcadores que refletem no comportamento de cada linhagem.

De todas as 3 linhagens estudadas, a linhagem DL-1 que foi obtida a partir de polpa de dente decíduo extranumerário, expressou quase todas as proteínas analisadas, exceto o ácido hialurônico. Apesar disso, os dados sugerem que esta linhagem seja mais mesenquimal que as linhagens DL-2 e DL-4. O padrão de marcação de anticorpos específicos para CTAs expresso pela DL-1 foi muito similar ao observado nas SHEDs (*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) por Miura et al. (2003) (informação pessoal)³.

---

³Informação fornecida pela Profa. Irina Kerkis em São Paulo, 2008.

O objetivo deste trabalho foi analisar através de kits de atividades a presença de formas ativas das MMPs 1, 2 e 9. Quando as MMPs presentes nos meios condicionados não foram artificialmente ativados por APMA foi observado um resultado bastante interessante. As MMPs 1 e 9 presentes nesses meios já se apresentavam ativadas naturalmente, não havia nenhuma parcela de proteína livre para ser ativada artificialmente, diferentemente do tumor onde havia a presença da forma latente de MMP-2 e MMP-9 nos meios condicionados pela linhagem Mix1. Infelizmente não foi possível analisar a presença de MMP-2 naturalmente ativada nos meios condicionados pelas células-tronco por problemas de ordem técnica. No decorrer dos experimentos, o kit para detecção de MMP-2 foi removido do mercado, sem previsão para novas entregas.

A análise dos componentes da matriz extracelular mostrou algumas diferenças significativas. Todas as linhagens de células-tronco não expressaram o ácido hialurônico que é a molécula mais característica e abundante no tumor. Estes dados podem ser importantes na estimativa do momento da odontogênese, no qual a neoplasia teve origem. A ausência de ácido hialurônico, que é um marcador de relevância do tumor, tanto *in vitro* como *in vivo*, poderia indicar que sua origem seria num momento mais adiantado da odontogênese. A origem do mixoma não seria a partir das células-tronco, mas de células progenitoras em estágios mais diferenciados.

Novos experimentos deverão ser realizados com o intuito de se estudar a histogênese do mixoma odontogênico. No entanto, este trabalho abriu um novo leque de possibilidades de uso das células-tronco de polpas dentárias humanas. Como estas células apresentaram plasticidade, seria interessante realizar experimentos induzindo a diferenciação celular em busca do momento onde estas células pudessem ser capazes de

secretar ácido hialurônico, o que poderia indicar o caminho pelo qual células da papila dentária poderiam gerar tumores odontogênicos como o mixoma.

No âmbito da Endodontia a manipulação dessas células-tronco trazem um novo campo de estudos principalmente para engenharia tecidual com o objetivo de repor tecido dentário perdido.

7 CONCLUSÕES

7.1 Linhagens de células tronco originadas de polpas dentárias humanas não são capazes de expressar todos os componentes da MEC características do mixoma odontogênico. Elas não secretam ácido hialurônico e as demais proteínas da MEC são expressadas de formas variadas entre as linhagens. No entanto, todas as linhagens são capazes de secretar as MMPs-1, -2 e -9.

7.2 Pelas divergências de expressão das proteínas da MEC secretadas por linhagens de células-tronco derivadas de polpas dentárias humanas entre si com as células do mixoma odontogênico, não há possibilidade de se determinar a origem do tumor nas células-tronco.

REFERÊNCIAS¹

Abrahamson DR. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 1986;149(4):257-78.

Agren MS. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994;131(5):634-40.

Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(9):1576-87.

Alberts B, Bray S, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. *Molecular biology of the cell*. 3^a. ed. New York: Garland; 1994.

Allphin AL, Maniglia AJ, Gregor RT, Sawyer R. Myxomas of the mandible and maxilla. *ENT J* 1993;72(4):280-4.

Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 2007;48(4):323-34.

