UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Paula Nascimento Antonio

Participação das proteínas moesina e Rho-A na evolução dos tumores odontogênicos benignos

BAURU
2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

PAULA NASCIMENTO ANTONIO

**Participação das proteínas moesina e Rho-A na evolução dos
tumores odontogênicos benignos**

**BAURU
2015**

PAULA NASCIMENTO ANTONIO

**Participação das proteínas moesina e Rho-A na evolução dos
tumores odontogênicos benignos**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Versão corrigida

**BAURU
2015**

An88p Antonio, Paula Nascimento
Participação das proteínas moesina e Rho-A na
evolução dos tumores odontogênicos benignos / Paula
Nascimento Antonio – Bauru, 2015.
128p.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível
no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de
Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 34480714.7.0000.5417
Data: 17 de junho de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Antonio Sérgio Antonio de Freitas, Maria Elizabete Nascimento Antonio** por serem o meu grande amor e razão de viver e ao meu querido namorado **Tiago De Gaspari** por me apoiar e sempre estar ao meu lado.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, pelos ensinamentos, profissionalismo, pela atenção a todos os detalhes. Sua dedicação foi essencial e inestimável para a realização desse trabalho. Obrigada pela oportunidade a mim oferecida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, minha fonte de fé e força, por ser o provedor de todas as minhas alegrias e alicerce para vencer as adversidades.

À minha mãe, **Maria Elizabete Nascimento Antonio**, minha melhor amiga, pela dedicação, amor, carinho, por sempre prezar pela minha felicidade e torcer por mim. Obrigada por ser minha mãe. Amo você!

Ao meu pai, **Antonio Sérgio Antonio de Freitas**, por ser um homem bom, carinhoso, sempre me incentivando, por acreditar em mim e proporcionar que eu realizasse meus sonhos. Você é meu super-herói. Te amo!

À minha avó, **Unilda Antonio de Freitas**, que está sempre orando por mim, torcendo para que tudo dê certo.

Ao meu namorado, **Tiago De Gaspari**, pela pessoa maravilhosa que é, por me amar tanto, por estar presente em todos os momentos, sempre me fazendo sorrir e não ter me deixado desistir nos momentos de fraqueza. Te amo!

As minhas queridas **Lola, Pepita e Pipoca**, meus animais de estimação, que merecem igual agradecimento, por me alegrarem, renovar minhas energias e me trazer paz.

As minhas queridas, **Lúcia Rabesco e Raquel Morello Mellado** pelo carinho, e apesar do pouco tempo que passamos ultimamente, eu saber que estão sempre presentes em minha vida.

Aos familiares, **Márcia Coradini e Valéria Domingos** que torcem por minhas realizações.

Aos meus amigos da faculdade **Elsie Letícia Turini, Gabriel Victoriano dos Santos, Nádia Ghinelli Amôr e Sarah El Chamy Maluf**, por estarem sempre presentes de alguma forma me dando forças e torcendo por mim.

À **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** pelos conhecimentos compartilhados e ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, pelos conhecimentos e bom humor que contagia todo o departamento.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Bauru pelos conhecimentos que me foram passados durante as aulas das disciplinas da pós-graduação.

À **Suely Nonogaki**, do Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pelas sugestões e principalmente pela ajuda na realização da técnica imuno-histoquímica.

Ao **Prof. Dr. Fernando Soares** do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pelo auxílio na análise estatística desse trabalho.

Às funcionárias, **Maria Cristina Carrara Filippi** e **Marina dos Santos Corrêa**, por estarem sempre prontas para ajudar e por me receberem sempre com tanto carinho e atenção.

À funcionária, **Fátima Aparecida Silveira**, por toda dedicação e ajuda na realização desse trabalho. Obrigada pelo carinho e consideração que sempre teve comigo.

Aos **funcionários da Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por toda a eficácia.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por todos os esclarecimentos e eficiência.

À querida, **Natália Galvão Garcia**, pela nova amizade que surgiu, por ter compartilhado experiências e por ter se tornado uma parte importante nessa fase.

Ao querido, **Francisco Bárbara de Abreu Barros**, pelo bom humor companheirismo e por tornar meus dias aqui em Bauru, mais divertidos.

A **Laís Priscila de Santis**, pelo tempo que passamos juntas aqui, sempre com bom humor e por ter se tornado uma amiga.

Aos amigos e colegas do curso, **Agnes Assao, Ana Paula Madi, Alexandre Simões Garcia, Diego Maurício Bravo Calderón, Heliton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke, Kellen Cristine Tijoe, Pepe Burgos, Regina Barrachi e Taiane Gardizani**, pela boa convivência.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, diretora desta instituição.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

A **CAPES**, pelo auxílio pecuniário.

A **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa (Processo nº: 2012/13411-6), que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

“N3o deixe seus sonhos serem apenas sonhos.”
(Jack Johnson)

RESUMO

A moesina, uma das proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina), está envolvida nos processos de migração e invasão tumoral, participando da dinâmica do citoesqueleto na movimentação celular associada à ativação da GTPase Rho-A. O objetivo desse estudo foi avaliar a correlação da imunoexpressão da moesina e da Rho-A em tumores odontogênicos benignos, diagnosticados no Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP), no período de 1963 a 2009. Um total de 45 tumores odontogênicos benignos incluindo 7 ameloblastomas, 8 tumores odontogênicos adenomatóides, 19 tumores odontogênicos queratocísticos, 2 cistos odontogênicos ortoqueratinizantes, 1 tumor odontogênico epitelial calcificante, 2 fibromas ameloblásticos, 4 fibroodontomas ameloblásticos e 2 tumores odontogênicos císticos calcificantes, foram avaliados quanto a expressão imunohistoquímica da moesina e da Rho-A pelas células odontogênicas. A correlação entre as expressões membranosa e citoplasmática da moesina e da Rho-A pelo epitélio odontogênico nos diferentes tumores foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram uma forte expressão membranosa de moesina e citoplasmática de Rho-A em 66,7% e 62,2% dos tumores odontogênicos benignos, respectivamente. Houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão membranosa e citoplasmática da moesina ($p=0,000$) e de Rho-A ($p=0,048$) nos tumores. Entretanto, não houve correlação entre as expressões de moesina e de Rho-A nos tumores odontogênicos benignos. Estes resultados comprovam que a moesina e a Rho-A são fortemente expressas pelo epitélio odontogênico neoplásico e, sugerem que ambas proteínas provavelmente participam do crescimento e expansão local destes tumores odontogênicos benignos.

Palavras-chave: Tumores odontogênicos. Citoesqueleto. Movimentação celular.

ABSTRACT

Participation of moesin and Rho-A proteins in evolution of benign odontogenic tumors

The moesin, one of the proteins of the ERM complex (ezrin, radixin and moesin), is involved in the migration and tumor invasion processes participating in the cytoskeleton dynamics in cell movement associated with the activation of the GTPase Rho-A. The aim of this study was to evaluate the immunoexpression correlation of moesin and Rho-A in benign odontogenic tumors, diagnosed at the Bauru School of Dentistry Oral Pathology Biopsy Service of the University of São Paulo in the period of 1963-2009. A total of 45 benign odontogenic tumors including 7 ameloblastomas, 8 adenomatoid odontogenic tumors, 19 keratocystic odontogenic tumors, 2 orthokeratinized odontogenic cyst, 1 calcifying epithelial odontogenic tumor, 2 ameloblastic fibroma, 4 ameloblastic fibroodontoma and 2 calcifying cystic odontogenic tumors, were evaluated for immunohistochemical expression of moesin and Rho-A by odontogenic cells. The correlation between the membranous and cytoplasmic expression of moesin and Rho-A by the odontogenic epithelium in different tumors was evaluated by the Spearman correlation test, with a significance level of 5%. The results showed strong membranous expression of moesin and cytoplasmic expression of Rho-A in 66.7% and 62.2% of the benign odontogenic tumors, respectively. There was a positive and statistically significant correlation between membranous and cytoplasmic expression of moesin ($p=0.000$) and Rho-A ($p=0.048$) in the tumors. However, there was no correlation between the expression of moesin and Rho-A in benign odontogenic tumors. These results show that the moesin and Rho-A are strongly expressed by neoplastic odontogenic epithelium and suggest that both proteins probably participate in the growth and local expansion of these benign odontogenic tumors.

Keywords: Odontogenic Tumors. Cytoskeleton. Cell movement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Ativação das proteínas ERM e vias de sinalização. Proteínas ERM podem permanecer em estado inativo no citoplasma ou ligadas pelo seu domínio N- terminal na membrana celular e seu domínio C- terminal aos filamentos de actina. Uma vez ativadas, as proteínas ERM podem se ligar a diversos receptores transmembrana e iniciar uma variedade de vias de transdução de sinais. Fonte: Adaptado de Clucas, J.; Valderrama, F. (2014). ERM proteins in cancer progression (p. 268). Journal of Cell Science..... 33
- Figura 2 - Representação esquemática da ativação da GTPase Rho-A. No citoplasma a moesina esta inativa em forma de monômero ou heterodímero. Quando ativada, por moléculas como a ROCK, a moesina pode se ligar a proteínas transmembrana pelo seu domínio N-terminal e, o domínio C-terminal se liga a filamentos de actina, promovendo a manutenção da polaridade e forma da célula. Para que a informação de ROCK seja transduzida, a Rho-A precisa ser ativada. No seu estado inativo, a região C-terminal de ROCK atua como uma região auto-inibitória, havendo a ligação de GTP Rho-ativa com o domínio de ligação de Rho (RBD) a regulação negativa é interrompida, ativando assim a quinase. ROCK, transferindo a informação para o núcleo da célula, ativando fatores de transcrição envolvidos na proliferação, mobilidade celular e adesão célula-célula..... 39
- Figura 3 - Imunoexpressão da moesina nos ameloblastomas. Observa-se a forte expressão membranosa e citoplasmática da proteína nas células periféricas semelhantes à pré-ameloblastos e centrais do epitélio odontogênico tumoral. Os vasos sanguíneos exibiram marcação positiva da moesina (A, B, C e D, IHQ 40X)..... 67
- Figura 4 - Imunoexpressão da Rho-A nos ameloblastomas, caracterizada por uma fraca expressão membranosa e citoplasmática nas células periféricas e centrais do epitélio odontogênico tumoral. Os vasos sanguíneos também exibiram imunopositividade para a Rho-A (A, B, C e D IHQ 40X)..... 69