Asaumi J, Matsuzaki H, Hisatomi M, Konouchi H, Shigehara H, Kishi K. Application of dynamic MRI to differentiating odontogenic myxomas from ameloblastomas. *Eur J Radiol* 2002;4(1):37-41.

Attie JN, Catania A, Brenner S. Myxoma of the maxilla: preoperative irradiation to facilitate resection. *Am J Roentgenol* 1966;96(1):19.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005.

Barker BF. Odontogenic mixoma. *Semin Diagn Pathol* 1999;16(4):297-301.

---

¹De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódico segundo base de dados MEDLINE.

Barret AJ, Starkey PM. The interaction of α 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 1973;133(4):709-24.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990;348(6303):699-704.

Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;105(12):1663–8.

Birkedal-Hansen H. From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. *J Oral Pathol* 1988;17(9-10):445-451.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105(7):829-41.

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:73-91.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;16279(5349):349-52.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290(5497):1775-9.

Breckon JJW, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC. Identification of matrix metalloproteinases and their inhibitor in the articular disc of the craniomandibular joint of the rabbit. *Arch Oral Biol* 1996;41(4):315-22.

Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477(1/2):267-83.

Canalis RF, Smith GA, Konrad HR. Myxomas of the head and neck. Arch Otolaryngol 1976;102(5):300-5.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nat Rev Cancer 2004a;4(2):118-32.

Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. Ann N Y Acad Sci 2004b;1014:58-66.

Cawston TE, Mercer E. Preferential binding of collagenase to α 2-macroglobulin in the presence of the tissue inhibitor of metalloproteinases. FEBS Lett 1986;209(1):9-12.

Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. Tenascin interferes with fibronectin action. Cell 1988;53(3):383-90.

Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. J Biol Chem 1985;260(22):12367-76.

Chuchurru JA, Luberti R, Cornicelli JC, Dominguez FV. Myxoma of the mandible with unusual radiographic appearance. J Oral Maxillofac Surg 1985;43(12):987-90.

Clarke MF, Becker MW. Câncer: o lado maligno das células-tronco. Scientific American Brasil 2006;51(8):39-46.

Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive medicine and reconstructive surgery. J Surg Res 2005;124(2):201-8.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science 2002;295(5564):2387-92.

Cuestas-Carnero R, Bachur RO, Gendelman H. Odontogenic myxoma: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;46(8):705-9.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999;189(3):300-8.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36(13):1621-30.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007;58:267-84.

Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77(3):276-80.

DeClerk YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer* 2000;36(10):1258-68.

Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Half A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Res Cell Mol Biol* 1996;14(3):288-95.

Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993;59(3):329-41.

Duband JL, Rocher S, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP. Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. *J Cell Biol* 1986;102(1):160-78.

Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;1594(8):4080-5.

Erickson HP. Gene knockouts of c-src, transforming growth factor $\alpha 1$, and tenascin suggest superfluous nonfunctional expression proteins. *J Cell Biol* 1993;120(5):1079-81.

Eriksson JE, Opal P, Goldman RD. Intermediate filament dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(1):99-104.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292(5819):154-6.

Evrard L, Daelemans P, Glineur R, Vanmuylder N, Louryan S, Dourov N. Myxomatous odontogenic tumour of the maxilla. An unusual case with squamous and mucoproducing epithelial component. *Acta Stomatol Belg* 1997;94(2):59-62.

Farman AG, Nortjé CJ, Grotepass FW, Farman FJ, Van Zyl JA. Myxofibroma of the jaws. *Br J Oral Surg* 1977;15(1):3-18.

Farman AG, Nortjé CJ, Wood RE. Oral and maxillofacial diagnostic imaging. St. Louis: CV Mosby; 1993.

Fawcett DW. Bloom and Fawcett, a textbook of histology. New York: Chapman & Hall, 1994.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279(5356):1528-30.

Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005;34(5):415-23.

Freshney RI. Biology of the cultured cell. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4^a ed. New York: Willey; 2000.

Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, et al. Enamelysin (MMP-20) localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 1998;77(8):1580-8.

Fullmer HM, Gibson W. Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* 1966;209(24):728-9.

Fullmer HM, Lazarus G. Collagenase in human, goat and rat bone. *Isr J Med Sci* 1967;3:758.

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

Gibson AJ, Karasinski J, Relvas J, Moss J, Sherratt TG, Strong PN, et al. Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *J Cell Sci* 1995;108(Pt 1):207-14.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-22.

Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43(2 Pt 1):405-13.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro e in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(25):13625-30.

Gross J, Lapière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962;48(1):1014-22.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002;110(5):353-7.

Halfpenny W, Verey A, Bardsley MA. Myxoma of the mandibular condyle. A case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(3):348-53.

Hasleton PS, Simpson W, Craig RDP. Myxoma of the mandible - A fibroblastic tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46(3):396-406.

Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2002;12(2):131-8.

Hodson JJ, Prout RES. Chemical and histochemical characterization of mucopolysaccharides in a jaw myxoma. *J Clin Pathol* 1968;21(5):582-9.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell, Cambridge* 1999;99(1):81-92.

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;306(5701):1568-71.

Huang FM, Yang SF, Hsieh YS, Liu CM, Yang LC, Chang YC. Examination of the signal transduction pathways involved in matrix metalloproteinases-2 in human pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(3):398-403.

Inoue M, Kratz G, Haegerstrand A, Stahle-Backdahl M. Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after accurate injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *J Invest Dermatol* 1995;104(4):479-83.

Itoh T, Ikeda T, Gomi H, Nakao S, Suzuki T, Itohara S. Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem* 1997;272(36):22389-92.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58(5):1048-51.

Jaeger MMM, Santos J, Domingues M, Ruano R, Araújo N, Caroli A, et al. A novel cell line retains the morphological characteristics of the cells and matrix of odontogenic myxoma. *J Oral Pathol Med* 2000;29(3):129-38.

Jeffrey JJ. Interstitial collagenases. In: Parks, WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. 1^a ed. San Diego: Academic Press; 1998. cap. 2, p. 15-42.

Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, et al. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36(1):20-5.

Kaffe I, Naor H, Buchner A. Clinical and radiological features of odontogenic myxoma of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol* 1997;26(5):299-303.

Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999;31(1):34-45.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438(7069):820-7.

Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006;166(23):11089-93.

Katz JO, Underhill TE. Multilocular radiolucencies. *Dent Clin North Am* 1994;38(1):63-81.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006;184(3-4):105-16.

Kerkis I, Kerkis A, Sukoyan M, Pereira LV, Cerruti H. Células-tronco: plasticidade e aplicação. In: *Biotecnologia e Saúde*. 1ª ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda; 2004.

Keszler A, Domingues FV, Giannunzio G. Myxoma in childhood: an analysis of 10 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53(5):518-21.

Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulbrich N. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 1991;198(3):775-81.

Kramer IRH. The world health organisation: histological typing of odontogenic tumors: an introduction of the second edition. *J Dent Assoc S Afr* 1992;47(5):208-10.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumors. 2^a ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.

Krane SM. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:1-10.

Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potencial cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ* 2002;66(6):766-73.

Kues WA, Carnwath JW, Niemann H. From fibroblast and stem cells: implications for cell therapies and somatic cloning. *Reproduction, Fertility and Development* 2005;17(1-2):125-34.

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):114-20.

Kusukawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53(5):530-4.

Lakshmipathy, U. Verfaillie, C. Stem Cell Plasticity. *Blood Rev* 2005;19(1):29-38

Llano E, Pendás AM, Freije JP, Nakano A, Knäuper V, Murphy G, et al. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 1999;59(11):2570-6.