Figura 5 -	Imunoexpressão da moesina (A e B) e da Rho-A (C e D) nos tumores odontogênicos adenomatóides. Em A e B, observa-se uma forte expressão membranosa e uma fraca expressão citoplasmática da moesina. Em C e D, observa-se a predominância de uma forte expressão da Rho-A tanto na membrana quanto no citoplasma das células dos tumores odontogênicos adenomatóides (A, B, C e D, IHQ 40X).....	73
Figura 6 -	Imunoexpressão da moesina nos tumores odontogênicos queratocísticos. Observa-se a forte expressão da moesina principalmente na membrana e fraca expressão no citoplasma das células da camada basal do epitélio odontogênico, e dos vasos sanguíneos presentes na cápsula fibrosa (A, B, C e D, IHQ 40X).....	77
Figura 7 -	Características microscópicas da imunoexpressão da Rho-A nos tumores odontogênicos queratocísticos, com predominância da forte expressão da proteína em todas as camadas de células epiteliais (A, B, C e D, IHQ 40X).....	79
Figura 8 -	Características microscópicas da imunoexpressão da moesina e Rho-A nos cistos odontogênicos ortoqueratinizados. Nas imagens A e B, se observa a fraca expressão da moesina na membrana e no citoplasma na camada basal de células epiteliais odontogênicas. Em C e D, a expressão da Rho-A foi fraca na membrana e no citoplasma se expressando em toda a camada de células epiteliais do cistos odontogênicos ortoqueratinizados (A, B, C e D, IHQ 40X).....	83
Figura 9 -	Imunoexpressão da moesina e da Rho-A no tumor odontogênico epitelial calcificante. Em A e B, observa-se que a expressão da moesina foi fraca para membrana e citoplasma nas células epiteliais odontogênicas tumorais. Em C e D, é observada a forte expressão da Rho-A na membrana e citoplasma do epitélio odontogênico. As estruturas calcificadas exibiram fraca ou ausente marcação para as proteínas moesina e Rho-A (A, B, C e D, IHQ 40X)	87

- Figura 10 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A nos fibromas ameloblásticos. Observa-se que houve uma forte expressão da moesina (A e B) e da Rho-A (C e D) na membrana e uma fraca expressão citoplasmática nas células epiteliais periféricas semelhantes à ameloblastos. Nas células semelhantes à papila dentária e nas células endoteliais de vasos sanguíneos também foi observado expressão da moesina (A e B IHQ 20X; C e D IHQ 40X)..... 91
- Figura 11 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A nos fibroodontomas ameloblásticos. Em A e B, a expressão da moesina foi forte para a membrana e citoplasma das células dos ameloblastos secretores e reduzidos. Em C e D, a expressão da Rho-A foi forte no citoplasma dos ameloblastos secretores e reduzidos e, na membrana a expressão foi fraca nas células dos ameloblastos secretores e reduzidos dos fibroodontomas ameloblásticos. Nas áreas mineralizadas e núcleo das células, a expressão não foi significativa para as proteínas. (A, B, C e D IHQ 40X)..... 95
- Figura 12 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A no tumor odontogênico cístico calcificante. Em A e B, observa-se a forte expressão da moesina nas células do epitélio odontogênico na membrana e citoplasma, nas células fantasmas (seta) a expressão foi fraca. Em C e D, a expressão da Rho-A foi fraca na membrana nas células do epitélio odontogênico. No citoplasma, a expressão foi forte em um tumor (A, IHQ 20X, B, C e D, IHQ 40X)..... 99

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão de moesina membranosa e citoplasmática nos 45 tumores odontogênicos benignos avaliados..... 102

Gráfico 2 - Expressão de Rho-A membranosa e citoplasmática nos 45 tumores odontogênicos benignos avaliados..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos tumores odontogênicos benignos utilizados nesse estudo. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 1963 a 2009.....	61
Tabela 2 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes com tumores odontogênicos benignos epiteliais. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, 1963 a 2009....	64
Tabela 3 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células periféricas dos 7 ameloblastomas. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	66
Tabela 4 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 8 tumores odontogênicos adenomatóides. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	71
Tabela 5 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 19 tumores odontogênicos queratocísticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	75
Tabela 6 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 2 cistos odontogênicos ortoqueratinizados. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	81
Tabela 7 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A no tumor odontogênico epitelial calcificante. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	85
Tabela 8 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 2 fibromas ameloblásticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	89
Tabela 9 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 4 fibroodontomas ameloblásticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	93
Tabela 10 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 2 tumores odontogênicos císticos calcificantes. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.....	97
Tabela 11 - Distribuição da expressão membranosa e citoplasmática da moesina nos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.....	102

Tabela 12 - Distribuição da expressão membranosa e citoplasmática da Rho-A nos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.....	103
Tabela 13 - Correlação entre as expressões membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
≤	menor ou igual
=	igual
µm	Micrometro
AM	Ameloblastoma
BSA	Soro albumina bovino
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COO	Cisto odontogênico ortoqueratinizado
ERM	Ezrina, radixina, moesina
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fibroma ameloblástico
FOA	Fibroodontoma ameloblástico
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
h	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
NaN ₃	Azida sódica
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimol
p	Valor de teste estatístico
PBS	Phosphate buffered saline (solução salina fosfatada tamponada)
pH	Concentração hidrogeniônica
Rho-A	GTPase Rho-A
RNA	Ácido ribonucleico
ROCK	Rho quinase ROCK
SP	Estado de São Paulo
TOA	Tumor odontogênico adenomatóide
TOCC	Tumor odontogênico cístico calcificante
TOEC	Tumor odontogênico epitelial calcificante
TOQ	Tumor odontogênico queratocístico
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	PROTEÍNAS ERM	29
2.2	PROTEÍNA MOESINA	31
2.2.1	Proteína moesina no câncer de boca	35
2.3	GTPase Rho-A	36
2.3.1	Participação da Rho-A no câncer de boca	41
2.3.2	Participação da Rho-A no epitélio odontogênico	41
2.4	INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA MOESINA E A GTPase Rho-A	43
3	PROPOSIÇÃO	45
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	51
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	52
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	52
4.3.1	Hematoxilina e Eosina	52
4.3.2	Técnica imuno-histoquímica	53
4.3.3	Avaliação imuno-histoquímica	55
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4.5	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	56
4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	57
5	RESULTADOS	59
5.1	CASUÍSTICA	61

5.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	62
5.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	65
5.3.1	Expressão imuno-histoquímica da moesina e Rho-A nos tumores odontogênicos epiteliais benignos	65
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	101
5.4.1	Correlação da expressão da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos	101
6	DISCUSSÃO	105
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXO	125

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As proteínas da família ERM (ezrina, radixin, moesina), que atuam como ligantes entre a membrana plasmática e o citoesqueleto, vem sendo alvo de diversos estudos, buscando entender suas participações no epitélio normal e neoplásico. (LANKES et al., 1988; ICHIKAWA et al., 1998; MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; KOBAYASHI et al., 2003; MARTÍN-VILLAR et al., 2006). A atuação dessa família de proteínas tem destaque em diversas funções celulares fisiológicas incluindo a manutenção da morfologia e adesão, a migração, a endocitose, a exocitose, além de sua participação nas vias de sinalização em resposta a estímulos extracelulares (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; LOUVET-VALLÉE, 2000). A importância das proteínas ERM na comunicação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto celular, no processo de manutenção da polaridade das células e da adesão célula-célula, está bem estabelecido (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; LOUVET-VALLÉE, 2000; HAYNES et al., 2011).

Investigações recentes mostraram que membros da família ERM, especialmente a moesina, podem interagir com as proteínas transmembranas CD44 e podoplanina na manutenção e remodelação do citoesqueleto (TSUKITA et al., 1994; LOUVET-VALLÉE, 2000; MARTÍN-VILLAR et al., 2006; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013). Assim sendo, a frequente expressão da moesina na membrana de células epiteliais da pele e da mucosa oral, bem como em células endoteliais, é associada ao seu papel no controle do citoesqueleto (ICHIKAWA et al., 1998; KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; HIRATA et al., 2012). Particularmente, no epitélio da mucosa oral normal foi demonstrado que a expressão de moesina ocorre predominantemente na membrana celular com maior intensidade na camada basal, diminuindo sua marcação para as camadas superiores do epitélio, o que foi relacionado ao processo de proliferação deste epitélio (KOBAYASHI et al., 2003).

As competências das proteínas ERM nas diversas funções celulares, as colocam também em evidência na carcinogênese, principalmente no processo de

progressão tumoral e metástase, onde a expressão dessas moléculas vem sendo investigadas (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; SCHLECHT et al., 2012; WANG et al., 2012; BARROS, 2014). Algumas evidências mostraram que o aumento da expressão de moesina em tumores malignos está associado com uma evolução desfavorável e um pior prognóstico para os pacientes (BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; WANG et al., 2012). Outros estudos envolvendo a atuação da moesina em metástase demonstraram que sua marcação citoplasmática foi mais evidente em relação à membrana, como visto em carcinomas de células escamosas, carcinoma de mama e colo de útero, sendo este padrão de expressão relacionado com um fenótipo mais agressivo (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; HE et al., 2010; WANG et al., 2012; BARROS, 2014).

A participação da moesina nos processos de migração e invasão celular, investigados principalmente em células neoplásicas, foi relacionada à via de sinalização intracelular com envolvimento da GTPase Rho-A (MARTÍN-VILLAR et al., 2006). Além de sua participação na remodelação do citoesqueleto celular, alguns estudos mostraram, *in vitro*, que a ativação de proteínas transmembranas como a podoplanina e o CD44, recrutavam proteínas ERM para ativarem vias de sinalização intracelulares a partir da GTPase Rho-A (MARTÍN-VILLAR et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007). Um estudo interessante de Martín-Villar e colaboradores 2006, em células epiteliais renais, mostrou que a proteína transmembrana podoplanina necessitava recrutar as proteínas ERM para ativar a Rho-A e, que o aumento da atividade de Rho-A induzia a fosforilação das ERM mediada pelo efector de Rho-A, ROCK, mantendo estas proteínas em uma conformação ativa e aberta, permitindo assim a transição epitélio mesenquimal e a maior migração e invasão das células neoplásicas. A GTPase Rho-A, uma das proteínas pertencentes à superfamília Ras, coordena a regularização do citoesqueleto de actina, na qual ocorre pela comunicação com o efector serina/treonina quinase, ROCK (HALL, 1998; SPIERING; HODGSON, 2011; O'CONNOR; CHEN, 2013). A Rho-A está presente no citoplasma das células oscilando em um estado inativo e ativo, a ativação ocorre quando a GTP Rho-ativa se liga ao domínio de ligação de Rho (RBD) e libera seu domínio C-terminal permitindo a interação com a moesina promovendo assim as

alterações no citoesqueleto (HALL, 1998; SPIERING; HODGSON, 2011; HALL, 2012; O'CONNOR; CHEN, 2013). Além disso, a partir de seu efector ROCK, a ativação da Rho-A pode induzir a transdução de sinais para o núcleo da célula, promovendo a proliferação, a mobilidade celular e a adesão célula-célula (HALL, 1998; SPIERING; HODGSON, 2011; HALL, 2012; O'CONNOR; CHEN, 2013).

Como a GTPase Rho-A interage com o citoesqueleto de actina em processos fisiológicos (SPIERING; HODGSON, 2011; HALL, 2012; O'CONNOR; CHEN, 2013), alguns estudos avaliaram sua expressão em neoplasias malignas de mama e de cabeça e pescoço (ABRAHAM et. al, 2001; FRITZ et. al, 2002), confirmando que a Rho-A está associada a um pior prognóstico. A participação da Rho-A também foi estudada na odontogênese (BIZ et al., 2010; XUE et al., 2013), onde a GTPase Rho-A auxilia na diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos (BIZ et al., 2010) e está associada a regulação do citoesqueleto de actina nos ameloblastos, contribuindo no processo de formação do esmalte dentário (XUE et al., 2013).