Lo Muzio L, Nocini P, Favia G, Procaccini M, Mignogna MD. Odontogenic myxoma of the jaws. A clinical, radiologic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(4):426-33.

Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 1988;107(6):2757-67.

Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol* 1987;105(6 Pt 1):2569-79.

Maidment SL, Rucklidge GJ, Rooprai HK, Pilkington GJ. An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett* 1997;116(1):71-7.

Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994;73(8):1397-406.

Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006;85(11):966-79.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12(12):1075-95.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6(4):121-5.

McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med* 2000;6(4):149-56.

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290(5497):1779-82.

Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993;73(1):161-95.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):5807-12.

Miyagi SPH. Estudo da expressão e da atividade de metaloproteinases da matriz em mixoma. Análise in vivo e in vitro [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Miyagi SPH, Hiraki KR, Martins MD, Marques MM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic mixoma in vivo e in vitro. *J Oral Sci*. In press January 2008.

Moore KE, Mills JF, Thornton MM. Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cells debate. *Gend Med* 2006;3(3): 161-8.

Morse D. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Bulletin du Groupement International Pour la Recherche Scientifique en Stomatologie et Odontologie* 1991;72(6):721-45.

Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Rivera LMR, Meneses-García A. Odontogenic Tumors in México. A collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84(6):672-5.

Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, Forsyth AJ, McDonnell J, Singer II, et al. Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1998;41(1):110-21.

Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7(2):120-5.

Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 1997;15(8/9):511-8.

Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 1995;248:496-510.

Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:31-41.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378(3-4):151-60.

Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992;1:421-4.

Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of α 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:294-302.

National Institutes Of Health (NIH). Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Updated June 2001. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport> Acesso em 11 jan. 2008.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1998.

Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998;95(3):379-91.

Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):52-60.

Nugent CI, Bosco G, Ross LO, Evans SK, Salinger AP, Moore JK, et al. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* 1998;8(11):657-60.

Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(7):567-75.

Olgac V, Koseoglu BG, Aksakalli, N. Odontogenic tumours in Istanbul: 527cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2006;44(5):386-8.

Oygür T, Dolanmaz D, Tokman B, Bayraktar S. Odontogenic myxoma containing osteocement-like spheroid bodies: report of a case with an unusual histopathological feature. *J Oral Pathol Med* 2001;30(8):504-6.

Papaccio G, Graziano A, D'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006;208(2):319-25.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 2003;111(2):117-27.

Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(9):1109-15.

Parks WC, Sudbeck BD, Doyle GR, Saarialho-Kere UK. Matrix metalloproteinases in tissue repair. In: Parks WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. 1^a ed. San Diego: Academic Press, 1998. cap. 11, p. 263-97.

Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele JC. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997;84(2):160-6.

Pei D, Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 1996;271(15):9135-40.

Peltola J, Magnusson B, Happonen RP, Borrmann H. Odontogenic myxoma – a radiographic study of 21 tumors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1994;32(5):298-302.

Pesce M, Schöler HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells* 2001;19(4):271-8.

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

Pittenger MF, Marshak DR. Adult mesenchymal stem cells. In: Marshak, D.R. Gardner, R.L. Gottlieb, D. (eds). *Stem cells biology*. London: Cold Spring Harbor, 2001 p.349-74.

Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol* 2003;56(2): 86-96.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:1-22.

Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia bucal. Correlações clinicopatológicas*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1996;2(1):70-6.

Rifas L, Halstead RL, Peck WA, Avioli LV, Welgus HG. Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major products. *J Clin Invest* 1989;84(2):686-94.

Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud J, Welgus HG, Parks WC. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest* 1993;92(6):2858-66.

Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H. Transforming growth factor beta-I up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 1991;266(18):11436-41.

Salo T, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. Tumor-promoting phorbol esters and cell proliferation stimulate secretion of basement membrane (type IV) collagen-degrading metalloproteinase by human fibroblasts. *J Biol Chem* 1985;260(14):8526-31.