Como foi descrito anteriormente neste capítulo, a proteína moesina participa com a Rho-A em vias de sinalização importantes para execução de muitas das funções das células epiteliais normais e neoplásicas (MARTÍN-VILLAR et al., 2006; FERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2011), entretanto, a investigação conjunta destas proteínas em tumores odontogênicos benignos como proposto neste trabalho, não foi encontrada na literatura científica. Assim, a análise da expressão concomitante de moesina e Rho-A no epitélio odontogênico poderá ajudar na compreensão do processo de expansão e invasão local dos diferentes tumores odontogênicos benignos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNAS ERM

As proteínas ezrina, radixina e moesina, as ERM, são parte de uma superfamília de proteínas que participam em várias funções fisiológicas incluindo algumas vias de sinalização celular, e desempenham um papel crucial na morfologia, adesão e mobilidade celular, ou seja, executam um importante papel na organização do córtex celular (LANKES et al., 1988; MADAN, 2006; WANG et al., 2012; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013).

Durante a evolução, estas proteínas ERM foram altamente conservadas nos vertebrados (ARPIN, 2011). As proteínas ERM de diversas espécies compartilham, evolutivamente, da mesma organização estrutural, apresentando um domínio FERM, situado na região N-terminal, associado a proteínas de membrana e outro chamado C-terminal que se liga aos filamentos de actina, sendo estes dois domínios ligados por uma região α -helicoidal. Desta forma as proteínas ERM se conectam com as proteínas da membrana celular, do citoesqueleto de actina e com moléculas de sinalização intracelular (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; PEARSON et al., 2000; MADAN et al., 2006; ARPIN, 2011; CLUCAS; VALDERRAMA, 2014). Particularmente, as alterações que ocorrem no citoesqueleto celular são responsáveis por processos fisiológicos como a movimentação, a migração, a proliferação e em condições patológicas, a metástase de células malignas (BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; HE et al., 2010; SCHLECHT et al., 2012; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013). Portanto, estas proteínas ERM atuam, conjuntamente, na elaboração das respostas celulares executadas pela interação membrana-citoesqueleto (ARPIN et al., 2011).

Em condições fisiológicas, as proteínas ERM permanecem em um estado dormente no citoplasma e em estado funcional ativo na membrana das diferentes células (PEARSON et al., 2000; MADAN et al., 2006; ARPIN et al., 2011; YOGESHA et al., 2011). Como as ERM permanecem em estado inativo, requerem ativação para desempenhar suas funções (PEARSON et al., 2000; LOUVET-VALLÉE, 2000; ARPIN et al., 2011). O estado inativo das ERM é observado como uma

autoassociação de seus domínios, onde ela pode se ligar a ela mesma, formando um monômero ou com outra molécula de ERM, formando um heterodímero (FIGURA 1). Essa conformação fechada (inativa) impede a liberação dos domínios C-terminal e N-terminal, descritos anteriormente neste capítulo (NEISCH; FEHON, 2011; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013). A ativação das ERM acontece quando existe a fosforilação da região FERM, a partir de um resíduo de treonina conservado dentro do domínio C-terminal liberando os domínios N-terminal e C-terminal e, conseqüentemente, dessa forma ocorre a interação com outras moléculas a partir do domínio N-terminal. Essa interação se dá com diversos receptores transmembrana, tornando assim possível o processo de transdução de sinais, por meio do domínio C-terminal, para sua participação na adesão, na proliferação celular, na migração e na invasão celular (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; NEISCH; FEHON, 2011; CLUCAS; VALDERRAMA, 2014), como esquematicamente ilustrado na Figura 1.

A partir do conhecimento da participação destas proteínas ERM nos processos de invasão tumoral, surgiu o interesse em investigar o comportamento dessas proteínas nos tumores odontogênicos benignos, que embora não causam metástase, possuem a capacidade de crescer e invadir localmente (BARNES et al., 2005).

Os estudos sobre as proteínas ERM em tumores odontogênicos benignos são escassos, foram recentemente publicados e envolvem principalmente a proteína ezrina (OLIVEIRA et al., 2014; COSTA et al., 2015). Em 2014, Oliveira et al investigaram a expressão de ezrina e podoplanina nos tumores odontogênicos queratocísticos e demonstraram uma forte expressão citoplasmática de ezrina e membranosa de podoplanina na camada basal do epitélio odontogênico tumoral. Além disso, a expressão de ezrina membranosa e citoplasmática foi observada em todas as camadas supra-basais do epitélio odontogênico destes tumores. Os autores sugeriram que estas proteínas poderiam contribuir para o crescimento expansivo e a invasão local dos tumores odontogênicos queratocísticos.

Também Costa e colaboradores 2015, investigaram a associação da ezrina e podoplanina no epitélio de outro tipo de tumor odontogênico benigno, o ameloblastoma. Os autores detectaram, nas células periféricas dos ameloblastomas, uma forte expressão de podoplanina e uma expressão citoplasmática e membranosa de ezrina na grande maioria destes tumores. Sugeriu então, um papel sinérgico de ambas as proteínas na promoção da atividade do citoesqueleto de actina,

contribuindo assim, para o crescimento local dos ameloblastomas. A investigação de outros membros da família ERM, como a proteína moesina e radixina, em tumores odontogênicos benignos não foram encontrados na literatura inglesa.

2.2 PROTEÍNA MOESINA

Uma das proteínas pertencente à família ERM e que desempenha um importante papel na movimentação celular é a moesina. Esta proteína foi isolada pela primeira vez do músculo liso do útero bovino, com peso molecular de 78kDa, sendo caracterizada como um possível receptor de heparina (LANKES et al., 1988). A moesina se expressa em diversas células do corpo humano, sendo abundante no pulmão e baço e apresenta baixos níveis no rim (KOBAYASHI et al., 2003). Também se observou a presença da moesina em células gástricas, fibroblastos e células endoteliais (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; JUNG, 2013).

Em tecidos normais, como na pele, a expressão da moesina se destacou fortemente na camada basal do epitélio, tanto no citoplasma, quanto na membrana da célula, diminuindo sua expressão nas camadas epiteliais superiores (ICHIKAWA et al., 1998). Na mucosa bucal normal, em estudo realizado por Kobayashi et al. (2003), a expressão da proteína moesina também foi maior na membrana celular e predominante na camada basal do epitélio.

A moesina participa efetivamente no processo de remodelação do citoesqueleto celular, o que reflete nos processos de movimentação celular (LOUVET-VALLÉE, 2000; MARTÍN-VILLAR et al., 2006; NEISCH; FEHON, 2011). Quando ativada, a molécula de moesina interage com diversas proteínas transmembrana, como a podoplanina e o CD44, desencadeando assim as vias de ativação do citoesqueleto (BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004; LOUVET-VALLÉE, 2000; ARPIN et al., 2011). Dentre estas vias de sinalização que regulam a dinâmica da movimentação celular, com participação da moesina, destaca-se a via da GTPase Rho-A (LOUVET-VALLÉE, 2000; LALLEMAND; ARPIN, 2009; HE et al., 2010; ARPIN et al., 2011). A via da GTPase Rho-A interage com a moesina, fazendo com que esta proteína seja recrutada, quando na formação de complexos com proteínas transmembrana, que se ligam a Rho-A, ativando assim suas funções no citoesqueleto (HIRAO et al., 1996; MATSUI et al., 1998; MARTÍN-VILLAR et al., 2006).

No câncer, a participação da moesina tem sido investigada no processo de migração e invasão celular, sendo sua expressão pelas células malignas correlacionada em alguns estudos com um prognóstico desfavorável para os pacientes (BELBIN et al., 2005; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; CUI et al., 2008; SCHLECHT et al., 2012). No processo de invasão das células malignas, a moesina assim como as outras proteínas da família ERM, estão envolvidas na transição epitelial mesenquimal (HAYNES et al., 2011; WANG et al., 2012). Neste processo de transição epitelial-mesenquimal, as células epiteliais perdem sua polaridade e adesão célula-célula, permitindo a ruptura da camada basal do epitélio e a invasão da matriz extracelular. Essas células epiteliais passam a expressar marcadores mesenquimais distintos e alteram sua morfologia devido a mudanças no citoesqueleto de actina (MARTÍN-VILLAR et al., 2006; CLUCAS; VALDERRAMA, 2014; LIM; THIERY, 2012).

Nakamura e Ozawa (1997) investigaram em tecidos de origem odontogênica, as expressões das proteínas CD44 e da família ERM, incluindo a moesina, no órgão do esmalte em incisivos de rato. Foi realizada criosecção dos dentes para a análise microscópica. Os resultados mostraram que para as outras proteínas da família ERM, houve expressão significativa no estrato intermediário e na camada de células papilares, sugerindo que CD44-ezrina-radixina estão envolvidas na interação célula-célula entre pré-ameloblastos e o estrato intermediário, e na organização do citoesqueleto das células do estrato intermediário e da camada papilar. Contudo verificou-se que nenhuma atividade aparente da proteína moesina foi observada nas células do estrato intermediário e na camada de células papilares.

Em 2011, Haynes et al., utilizando células epiteliais de glândula mamária de rato, mostraram que, na transição epitélio-mesenquimal, os filamentos de actina se remodelam e que depende de uma maior expressão da moesina. Quando na supressão desta proteína, a movimentação do citoesqueleto de actina foi reduzida, diminuindo a capacidade invasiva das células. Concluíram então que a moesina promove a EMT, regulando a adesão celular e mudança nos filamentos de actina.

Wang et al. (2012), estudaram o envolvimento da moesina na transição epitelial-mesenquimal (EMT) no câncer de mama a partir de amostras de tecidos do carcinoma mamário. Os resultados mostraram que a expressão da moesina foi positiva nas células do carcinoma mamário, sugerindo assim uma associação desta proteína com a EMT na progressão tumoral.

Figura 1 - Ativação das proteínas ERM e vias de sinalização. Proteínas ERM podem permanecer em estado inativo como monômero ou heterodímero no citoplasma ou ligadas pelo seu domínio N- terminal na membrana celular e seu domínio C- terminal aos filamentos de actina. Uma vez ativadas, as proteínas ERM podem se ligar a diversos receptores transmembrana e iniciar uma variedade de vias de transdução de sinais. Fonte: Adaptado de Clucas, J.; Valderrama, F. (2014). ERM proteins in cancer progression (p. 268). Journal of Cell Science.

2.2.1 Proteína moesina no câncer de boca

Alguns trabalhos tem investigado a expressão da moesina no câncer de boca. Em 2004, Kobayashi et al., também investigou a distribuição da moesina em carcinoma de células escamosas oral. Realizada a comparação com epitélio oral normal e carcinomas orais primários e com metástase linfonodal. O padrão de imunoexpressão foi predominantemente membranoso para o epitélio da mucosa oral normal. Os tumores primários exibiram padrões membranoso ou citoplasmático de distribuição da moesina, entretanto a maioria dos tumores com metástase em linfonodos mostrou o padrão de distribuição citoplasmática. Os resultados demonstraram que as células tumorais com expressão citoplasmática da moesina apresentam uma maior incidência de metástase linfática do que as células tumorais com expressão membranosa da moesina.

Também Belbin et al. (2005), buscou identificar genes que são superexpressos durante a progressão tumoral em carcinoma de células escamosas da cavidade oral a partir da expressão da moesina. Dessa forma, foram avaliadas em microarranjo de tecidos em epitélio normal de língua, lesões epiteliais displásicas de carcinoma de células escamosas e com metástase linfonodal. Os resultados mostraram que a expressão da moesina foi significativa para os carcinomas, exibindo uma forte expressão na membrana e citoplasma das células neoplásicas, quando comparadas com o epitélio normal de língua, que exibiu fraca ou negativa expressão da proteína na camada basal. Concluiu-se que a alta expressão de moesina está relacionada com a progressão tumoral de carcinomas de células escamosas de boca.

Em 2012, um estudo realizado por Kinoshita et al. teve como objetivo de avaliar o micro-RNA 133a, um supressor de tumor, e como este poderia regular a expressão da moesina em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Ao silenciar a expressão da moesina houve uma inibição da proliferação, migração e invasão celular, concluindo que a proteína moesina é regulada pelo micro-RNA 133a e exerce um papel significativo nos processos de proliferação, migração e invasão celular.

Recentemente Barros (2014), avaliou a expressão da moesina no carcinoma espinocelular de boca (CEC) de 84 pacientes, no front de invasão tumoral e suas associações com a evolução clínica e com o prognóstico dos pacientes. Os

resultados mostraram que houve expressão da moesina pelas células malignas na região do front de invasão tumoral. A forte expressão da moesina pelas células malignas constituiu um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes com CEC de boca e estadiamento clínico II e III. Os autores sugeriram que a expressão de moesina, pelas células malignas juntamente com o comprometimento linfonodal pode contribuir para determinar os pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentam um pior prognóstico.

2.3 GTPase RHO-A

Os integrantes da família Rho (Ras homólogo) GTPases são moléculas cuja função é transmitir sinais intracelulares, iniciados a partir de estímulos extracelulares. Atuam como “interruptores” moleculares, interagindo com diversos efetores para propagar a transdução de sinais. Sob condições normais, Rho GTPases estão envolvidas em diversas funções celulares incluindo reorganização do citoesqueleto, sobrevivência celular, proliferação, adesão, migração, polaridade, divisão celular e tráfico vesicular (RIDLEY; HALL., 1992; HALL, 1998; CHI et al., 2013; ALAN; LUNDQUIST, 2013).

As primeiras Rho GTPases foram descobertas em 1985 a partir de análises iniciais em gânglios abdominais do molusco do gênero *Aplysia*, no qual possui semelhança com hormônios peptídicos de mamíferos, mostrando homologia com proteínas codificadas pelos genes Rho em humanos (MADAULE; AXEL, 1985).

O genoma dos mamíferos codificam aproximadamente 20 Rho GTPases (MADAULE; AXEL, 1985; HALL, 2012). O subgrupo Rho, incluindo Rho-A, Rho-B e Rho-C, compartilham cerca de 85% da sequência de aminoácidos, onde a principal diferença é encontrada na região C-terminal dessas proteínas, o domínio N-terminal contém alguns dos aminoácidos envolvidos na ligação e hidrólise de GTP (O'CONNOR; CHEN, 2013). Entretanto, a Rho-A é a mais estudada desse grupo acerca dos seus efeitos no citoesqueleto de actina.

Como todos os membros da superfamília das Rho-GTPases, elas oscilam entre um estado inativo GDP-ligante e outro ativo GTP-ligante. Em seu estado GTP ativo, a GTPase Rho-A adquire uma alteração conformacional que permite interagir com seus efetores e assim propagar os sinais na célula (KARLSSON et al., 2009;

CHIRCOP, 2014; ZERGERS; FRIEDL, 2014). Para que a GTPase Rho-A seja ativada, ela precisa de um mediador para exercer sua função no citoesqueleto de actina (CHI et al., 2013; O'CONNOR; CHEN, 2013). A Rho-quinase (ROCK) é uma quinase serina/treonina, que pertence à família de proteínas quinases, existindo em duas isoformas, ROCK1 e ROCK2 (SCHOFIELD; BERNARD, 2013; JULIAN; OLSON, 2014). Rho-quinase, originalmente identificada como um efetor das GTPases Rho, desempenha um papel importante na mediação de rearranjos do citoesqueleto ligado juntamente com GTPase Rho em efeito cascata. A GTPase Rho-A, é a mais bem caracterizada reguladora de ROCK (JULIAN; OLSON, 2014).

A estrutura do efetor Rho-quinase (ROCK) das Rho GTPases consiste de uma região C-terminal, um domínio central espiralado e outro N-terminal. O modo de ativação da quinase ROCK ocorre como apresentado na Figura 2. Em seu estado inativo, a região C-terminal de ROCK atua como uma região autoinibitória, havendo a ligação de GTP Rho-ativa com o domínio de ligação de Rho (RBD) a regulação negativa é interrompida, ativando assim a quinase ROCK (AMANO et al., 2010; JULIAN; OLSON, 2014), transferindo a informação para o núcleo da célula, ativando fatores de transcrição envolvidos na proliferação, mobilidade celular e adesão célula-célula.

Figura 2 - Representação esquemática da ativação da GTPase Rho-A. No citoplasma a moesina esta inativa em forma de monômero ou heterodímero. Quando ativada, por moléculas como a ROCK, a moesina pode se ligar a proteínas transmembrana pelo seu domínio N-terminal e, o domínio C-terminal se liga a filamentos de actina, promovendo a manutenção da polaridade e forma da célula. Para que a informação de ROCK seja transduzida, a Rho-A precisa ser ativada. No seu estado inativo, a região C-terminal de ROCK atua como uma região auto-inibitória, havendo a ligação de GTP Rho-ativa com o domínio de ligação de Rho (RBD) a regulação negativa é interrompida, ativando assim a quinase. ROCK, transferindo a informação para o núcleo da célula, ativando fatores de transcrição envolvidos na proliferação, mobilidade celular e adesão célula-célula.

2.3.1 Participação da Rho-A no câncer de boca

A GTPase Rho-A contribui em processos fisiológicos normais, mas também vem sendo encontrada colaborando em processos patológicos, como migração de células neoplásicas, invasão, evasão da apoptose, angiogênese e metástase (VEGA; RIDLEY, 2008; MERAJVER; USMANI, 2006; KARLSSON et al., 2009).

No câncer de cabeça e pescoço, Abraham et al. (2001), estudaram a expressão de Rho-A a partir de uma análise imuno-histoquímica. Foram avaliados queratinócitos humanos normais e carcinoma de células escamosas de língua. Os resultados mostraram que nos queratinócitos normais, a expressão da GTPase Rho-A não foi significativamente observada. Contudo, o mesmo para os carcinomas de células escamosas de língua não aconteceu, onde exibiu uma alta expressão de Rho-A. Como controle interno, também foram observadas células normalmente encontradas na motilidade, os macrófagos, que coraram, enquanto que o endotélio não. Assim, concluíram que a GTPase Rho-A está relacionada a motilidade, sendo superexpressa em tecido neoplásico, auxiliando no processo de motilidade celular.

2.3.2 Participação da Rho-A no epitélio odontogênico

Em muitos tipos celulares, as alterações do citoesqueleto são reguladas por proteínas de ligação Rho GTP (BIZ et al., 2010; XUE et al., 2013). Como visto na odontogênese, há atividade da GTPase Rho-A no processo fisiológico normal no desenvolvimento do dente na fase de germe. Morfogênese e citodiferenciação são processos distintos no desenvolvimento dos dentes. O citoesqueleto é essencial para ambos os processos, a ser regulado por GTPases Rho. Biz et al. (2010), verificaram a expressão, distribuição e o papel da GTPase Rho-A em ameloblastos e odontoblastos durante o desenvolvimento dentário. Em conclusão, o estudo demonstrou que a GTPase Rho-A é uniformemente distribuída em ameloblastos e odontoblastos, sendo expressa durante o desenvolvimento dentário. Portanto, a Rho-A pode ter um papel especial na função de ameloblastos e odontoblastos, quando no estágio de citodiferenciação.

No estudo realizado por Xue et al. (2013), foi avaliado como a Rho-A participa no processo de amelogenese. Durante a formação do esmalte, os ameloblastos, células que produzem as proteínas do esmalte como a amelogenina, passam por mudanças no seu citoesqueleto de actina, onde o nível de Rho-A é aumentado. Dessa forma, foram utilizados germes de dentes molares de camundongos transgênicos, que expressam um transgene negativo para Rho-A em ameloblastos, e em germes de dentes molares de camundongos do tipo selvagem. Concluiu-se que, nos germes de dentes molares modificados, a produção da amelogenina foi reduzida, causando uma inibição na atividade da Rho-A e consequentemente um déficit na função dos ameloblastos, responsáveis pela produção normal do esmalte.

Com relação aos tumores odontogênicos benignos, poucos trabalhos são encontrados sobre a expressão de Rho-A. Modolo et al. (2012), realizaram um trabalho avaliando a expressão de Rho-A em ameloblastomas, um tipo de tumor odontogênico benigno, de característica localmente agressiva. Foram avaliados ameloblastoma sólido, incluindo subtipo folicular e plexiforme e também ameloblastoma unicístico (variante luminal). As células basais dos subtipos folicular e plexiforme mostraram coloração fraca ou moderada e o número de células centrais positivas foi maior que as células basais. No entanto, não houve diferença de expressão entre as células basais ou centrais no ameloblastoma unicístico. Na comparação entre o ameloblastoma sólido e unicístico, foi observado que na variante unicística o número de células positivas era maior. Assim, a Rho-A mostrou uma maior expressão no número de células e intensidade nas células centrais dos ameloblastomas, concluindo que essa molécula pode estar envolvida na determinação do fenótipo de células epiteliais neoplásicas do ameloblastoma, bem como na variante e determinação do subtipo, participando também nos mecanismos de invasão de variação sólida e, consequentemente, influenciando o prognóstico da doença.

Apesar dos diversos estudos acerca da atuação da GTPase Rho-A em câncer (FRITZ; JUST; KAINA, 1999; FRITZ et al., 2002; VEGA; RIDLEY, 2008; KARLSSON et al., 2009), não tem sido encontrados, na literatura, maiores respostas sobre a participação da Rho-A no desenvolvimento dos tumores odontogênicos benignos.