Santavicca M, Noel A, Angliker H, Stoll I, Segain JP, Anglard P, et al. Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J* 1996;315(3):953-8.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994;370(6484):61-5.

Schmidt-Westhausen A, Becker J, Schuppan D, Burkhardt A, Reichart PA. Odontogenic myxoma - characterisation of the extracellular matrix (ECM) of the tumour stroma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B(6):377-80.

Schneck DL, Gross PD, Tabor MW. Odontogenic myxoma: report of two cases with reconstruction considerations. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51(8):935-40.

Shafer WG, Hine MK, Levy BW. *Tratado de Patologia Bucal*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.

Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(5):602-8.

Shapiro SD. Mighty mice: transgenic technology “knocks out”: Questions of matrix metalloproteinase function. *Matrix Biol* 1997;15(8-9):527-33.

Shapiro SD, Griffin GL, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Welgus HG, et al. Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J Biol Chem* 1992;267(7):4664-71.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(3):191-9.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18(4):696-704.

Shin S, Lee J, Baek S, Lim S. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28(4):313-5.

Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(9):3942-6.

Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000;287(5457):1431-3.

Slootweg PJ. Odontogenic tumours - an update. *Curr Diagn Pathol* 2006;12:54-65.

Slootweg PJ, van den Bos T, Straks W. Glycosaminoglycans in myxoma of the jaw: a biochemical study. *J Oral Pathol* 1985;14(4):299-306.

Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435-62.

Smith AG, Hooper ML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 1987;121(1):1-9.

Sottrup-Jensen L. α -macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 1989;264(20):11539-42.

Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16(2):103-8.

Spencer KR, Smith A. Odontogenic myxoma: case report with reconstructive considerations. *Aust Dent J* 1998;43(4):209-12.

Stahle-Bäckdahl M, Parks WC. 92 kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142(4):995-1000.

Stearns ME, Wang M. Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 1993;53(4):878-83.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7(15):1434-41.

Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2001;11(2):143-52.

Stricklin GP, Bauer EA, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from both fibroblasts and organ cultures. *Biochemistry* 1977;16(8):1607-15.

Suarez PA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Don't confuse dental soft tissues with odontogenic tumors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105(6):490-4.

Sumi Y, Miyaishi O, Ito K, Ueda M. Magnetic resonance of myxoma in the mandible: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2000;90(5):671-6.

Takahashi K, Okada TS. An analysis of the effect of "conditioned medium" upon the cell culture at low density. *Dev Growth Differ* 1970;12(2):65-77.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-72.

Tam WL, Ang YS, Lim B. The molecular basis of ageing in stem cells. *Mech Ageing Dev* 2007;128(1):137-48.

Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 2006;12(8):154-163.

Thesleff I, Kantomaa T, Mackie E, Chiquet-Ehrismann R. Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin in the skull of the growing rat. *Arch Oral Biol* 1988;33(6):383-90.

Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell-matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol* 1989;33(1):91-7.

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999;35(3):227-33.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(17):7844-8.

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005;100(1):12-27.

Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A, Leco KJ, Watson A, Kossakowska AE. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 1992;66(6):1188-94.

van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1983;28(4):339-45.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(14):5578-82.

van Wyk CW, Olivier A, Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med* 2001;30(3):168-77.

Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: Identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* 2000;60(4):877-82.

Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: Verlag von August Hirschwald; 1871.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;93(3):411-22.

Vu TH, Werb Z. Gelatinase B: structure, regulation and function. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. 1^a ed. San Diego: Academic Press, 1998. cap. 5, p. 115-48.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116(5):639-48.

Walker DG, Lapière CM, Gross J. A collagenolytic factor in rat bone promoted by parathyroid extract. *Biochem Biophys Res Commun* 1964;15(5):397-402.

Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J Biol Chem* 1981;256(18):9511-5.