2.4 INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA MOESINA E A GTPase Rho-A

Como visto anteriormente neste capítulo, a proteína moesina e a Rho-A são importantes no desenvolvimento de diversos processos celulares tanto em condições fisiológicas como patológicas. Foi demonstrado também que a via de sinalização intracelular com participação da moesina depende da ativação da GTPase Rho-A (HIRAO et al., 1996; MATSUI et al., 1998; MARTÍN-VILLAR et al., 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre o real papel dessas moléculas, individualmente ou conjuntamente, no processo de crescimento e expansão dos tumores odontogênicos benignos.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise dos tumores odontogênicos benignos com ou sem ectomesênquima, propõe-se:

- verificar a expressão imuno-histoquímica da moesina e da Rho-A no epitélio odontogênico;
- investigar a possível associação da imunomarcagem destas duas proteínas nestes tumores.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra de estudo foi selecionada a partir de tumores odontogênicos benignos localizados nos ossos maxilares, diagnosticados no período de 1963 a 2009, pelo serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia – Área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. Os critérios para a seleção da amostra foram:

- diagnóstico de tumor odontogênico benigno, classificados como epitelial sem ectomesênquima ou epitelial com ectomesênquima, localizados nos ossos maxilares, com base nos aspectos microscópicos em colorações de rotina, seguindo-se a classificação recomendada pela Organização Mundial da Saúde em 2005 (BARNES et al., 2005);
- disponibilidade de um corte microscópico adequado e/ou do bloco de parafina para a confecção de novos cortes do tumor odontogênico a ser analisado;
- disponibilidade de informações clínicas relevantes à pesquisa.

Foram estudados os seguintes tumores odontogênicos benignos:

Epiteliais sem ectomesênquima:

- 7 Ameloblastomas;
- 8 Tumores odontogênicos adenomatóides;
- 19 Tumores odontogênicos queratocísticos;
- 2 Cisto odontogênico ortoqueratinizado
- 1 Tumor odontogênico epitelial calcificante;

Epiteliais com ectomesênquima:

- 2 Fibromas ameloblásticos;
- 4 Fibroodontomas ameloblásticos;
- 2 Tumores odontogênicos císticos calcificantes.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas, referentes aos pacientes, foram obtidas a partir das requisições de registro das biópsias e das fichas com as informações clínicas dos pacientes pertencentes ao Departamento de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. Estes registros incluíram, clinicamente, a identificação do paciente, o gênero, a idade, a ocupação quando presente e, microscopicamente, o diagnóstico da biópsia.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA**4.3.1 Hematoxilina e Eosina**

Foi realizado em hematoxilina e eosina a reavaliação da microscópica óptica de todos os tumores odontogênicos. Foram realizadas por dois examinadores (P.N.A e D.T.O), para confirmação do diagnóstico e identificação das características histopatológicas típicas destas lesões. No presente estudo, os tumores odontogênicos queratocísticos com epitélio apresentando camada granulosa evidenciada e ortoqueratina, foram classificados como cisto odontogênico ortoqueratinizado, seguindo a última classificação histológica de Tumores Odontogênicos da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al, 2005).

4.3.2 Técnica imuno-histoquímica

As marcações imuno-histoquímicas realizadas nessa pesquisa seguiram o protocolo de reações utilizado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, com diluições dos anticorpos primários previamente padronizados. A técnica está descrita em detalhes a seguir:

- Desparafinização dos cortes microscópicos dos tumores odontogênicos benignos de 3µm de espessura em estufa a 60°C por 24 horas;
- Hidratação dos cortes microscópicos dos tumores odontogênicos:
 - Xilol a 60°C por 20 minutos;
 - Xilol a temperatura ambiente por 20 minutos;
 - Etanol 100% por 30 segundos;
 - Etanol 85% por 30 segundos e;
 - Etanol 70% por 30 segundos.
- Lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
- Em seguida as lâminas foram inseridas em solução de tampão citrato 10mM, pH 6.0, em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada. Após 3 minutos, desligou-se a panela e esperou-se sua refrigeração gradual em água corrente. Destampada a panela de pressão e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.
- A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%, 4 trocas de 5 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e após esta etapa, lavadas com solução salina fosfatada tamponada (PBS), 10mM pH 7.4 por 5 minutos;
- Todas as lâminas contendo os tumores odontogênicos benignos foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, cat A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida:

- Moesina Ab-1 - Clone 38/87 – Diluição 1:400, Thermo scientific Lab Vision, USA.
 - Rho-A Ab124287 – Abcam - Diluição 1:100, Cambridge, MA, EUA.
- Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- Os cortes tumorais foram incubados por 30 min a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- As lâminas foram incubadas em solução substrato, composta por: 100mg de 3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorato (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 6% e 100mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;
- Lavagem em água corrente e destilada por 3 minutos;
- As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- Foi realizada, novamente, a lavagem em água corrente e destilada;
- As lâminas foram imersas 2 vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavou-se em seguida em água corrente e destilada;
- Os cortes microscópicos foram desidratados:
- Etanol 80% por 30 segundos;
 - Etanol 95% por 30 segundos;
 - Etanol 100% por 30 segundos, 2 vezes e;
 - Xilol por 30 segundos, 4 vezes.
- As lâminas foram montadas em Entellan Neu (Merck, cat# 1.07961, Alemanha).

Como controle positivo utilizou-se um corte de placenta para o anticorpo anti-moesina e tecido mamário para o anticorpo anti-Rho-A. Como controle negativo para ambas as marcações, utilizou-se um corte do mesmo tecido com a omissão dos anticorpos primários.

4.3.3 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da expressão imuno-histoquímica da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos foi feita na região epitelial, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens visando registrar o maior número de campos microscópicos tumorais apresentando imunomarcção da moesina e da Rho-A. Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X.

A câmera digital foi conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviando suas imagens a um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.9 ZEISS, Jena, Alemanha). Cada campo microscópico tumoral foi previamente padronizado neste programa com o intuito de evitar diferenças na intensidade de expressão dos anticorpos analisados.

Para cada tumor odontogênico benigno, imunomarcado com moesina ou Rho-A, foram capturados 10 campos microscópicos distintos contendo epitélio odontogênico tumoral, sendo as imagens arquivadas no Microsoft Windows contendo pastas específicas para cada tumor.

A análise das imagens foi feita por dois avaliadores independentes (P.N.A e D.T.O) sempre no mesmo ambiente e com mesmo computador (Core 2 Duo, HP), utilizando-se um software de visualização de imagens para ambos os anticorpos. A avaliação imuno-histoquímica foi baseada no sistema semi-quantitativo de escores previamente descrito por Faustino et al. (2008). O escore final da expressão da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos pelas células neoplásicas foi determinado pela soma da intensidade da imunomarcção (0- sem marcação, 1- imunomarcção fraca, 2- imunomarcção moderada, 3- imunomarcção forte e 4- imunomarcção intensa) com a porcentagem de células com imunomarcção positiva (0- nenhuma célula tumoral marcada; 1- até 25% das células tumorais marcadas; 2- de 26% a 50% das células tumorais marcadas; 3- de 51% a 75% das células tumorais marcadas; 4- mais de 75% das células tumorais imunomarcadas).

Para cada campo capturado de cada tumor odontogênico, foi feita análise da expressão imuno-histoquímica da moesina e da Rho-A. Os dados foram contabilizados em uma planilha do Microsoft Excel (Microsoft Co.).

O escore final de cada espécime foi dado pela moda dos valores obtidos na análise dos 10 campos capturados. Quando foi obtido mais de um valor como moda dos resultados, foi utilizado sempre o maior número. Por fim, o escore obtido dos tumores, na marcação membranosa e citoplasmática, foi classificado em três grupos.

- 0 (escore 0) = ausente;
- 1 (escores de 1 a 5) = fraco;
- 2 (escores de 6 a 8) = forte.

Ao final do processo de avaliação dos tumores odontogênicos benignos, os valores foram contabilizados em uma planilha, discriminando a identificação de cada neoplasia.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre as expressões membranosa e citoplasmática nos tumores odontogênicos benignos foi realizada pelo teste de coeficiente de Correlação de Spearman, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.5 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do software de aquisição e análise de imagens Axiovision 4.9, ZEISS.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo em reunião do dia 17 de junho de 2015, sob o nº 34480714.7.0000.5417 (ANEXO 1).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

Os 45 tumores odontogênicos benignos que foram selecionados para este estudo, com base nos critérios de seleção da amostra, foram obtidos do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru/SP, diagnosticados no período de 1963 a 2009. A amostra foi constituída por 7 ameloblastomas (AM), 8 tumores odontogênicos adenomatóides (TOA), 19 tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ), 2 cistos odontogênicos ortoqueratinizados (COO), 1 tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC), 2 fibromas ameloblásticos (FA), 4 fibroodontomas ameloblásticos (FOA) e 2 tumores odontogênicos císticos calcificantes (TOCC), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos tumores odontogênicos benignos utilizados nesse estudo. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 1963 a 2009.

TUMORES ODONTOGÊNICOS BENIGNOS	N	%
Ameloblastoma	7	15,6
Tumor Odontogênico Adenomatóide	8	17,8
Tumor Odontogênico Queratocístico	19	42,2
Cisto Odontogênico Ortoqueratinizado	2	4,5
Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante	1	2,2
Fibroma Ameloblástico	2	4,4
Fibroodontoma Ameloblástico	4	8,9
Tumor Odontogênico Cístico Calcificante	2	4,4
TOTAL	45	100

N: número de tumores odontogênicos benignos

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A amostra foi constituída por tumores odontogênicos benignos, com e sem ectomesênquima, descritos com base na última Classificação de Tumores Odontogênicos da Organização Mundial da Saúde, publicada em 2005 (BARNES et al., 2005). Essa amostra foi constituída principalmente de pacientes do gênero feminino e da raça branca que apresentaram tumores odontogênicos benignos localizados frequentemente na mandíbula. Detalhes das características demográficas e clínicas destes tumores podem ser visualizadas na Tabela 2.

Os sete ameloblastomas (três do tipo plexiforme, três unicísticos e um folicular acantomatoso) ocorreram, principalmente, na mandíbula (cinco na região posterior e um na região anterior). Em um paciente houve envolvimento dos dentes 35 ao 37, em dois pacientes observou-se reabsorção radicular. Com base nas informações descritas pelo profissional, radiograficamente, os ameloblastomas apresentaram áreas radiolúcidas ou com aspecto multilocular ou com aspecto unilocular. A expansão da cortical óssea foi detectada em seis pacientes (Tabela 2), sendo os tumores assintomáticos na maioria dos pacientes.

Diferentemente do restante dos tumores odontogênicos benignos do estudo (Tabela 2), o tumor odontogênico adenomatóide afetou com maior frequência a região anterior de maxila (cinco pacientes). Quatro tumores odontogênicos adenomatóides apresentaram expansão da cortical óssea e em três pacientes estes tumores eram assintomáticos. Radiograficamente, em apenas um dos pacientes foi observado o aspecto unilocular e as informações referentes ao aspecto radiográfico não foi obtida nos demais pacientes.

Uma maior prevalência de tumores odontogênicos queratocísticos no gênero feminino, na raça branca, e em pacientes com idade inferior a 28 anos foi observada (Tabela 2). A mandíbula posterior foi a região de maior ocorrência dos tumores odontogênicos queratocísticos (onze pacientes), entretanto, em seis pacientes os tumores ocorreram na maxila (dois na região posterior, três na região anterior e um envolvendo o seio maxilar). Como pode ser observado na Tabela 2, radiograficamente, três tumores odontogênicos queratocísticos apresentaram aspecto unilocular e dois aspecto multilocular, sendo a expansão da cortical óssea presente em três pacientes. A sintomatologia dolorosa foi descrita em três pacientes com tumores odontogênicos queratocísticos e outros três pacientes relataram não

ter nenhum sintoma, entretanto, esta informação não foi obtida em 13 pacientes. Duas pacientes apresentaram lesões recorrentes, sendo uma em mandíbula posterior em um intervalo de um ano e a outra apresentou duas lesões na mesma época em mandíbula posterior e maxila anterior (envolvendo dentes 21, 22 e 23). Entre os 19 tumores odontogênicos queratocísticos selecionados, seis estavam associados a quatro pacientes com a Síndrome de Gorlin-Goltz.