Werb Z, Ashkenas J, Macauley A, Wiesen JF, Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(9):1087-97.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385(6619):810-3.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Interstitial tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(4):1402-7.

Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5(8):2145-54.

Woessner Jr JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:11-21.

Woessner Jr JF. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. 1st ed San Diego: Academic Press, 1998. cap. 1, p. 1-14.

Woessner JF, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 2000.

Woolley DE, Roberts DR, Evanson JM. Small molecular weight ?1 serum protein which specifically inhibits human collagenases. *Nature* 1976;261(5558):325-7.

Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):64-8.

Yu AE, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG. 72kDa gelatinase (Gelatinase A): structure, activation, regulation, and substrate specificity. In: Parks WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1998. cap. 4, p. 85-113.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006;12(10):2813-23.

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

Zucker S, Cao J, Chen W. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000;19(56):6642-50.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 39/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Análise de proteínas expressas por células do mixoma odontogênico em células-tronco adultas de polpa dentária humana", de responsabilidade da Pesquisadora **Sueli Patrícia Harumi Miyagi**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia Martins Marques**.

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, 04 de abril de 2006

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Análise estatística descritiva dos conteúdos de MMPs nos meios condicionados pelas diferentes linhagens celulares

	MMP1 DL1	MMP1 DL2	MMP1 DL4	MMP2 DL1	MMP2 DL2	MMP2 DL4	MMP9 DL1	MMP9 DL2	MMP9 DL4
Tamanho da amostra	12	12	12	3	3	3	12	12	12
Mínimo	0.4966	0.1098	4.0741	14.9520	15.4220	11.8160	0.0000	0.0000	0.0000
Máximo	0.9801	1.4635	6.9749	15.2530	16.0490	14.6500	0.3750	0.7740	0.2010
Amplitude Total	0.4835	1.3537	2.9007	0.3010	0.6270	2.8340	0.3750	0.7740	0.2010
Mediana	0.8834	0.5449	4.7026	15.0850	15.9890	13.9990	0.0000	0.0005	0.0000
Primeiro Quartil (25%)	0.7625	0.3999	4.3642	15.0185	15.7055	12.9075	0.0000	0.0000	0.0000
Terceiro Quartil (75%)	0.9801	0.7383	5.1619	15.1690	16.0190	14.3245	0.0316	0.0573	0.0000
Desvio Interquartilico	0.2176	0.3384	0.7977	0.1505	0.3135	1.4170	0.0316	0.0573	0.0000
Média Aritmética	0.8350	0.6094	4.9041	15.0967	15.8200	13.4883	0.0647	0.0940	0.0335
Variância	0.0280	0.1221	0.7266	0.0228	0.1197	2.2035	0.0165	0.0486	0.0061
Desvio Padrão	0.1675	0.3494	0.8524	0.1508	0.3460	1.4844	0.1286	0.2205	0.0782
Erro Padrão	0.0483	0.1009	0.2461	0.0871	0.1998	0.8570	0.0371	0.0637	0.0226
Coefficiente de Variação	20.06%	57.34%	17.38%	1.00%	2.19%	11.01%	198.82%	234.59%	233.55%
Assimetria (g1)	-0.9448	1.2529	1.4114	0.3460	-1.6736	-1.3649	1.8957	3.1439	2.0552
Curtose (g2)	-0.1859	2.5057	2.1463	---	---	---	2.5297	10.2548	2.6400
Média Harmônica	0.7970	0.4110	4.7879	15.0957	15.8149	13.3735	0.2110	0.0057	0.2010
N (média harmônica)	12	12	12	3	3	3	3	6	2
Média Geométrica	0.8172	0.5170	4.8429	15.0962	15.8175	13.4318	0.2353	0.0546	0.2010
N (média geométrica)	12	12	12	3	3	3	3	6	2
Variância (geom.)	1.0223	1.1990	1.0114	1.0000	1.0002	1.0056	1.1462	8.4149	1.0000
Desvio Padrão (geom.)	1.2530	1.9088	1.1755	1.0100	1.0223	1.1200	1.7516	9.1579	1.0000