Dos dois cistos odontogênicos ortoqueratinizados da amostra, um ocorreu na região posterior de maxila na região do dente 28, apresentando-se como uma lesão radiolúcida, unilocular, com evolução de um mês e sintomatologia dolorosa. O outro cisto odontogênico ortoqueratinizado estudado, localizou-se na região posterior direita de mandíbula, com tempo de evolução desconhecido, com expansão da cortical óssea (Tabela 2) e assintomático.

O tumor odontogênico epitelial calcificante analisado ocorreu em região posterior da mandíbula, sem sintomatologia dolorosa, em uma paciente do gênero feminino, edêntula e da raça branca (Tabela 2).

Os dois fibromas ameloblásticos incluídos neste estudo, ocorreram em mulheres jovens da raça branca e na região posterior de mandíbula. Em um dos pacientes, observou-se um aspecto radiográfico multilocular com expansão da cortical óssea (Tabela 2) e sem sintomatologia dolorosa.

Para os fibroodontomas ameloblásticos, a região mais afetada foi a mandíbula posterior (três pacientes), sendo um destes tumores associado a dente supranumerário e o outro ao germe do dente 38. Em um paciente, este tumor ocorreu na região anterior de maxila. Radiograficamente, as lesões eram uniloculares, radiolúcidas e com focos radiopacos, sendo a expansão da cortical óssea observada em dois pacientes (Tabela 2). Todos os tumores eram assintomáticos.

Os dois tumores odontogênicos císticos calcificantes ocorreram na mandíbula de mulheres negras. Um deles afetou corpo e ramo mandibular com assimetria facial. O tumor na região posterior envolveu os dentes 33 ao 46, com reabsorção radicular dos dentes 31, 32, 41, 42, 44 e 45 e o paciente relatou parestesia do lado direito. No exame radiográfico, um tumor apresentou aspecto unilocular e houve expansão da cortical óssea em ambos os tumores.

Tabela 2 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes com tumores odontogênicos benignos epiteliais. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, São Paulo, 1963 a 2009.

Variável	AM N	TOA N	TOQ N	COO N	TOEC N	FA N	FOA N	TOCC N
Gênero*								
Masculino	3	2	8	2	0	0	1	0
Feminino	4	6	11	0	1	2	3	2
Raça*								
Branca	4	6	17	2	1	2	4	0
Não Branca	2	1	2	0	0	0	0	2
Idade*								
≤ 28 anos	4	5	10	2	0	2	4	1
> 28 anos	3	0	8	0	0	0	0	0
Localização								
Maxila	0	5	6	1	0	0	1	0
Mandíbula	6	1	11	1	1	2	3	2
Não informado	1	2	2	0	0	0	0	0
Aspecto radiográfico*								
Unilocular	2	1	3	1	0	0	0	1
Multilocular	1	0	2	0	0	1	0	0
Expansão cortical óssea*								
Sim	6	4	3	2	0	1	2	2
Não	0	0	4	0	0	0	1	0
TOTAL	7	8	19	2	1	2	4	2

N: número de pacientes; AM: ameloblastoma, TOA: tumor odontogênico adenomatóide, TOQ: tumor odontogênico queratocístico, COO: cisto odontogênico ortoqueratinizado, TOEC: tumor odontogênico epitelial calcificante, FA: fibroma ameloblástico, FOA: fibroodontoma ameloblástico, TOCC: tumor odontogênico cístico calcificante, *excluídos pacientes com informações ignoradas.

5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.3.1 Expressão imuno-histoquímica da moesina e da RhoA nos tumores odontogênicos epiteliais benignos

Ameloblastoma

A amostra foi constituída por ameloblastomas com padrão folicular, plexiforme e unicístico. O ameloblastoma folicular observado era do subtipo acantomatoso, caracterizado por ilhotas e cordões de epitélio odontogênico dispostas em um estroma fibroso. As células da periferia e o centro das ilhotas eram respectivamente, semelhantes à pré-ameloblastos e ao retículo estrelado. Os três ameloblastomas plexiformes possuíam células odontogênicas semelhantes ao folicular, mas organizadas em cordões ou em arranjo plexiforme, dispostas em um estroma frouxo. Os três ameloblastomas unicísticos, eram constituídos por cavidade cística, revestida por epitélio odontogênico composto de células semelhantes à pré-ameloblastos, sendo que um dos tumores possuía infiltração mural.

Na análise da expressão imuno-histoquímica da moesina pelo epitélio odontogênico dos ameloblastomas, observou-se o predomínio da expressão membranosa e citoplasmática forte (Tabela 3) nas células periféricas semelhantes à pré-ameloblastos (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D). Nas células internas das ilhotas semelhantes ao retículo estrelado, a expressão da moesina exibiu o mesmo padrão de expressão das células periféricas. Os núcleos das células apresentaram negatividade para a proteína, bem como o estroma tumoral. Notou-se ainda a positividade para a moesina em alguns vasos sanguíneos e células inflamatórias crônicas quando presentes. Este padrão de expressão imuno-histoquímica da moesina pelo epitélio odontogênico, descrito acima, se manteve nos ameloblastomas plexiforme e unicístico. No único ameloblastoma folicular, do tipo acantomatoso, observou-se forte expressão da moesina na membrana e citoplasma das células periféricas e centrais e, nas áreas de metaplasia escamosa, a expressão da moesina foi negativa.

A expressão da Rho-A nos ameloblastomas (Tabela 3) foi fraca para membrana e no citoplasma em quatro tumores (2 unicísticos, 1 plexiforme e 1 folicular), sendo que, em três tumores (1 unicístico e 2 plexiformes) esta expressão foi forte nas células epiteliais da periferia e do centro das ilhotas tumorais (Figuras

4A, 4B, 4C e 4D) . Os vasos sanguíneos também mostraram expressão positiva para RhoA (Tabela 3).

Tabela 3 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células periféricas dos 7 ameloblastomas. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	1	6	4	3
Citoplasma	2	5	4	3

Figura 3 - Imunoexpressão da moesina nos ameloblastomas. Observa-se a forte expressão membranosa e citoplasmática da proteína nas células periféricas semelhantes à pré-ameloblastos e centrais do epitélio odontogênico tumoral. Os vasos sanguíneos exibiram marcação positiva da moesina (A, B, C e D, IHQ 40X).

Figura 4 - Imunoexpressão da Rho-A nos ameloblastomas, caracterizada por uma fraca expressão membranosa e citoplasmática nas células periféricas e centrais do epitélio odontogênico tumoral. Os vasos sanguíneos também exibiram imunopositividade para a Rho-A (A, B, C e D IHQ 40X).

Tumor odontogênico adenomatóide

Em coloração de hematoxilina e eosina, os tumores odontogênicos adenomatóides eram bem típicos exibindo células epiteliais formando ilhotas e organizadas em estruturas semelhantes a ductos “duct-like”. Permeando o epitélio odontogênico tumoral, observaram-se ainda áreas hialinas e focos de calcificação.

A expressão imuno-histoquímica da moesina foi forte na membrana da maioria dos tumores odontogênicos adenomatóides e, no citoplasma das células epiteliais odontogênicas, predominou uma fraca expressão desta proteína (Figuras 5A e 5B). Nas estruturas epiteliais com organização “duct-like” a expressão destacou-se na membrana celular (Tabela 4). Observou-se ainda, expressão da moesina nos vasos sanguíneos. Nas áreas calcificadas e nos núcleos das células epiteliais odontogênicas não houve expressão da moesina.

A expressão membranosa da Rho-A, foi forte em sete dos oito tumores odontogênicos adenomatóides, porém no citoplasma das células epiteliais odontogênicas houve uma forte expressão em 5 tumores e fraca expressão em 3 destes tumores (Tabela 4). Nas estruturas calcificadas e no núcleo das células odontogênicas, a expressão da Rho-A não foi observada. Observou-se ainda, positividade para a Rho-A dos vasos sanguíneos do estroma tumoral (Figuras 5C e 5D).

Tabela 4 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 8 tumores odontogênicos adenomatóides. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	3	5	1	7
Citoplasma	5	3	3	5

Figura 5 - Imunoexpressão da moesina (A e B) e da Rho-A (C e D) nos tumores odontogênicos adenomatóides. Em A e B, observa-se uma forte expressão membranosa e uma fraca expressão citoplasmática da moesina. Em C e D, observa-se a predominância de uma forte expressão da Rho-A tanto na membrana quanto no citoplasma das células dos tumores odontogênicos adenomatóides (A, B, C e D, IHQ 40X).

Tumor odontogênico queratocístico

O tumor odontogênico queratocístico analisado em hematoxilina e eosina caracterizava-se por uma área cística revestida por epitélio pavimentoso paraqueratinizado, com 5 a 8 camadas de células e presença de corrugações na camada superficial. As células da camada basal era hipercromáticas, cuboidais e dispostas em paliçada. Notou-se ainda, alguns focos de células inflamatórias e presença de lâminas de queratina no lúmen cístico.

Na maioria dos tumores odontogênicos queratocísticos, a expressão da moesina destacou-se nas células da camada basal do epitélio, exibindo forte imunomarcagem na membrana e uma fraca expressão no citoplasma destas células epiteliais (Tabela 5). Não houve expressão significativa na camada suprabasal deste tumor odontogênico. Os vasos sanguíneos exibiram expressão positiva para moesina (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D).

O padrão de expressão imuno-histoquímica da Rho-A observado foi mais uniforme tanto na camada basal como na suprabasal do epitélio dos tumores odontogênicos queratocísticos, sendo observada expressão forte na membrana de 10 tumores e no citoplasma das células epiteliais de 14 tumores (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D). Os núcleos das células do epitélio odontogênico não expressaram a Rho-A e houve positividade para os vasos sanguíneos presentes na cápsula fibrosa (Tabela 5).

Tabela 5 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 19 tumores odontogênicos queratocísticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	7	12	9	10
Citoplasma	12	7	5	14

Figura 6 - Imunoexpressão da moesina nos tumores odontogênicos queratocísticos. Observa-se a forte expressão da moesina principalmente na membrana e fraca expressão no citoplasma das células da camada basal do epitélio odontogênico, e dos vasos sanguíneos presentes na cápsula fibrosa (A, B, C e D, IHQ 40X).

Figura 7 - Características microscópicas da imunoexpressão da Rho-A nos tumores odontogênicos queratocísticos, com predominância da forte expressão da proteína em todas as camadas de células epiteliais (A, B, C e D, IHQ 40X).

Cisto odontogênico ortoqueratinizado

Microscopicamente, em hematoxilina e eosina, o cisto odontogênico ortoqueratinizado, foi caracterizado por uma cavidade cística revestida por epitélio estratificado ortoqueratinizado, de fina espessura, constituído por 5 a 8 camadas de células.