ANEXO C - Análise estatística pelo teste paramétrico ANOVA complementado por Tukey

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	1728.631	216.079
Erro	72	15.120	0.210
F	1028.9220		
(p)	0.0000		
Média 1 (MMP1-DL1)	0.8350		
Média 2 (MMP1-DL2)	0.6094		
Média 3 (MMP1-DL4)	4.9041		
Média 4 (MMP2-DL1)	15.0967		
Média 5 (MMP2-DL2)	15.8200		
Média 6 (MMP2-DL4)	13.4883		
Média 7 (MMP9-DL1)	0.0647		
Média 8 (MMP9-DL2)	0.0940		
Média 9 (MMP9-DL4)	0.0335		
Tukey:	Q	(p)	
Médias (MMP1-DL1 e MMP1-DL2)	1.7055	> 0.05	
Médias (MMP1-DL1 e MMP1-DL4)	30.7591	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP2-DL1)	68.1837	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP2-DL2)	71.6419	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP2-DL4)	60.4944	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP9-DL1)	5.8231	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP9-DL2)	5.6015	< 0.01	
Médias (MMP1-DL1 e MMP9-DL4)	6.0589	< 0.01	
Médias (MMP1-DL2 e MMP1-DL4)	32.4646	< 0.01	
Médias (MMP1-DL2 e MMP2-DL1)	69.2624	< 0.01	
Médias (MMP1-DL2 e MMP2-DL2)	72.7206	< 0.01	
Médias (MMP1-DL2 e MMP2-DL4)	61.5731	< 0.01	
Médias (MMP1-DL2 e MMP9-DL1)	4.1176	> 0.05	
Médias (MMP1-DL2 e MMP9-DL2)	3.8961	> 0.05	
Médias (MMP1-DL2 e MMP9-DL4)	4.3534	> 0.05	
Médias (MMP1-DL4 e MMP2-DL1)	48.7300	< 0.01	
Médias (MMP1-DL4 e MMP2-DL2)	52.1882	< 0.01	
Médias (MMP1-DL4 e MMP2-DL4)	41.0407	< 0.01	
Médias (MMP1-DL4 e MMP9-DL1)	36.5822	< 0.01	
Médias (MMP1-DL4 e MMP9-DL2)	36.3607	< 0.01	
Médias (MMP1-DL4 e MMP9-DL4)	36.8180	< 0.01	
Médias (MMP2-DL1 e MMP2-DL2)	2.7339	> 0.05	
Médias (MMP2-DL1 e MMP2-DL4)	6.0789	< 0.01	
Médias (MMP2-DL1 e MMP9-DL1)	71.8666	< 0.01	
Médias (MMP2-DL1 e MMP9-DL2)	71.7265	< 0.01	
Médias (MMP2-DL1 e MMP9-DL4)	72.0157	< 0.01	
Médias (MMP2-DL2 e MMP2-DL4)	8.8129	< 0.01	
Médias (MMP2-DL2 e MMP9-DL1)	75.3248	< 0.01	
Médias (MMP2-DL2 e MMP9-DL2)	75.1847	< 0.01	
Médias (MMP2-DL2 e MMP9-DL4)	75.4739	< 0.01	
Médias (MMP2-DL4 e MMP9-DL1)	64.1773	< 0.01	
Médias (MMP2-DL4 e MMP9-DL2)	64.0372	< 0.01	
Médias (MMP2-DL4 e MMP9-DL4)	64.3264	< 0.01	
Médias (MMP9-DL1 e MMP9-DL2)	0.2215	> 0.05	
Médias (MMP9-DL1 e MMP9-DL4)	0.2358	> 0.05	
Médias (MMP9-DL2 e MMP9-DL4)	0.4573	> 0.05	