A expressão da moesina no cisto odontogênico ortoqueratinizado, mostrou uma marcação fraca na membrana e no citoplasma das células da camada basal (Tabela 6). Foi observado também expressão de moesina nos vasos sanguíneos presentes na cápsula fibrosa cística (Figuras 8A e 8B).

A expressão imuno-histoquímica da Rho-A, foi fraca para membrana e citoplasma das células epiteliais deste cisto, tanto na camada basal como nas camadas suprabasais (Tabela 6). Para os vasos sanguíneos da cápsula fibrosa houve positividade para a Rho-A. Diferente da moesina, a expressão da Rho-A foi vista em todas as camadas epiteliais dos dois cistos estudados, exceto para a camada córnea (Figuras 8C e 8D).

Tabela 6 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 2 cistos odontogênicos ortoqueratinizados. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	2	-	2	-
Citoplasma	2	-	2	-

Figura 8 - Características microscópicas da imunoexpressão da moesina e Rho-A nos cistos odontogênicos ortoqueratinizados. Nas imagens A e B, se observa a fraca expressão da moesina na membrana e no citoplasma na camada basal de células epiteliais odontogênicas. Em C e D, a expressão da Rho-A foi fraca na membrana e no citoplasma, se expressando em toda a camada de células epiteliais dos cistos odontogênicos ortoqueratinizados (A, B, C e D, IHQ 40X).

Tumor odontogênico epitelial calcificante

Em hematoxilina e eosina, o tumor odontogênico epitelial calcificante, apresentou cordões de células epiteliais com citoplasma eosinofílico e raras figuras de mitose. Ao redor dos cordões, notou-se presença de material hialino, com alguns focos de calcificação.

No tumor odontogênico epitelial calcificante, a moesina apresentou uma fraca expressão membranosa e citoplasmática nas células epiteliais odontogênicas (Tabela 7), e nenhuma marcação nas áreas calcificadas (Figuras 9A e 9B). Focos de expressão membranosa forte nas células epiteliais também foram observados.

A expressão imuno-histoquímica da Rho-A neste tumor apresentou um padrão mais homogêneo e forte de marcação das células epiteliais (Tabela 7), com algumas áreas calcificadas fracamente coradas (Figuras 9C e 9D).

Tabela 7 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A no tumor odontogênico epitelial calcificante. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	1	-	-	1
Citoplasma	1	-	-	1

Figura 9 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A no tumor odontogênico epitelial calcificante. Em A e B, observa-se que a expressão da moesina foi fraca para membrana e citoplasma nas células epiteliais odontogênicas tumorais. Em C e D, é observada a forte expressão da Rho-A na membrana e citoplasma do epitélio odontogênico. As estruturas calcificadas exibiram fraca ou ausente marcação para as proteínas moesina e Rho-A (A, B, C e D, IHQ 40X).

Fibroma ameloblástico

Em hematoxilina e eosina, o fibroma ameloblástico apresentou-se como cordões e ilhotas de células epiteliais semelhantes ao epitélio interno do órgão do esmalte e, no centro das ilhotas a presença de células semelhantes ao retículo estrelado. O estroma que permeava esse epitélio odontogênico era intensamente celularizado, semelhante à papila dentária.

No fibroma ameloblástico, a expressão da moesina foi predominantemente forte e essencialmente membranosa nas células periféricas semelhantes à pre-ameloblastos quando comparadas as células da região central das ilhotas. No citoplasma das células epiteliais odontogênicas do fibroma ameloblástico, a expressão foi fraca na periferia e na região central das ilhotas (Tabela 8). Nenhuma expressão nuclear foi observada no epitélio odontogênico. Nas células semelhantes à papila dentária e nas células endoteliais de vasos sanguíneos também foi observado expressão desta proteína (Figuras 10A e 10 B).

A imunoexpressão da Rho-A no epitélio odontogênico deste tumor (Tabela 8) evidenciou uma expressão membranosa intensa nas ilhotas e, uma marcação citoplasmática fraca tanto nas células periféricas, quanto na região central das ilhotas. As células semelhantes à papila dentária e as células endoteliais dos vasos sanguíneos não exibiram expressão de Rho-A (Figuras 10C e 10D).

Tabela 8 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 2 fibromas ameloblásticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	-	2	-	2
Citoplasma	2	-	2	-

Figura 10 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A nos fibromas ameloblásticos. Observa-se que houve uma forte expressão da moesina (A e B) e da Rho-A (C e D) na membrana e uma fraca expressão citoplasmática nas células epiteliais periféricas semelhantes à ameloblastos. Nas células semelhantes à papila dentária e nas células endoteliais de vasos sanguíneos também foi observado expressão da moesina (A IHQ 20X; B, C e D IHQ 40X).

Fibroodontoma ameloblástico

No exame microscópico em hematoxilina e eosina o fibroodontoma ameloblástico, foi caracterizado pela presença de tecidos odontogênicos mole e duro, correspondente a cordões epiteliais odontogênicos, além de esmalte e dentina, depositados de forma desorganizada.

Na análise da expressão imuno-histoquímica da moesina, observou-se uma imunomarcção forte nas células epiteliais, tanto na membrana como no citoplasma (Tabela 9). Nos ameloblastos secretores observou-se a expressão membranosa, bem como nos ameloblastos reduzidos do órgão do esmalte, nas células semelhantes ao retículo estrelado, a expressão foi forte. As áreas mineralizadas foram negativas para a moesina (Figuras 11A e 11B). Nos vasos sanguíneos presentes foram evidenciados positividade para a moesina.

A expressão da Rho-A exibiu um padrão de expressão membranoso fraco em todos os tumores e citoplasmático forte nos ameloblastos secretores e reduzidos do órgão do esmalte (Tabela 9). Nas células semelhantes ao retículo estrelado, a expressão foi fraca. Para estruturas calcificadas não houve considerável marcação da proteína (Figuras 11C e 11D). Notou-se também que os vasos sanguíneos foram positivos para Rho-A.

Tabela 9 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nos 4 fibroodontomas ameloblásticos. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	1	3	4	-
Citoplasma	1	3	-	4

Figura 11 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A nos fibroodontomas ameloblásticos. Em A e B, a expressão da moesina foi forte para a membrana e citoplasma das células dos ameloblastos secretores e reduzidos. Em C e D, a expressão da Rho-A foi forte no citoplasma dos ameloblastos secretores e reduzidos e, na membrana a expressão foi fraca nas células dos ameloblastos secretores e reduzidos dos fibroodontomas ameloblásticos. Nas áreas mineralizadas e núcleo das células, a expressão não foi significativa para as proteínas. (A, B, C e D IHQ 40X).

Tumor odontogênico cístico calcificante

Na análise microscópica em hematoxilina e eosina do tumor odontogênico cístico calcificante, notou-se um epitélio ameloblastomatoso, com células basais prismáticas, hipercromáticas e dispostas em paliçada, que revestiam uma cavidade cística. No interior do epitélio observamos presença de células fantasmas, formando áreas calcificadas.

A expressão da moesina neste tumor foi fortemente encontrada nas células do epitélio odontogênico, com forte marcação citoplasmática e membranosa, principalmente na camada basal (Tabela 10). Em outras estruturas como células fantasmas e material dentinóide, as expressões de moesina foram fraca ou ausente (Figuras 12A e 12B). Na cápsula cística, a expressão de moesina foi observada em vasos sanguíneos e fibroblastos.

Avaliando a expressão da Rho-A constatou-se que na membrana das células epiteliais odontogênicas a expressão foi fraca e no citoplasma destas células, a imunomarcação foi forte para um tumor e fraco para outro (Figuras 12C e 12D). As células fantasmas e os vasos sanguíneos apresentaram uma fraca expressão de Rho-A (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 2 tumores odontogênicos císticos calcificantes. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, São Paulo, 1963 a 2009.

	Moesina		Rho-A	
	Fraco	Forte	Fraco	Forte
Membrana	-	2	2	-
Citoplasma	-	2	1	1

Figura 12 - Imunoexpressão da moesina e da Rho-A no tumor odontogênico cístico calcificante. Em A e B, observa-se a forte expressão da moesina nas células do epitélio odontogênico na membrana e citoplasma, nas células fantasmas (seta) a expressão foi fraca. Em C e D, a expressão da Rho-A foi fraca na membrana das células do epitélio odontogênico. No citoplasma, a expressão foi forte em um tumor (A, IHQ 20X, B, C e D, IHQ 40X).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.4.1 Correlação da expressão da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos

A partir da análise das expressões da moesina e Rho-A nos diferentes tumores odontogênicos benignos, com e sem ectomesênquima, foi realizado o teste estatístico de correlação de Spearman para avaliar a correlação entre as expressões destas proteínas nestes tumores.

Na Tabela 11 e Gráfico 1 observa-se a distribuição da expressão da moesina e da Rho-A nos 45 tumores odontogênicos benignos. A expressão da moesina foi forte na membrana de 66,7% dos tumores e, no citoplasma em 55,6% dos tumores predominou a fraca expressão. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre as expressões membranosa e citoplasmática da moesina ($p=0,000$), como descrito na Tabela 11.

Na Tabela 12 e Gráfico 2 observa-se a distribuição da expressão da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos. Uma expressão membranosa forte foi observada em 51,1% dos tumores e uma expressão citoplasmática forte em 62,2% dos tumores. A partir da análise estatística realizada da Rho-A, obteve-se uma correlação estatisticamente significante entre as expressões de Rho-A membranosa e citoplasmática ($p=0,048$).

Tabela 11 - Distribuição da expressão membranosa e citoplasmática da moesina nos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.

MOESINA					
	Membranosa		Citoplasmática		ρ
	N	%	N	%	
Fraco	15	33,3	25	55,6	$\rho=0,000$
Forte	30	66,7	20	44,4	
Total	45	100	45	100	

ρ = nível de significância estatística de 5% ($p<0,05$). Realizado a partir do teste de coeficiente de correlação de Spearman.

Gráfico 1 - Expressão de moesina membranosa e citoplasmática nos 45 tumores odontogênicos benignos avaliados.

Tabela 12 - Distribuição da expressão membranosa e citoplasmática da Rho-A nos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.

RHO-A					
	Membranosa		Citoplasmática		ρ
	N	%	N	%	
Fraco	22	48,9	17	37,8	$\rho=0,048$
Forte	23	51,1	28	62,2	
Total	45	100	45	100	

ρ = nível de significância estatística de 5% ($\rho<0,05$). Realizado a partir do teste de coeficiente de correlação de Spearman.

Gráfico 2 - Expressão de Rho-A membranosa e citoplasmática nos 45 tumores odontogênicos benignos avaliados.

Na Tabela 13, é possível observar de acordo com o teste de correlação de Spearman, que não houve correlação estatisticamente significativa entre as expressões membranosa e citoplasmática da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos com e sem ectomesênquima.

Tabela 13 - Correlação entre as expressões membranosa e citoplasmática da moesina e Rho-A nas células dos 45 tumores odontogênicos benignos. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1963 a 2009.

	R	p
MOE_M x RHO-A_M	0,119	0,437
MOE_M x RHO-A_C	-0,008	0,959
MOE_C x RHO-A_M	-0,115	0,449
MOE_C x RHO-A_C	0,042	0,785

p= nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Realizado a partir do teste de coeficiente de correlação de Spearman; MOE_M: moesina membranosa; MOE_C: moesina citoplasmática; RHO-A_M: Rho-A membranosa; RHO-A_C: Rho-A citoplasmática.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, um importante foco dos estudos envolvendo as proteínas ERM refere-se a sua participação na movimentação celular (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; LOUVET-VALLÉE, 2000; PEARSON et al., 2000; BELBIN et al., 2005; MARTÍN-VILLAR et al., 2006; NEISCH; FEHON, 2011). Estudos como o de Belbin et al. (2005), Martín-Villar et al. (2006), Charafe-Jauffre et al. (2007) mostraram que proteínas como a ezrina e a moesina estão envolvidas, via ativação do citoesqueleto celular, no processo de migração e invasão de células neoplásicas, principalmente na ocorrência de metástases.

O papel das proteínas ERM (ezrina, radixina e moesina) em diferentes funções celulares tem sido investigado em células normais e patológicas (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; BELBIN et al., 2005; NEISCH; FEHON, 2011; SCHLECHT et al., 2012; CLUCAS; VALDERRAMA, 2014). Estas proteínas permanecem em um estado inativo (conformação fechada) no citoplasma celular, e requerem ativação para desempenhar algumas de suas funções como a adesão, a proliferação celular, a migração e a invasão celular (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; PEARSON et al., 2000; LOUVET-VALLÉE, 2000; MADAN et al., 2006).

Nos tumores odontogênicos benignos, estudos recentes com uma das proteínas ERM, a ezrina, demonstraram uma forte expressão desta molécula no epitélio dos tumores odontogênicos queratocísticos (OLIVEIRA et al., 2014) e nas células periféricas dos ameloblastomas (COSTA et al., 2015) sugerindo sua participação no processo de expansão e invasão local destas neoplasias benignas. Particularmente em relação à moesina, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a expressão desta proteína no epitélio odontogênico tumoral.

Além da sua ligação com o citoesqueleto de actina participando da manutenção da polaridade celular, as proteínas ERM quando ativadas, interagem com diferentes efetores, como as GTPases Rho, para propagar a transdução de sinais intracelulares (HIRAO et al., 1996; MATSUI et al., 1998; MARTÍN-VILLAR et al., 2006; ARPIN et al., 2011). Estas informações levaram-nos a realizar o presente estudo visando investigar se existe uma localização celular similar e/ou uma

correlação entre a expressão da moesina e da Rho-A nos tumores odontogênicos benignos.

A amostra do presente trabalho foi constituída por tumores odontogênicos benignos epiteliais e mistos, todos pertencentes ao Arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Entre os tumores mais frequentes desta casuística, destacaram-se o ameloblastoma, o tumor odontogênico adenomatóide e o tumor odontogênico queratocístico, conforme ilustrado na Tabela 1.

As características clínicas e demográficas encontradas na amostra (Tabela 2) confirmaram um perfil bem estabelecido para estes tumores odontogênicos benignos (BARNES et al., 2005; NEVILLE et al., 2009). Destaca-se que, entre os 19 tumores odontogênicos queratocísticos selecionados, 6 destes estavam associados a 4 pacientes portadores da Síndrome de Gorlin-Goltz.

A expressão da moesina e da Rho-A nestes tumores odontogênicos benignos apresentou-se bem distribuída na membrana e no citoplasma, exibindo um padrão de marcação forte na maioria das células dos tumores odontogênicos epiteliais benignos. Ressalta-se também que a expressão de moesina foi encontrada em algumas células inflamatórias crônicas quando presentes, e em células endoteliais dos vasos sanguíneos.

Nos ameloblastomas, a expressão da moesina foi forte e homogeneamente distribuída na membrana e no citoplasma das células periféricas semelhantes à pré-ameloblastos e também nas células centrais semelhantes ao retículo estrelado (Figura 3 e Tabela 3). Áreas de metaplasia escamosa quando presente nos ameloblastomas foliculares foram negativas para a proteína. Este padrão de expressão desta proteína do complexo ERM, foi semelhante aquele encontrado para a ezrina em ameloblastomas, descritos por Costa et al. (2015), onde observaram uma forte expressão da proteína, principalmente, nas células periféricas semelhantes à pré-ameloblastos.

No tumor odontogênico adenomatóide, a expressão de moesina foi forte e predominantemente membranosa no epitélio odontogênico tumoral (Tabela 4), incluindo as estruturas “duct-like” (Figuras 5A e 5B), o que sugere uma participação dessa proteína também na manutenção da forma e polaridade celular como descrito

em algumas células em condições fisiológicas (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; LOUVET-VALLÉE, 2000; NEISCH; FEHON, 2011).

No tumor odontogênico queratocístico, predominou uma forte expressão membranosa da moesina no centro germinativo do epitélio odontogênico, ou seja, nas células da camada basal (Figura 6 e Tabela 5). Esse padrão de expressão da moesina foi diferente daquele encontrado no trabalho de Oliveira et al. (2014), para a ezrina, onde foi observada uma imunoexpressão predominantemente citoplasmática na camada basal, e uma expressão membranosa desta proteína nas camadas supra-basais do epitélio odontogênico.

No cisto odontogênico ortoqueratinizado, o padrão de expressão foi semelhante ao tumor odontogênico queratocístico, porém menos intenso (Figuras 8A e 8B), pode ter ocorrido por se tratar de uma lesão mais indolente, e de crescimento mais lento (NEVILLE et al., 2009).

No único tumor odontogênico epitelial calcificante houveram focos de forte expressão membranosa de moesina nas células epiteliais odontogênicas e uma ausência de positividade da proteína nas áreas calcificadas (Figuras 9A e 9B), porém outros estudos são necessários para confirmarem estes resultados.

Nos tumores odontogênicos mistos como o fibroma ameloblástico, uma forte expressão membranosa da moesina foi observada nas células epiteliais odontogênicas periféricas semelhantes à pré-ameloblastos (Tabela 8). Nas células semelhantes à papila dentária também se observou a imunoexpressão da moesina (Figuras 10A e 10B).

No fibroodontoma ameloblástico, a moesina foi detectada na membrana e no citoplasma dos ameloblastos secretores e também nos ameloblastos reduzidos do órgão do esmalte. As estruturas mineralizadas presentes no fibroodontoma ameloblástico foram negativas para a moesina (Figuras 11A e 11B).

No tumor odontogênico cístico calcificante, a moesina apresentou uma forte expressão na membrana e no citoplasma das células do epitélio odontogênico, com uma fraca ou ausente expressão das células fantasmas (Figuras 12A e 12B).

Podemos observar em uma análise geral da moesina nos tumores odontogênicos epiteliais e mistos estudados, que a proteína foi fortemente expressa em áreas de maior atividade celular como nas células epiteliais periféricas dos ameloblastomas e dos fibromas ameloblásticos, na camada basal dos tumores

odontogênicos queratocísticos e do tumor odontogênico cístico calcificante e nos ameloblastos secretores do fibroodontoma ameloblástico. Por outro lado, áreas quiescentes incluindo regiões de metaplasia escamosa dos ameloblastomas foliculares, estruturas calcificadas do tumor odontogênico epitelial calcificante, do tumor odontogênico adenomatóide e do fibroodontoma ameloblástico e células fantasmas do tumor odontogênico cístico calcificante, foram negativas para a moesina.

Com tudo que foi descrito acima, percebemos que a moesina está expressa no epitélio odontogênico, sendo essa imunoexpressão predominantemente membranosa, onde provavelmente a molécula participa no processo de manutenção da adesão entre as células epiteliais e na sua polaridade (MANGEAT; ROY; MARTIN, 1999; LOUVET-VALLÉE, 2000; NEISCH; FEHON, 2011). Contudo, sabemos que quando ativada, essas ERM podem ser redistribuídas internamente no citoplasma da célula, participando de outras vias de sinalização celulares. Na mucosa bucal normal e nas células epiteliais da pele, a moesina se expressa fortemente na membrana das células da camada basal do epitélio (ICHIKAWA et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1998). Entretanto, em células neoplásicas malignas, a moesina além de se expressar na membrana, se expressa no citoplasma das células do carcinoma espinocelular de boca, podendo desempenhar um papel importante na região do front de invasão tumoral, contribuindo assim para um pior prognóstico para os pacientes (BARROS, 2014). Em virtude disso, a forte expressão dessa proteína como observado no presente trabalho, sugere que a moesina pode estar participando também dos mecanismos de expansão e invasão local desses tumores odontogênicos benignos.

A imunoexpressão da outra proteína analisada, a Rho-A, em uma análise geral, foi predominante e forte tanto na membrana como no citoplasma das células dos tumores odontogênicos benignos.

Nos ameloblastomas, a imunoexpressão da Rho-A foi fraca na membrana e no citoplasma das células epiteliais da periferia e do centro das ilhotas tumorais (Tabela 3). Contudo, em 3 dos 7 tumores estudados, a imunoexpressão da Rho-A foi forte nas células periféricas e centrais das ilhotas tumorais (Figura 4). Estes resultados reforçam parcialmente aqueles encontrados no trabalho de Modolo et al. (2012), onde as células basais dos ameloblastomas folicular e plexiforme mostraram

imunomarcacão fraca ou moderada de Rho-A e o número de células centrais positivas para esta proteína foi maior que nas células basais.

Em nossos tumores odontogênicos adenomatóides (Figuras 5C e 5D), nos tumores odontogênicos queratocísticos (Figura 7) e no tumor odontogênico epitelial calcificante (Figuras 9C e 9D), foi observado uma forte imunoexpressão da Rho-A na membrana e no citoplasma das células do epitélio odontogênico. Para o cisto odontogênico ortoqueratinizado, o padrão de expressão da Rho-A foi semelhante ao do tumor odontogênico queratocístico, mas de forma menos intensa (Figuras 8C e 8D).

A imunoexpressão da Rho-A no fibroma ameloblástico (Tabela 8) foi predominantemente forte na membrana nas células periféricas semelhantes à ameloblastos, sem expressão significativa nas células semelhantes à papila dentária (Figuras 10C e 10D) e, no fibroodontoma ameloblástico (Tabela 9), esta expressão foi exclusivamente forte no citoplasma dos ameloblastos secretores e reduzidos do órgão do esmalte (Figuras 11C e 11D).

A forte expressão da Rho-A nos diferentes tumores odontogênicos benignos, sugere que ela está presente nas células epiteliais odontogênicas, inclusive em condições tumorais, e pode ser encontrada tanto em regiões de células mais indiferenciadas como no tumor odontogênico adenomatóide ou tumor odontogênico epitelial calcificante, como em fases onde as células já completaram sua diferenciação, como no fibroodontoma ameloblástico. A co-localização da Rho-A na membrana ou no citoplasma das células epiteliais odontogênicas tumorais precisa ser melhor investigada.

De forma semelhante à moesina, não houve expressão significativa da Rho-A em áreas calcificadas do tumor odontogênico adenomatóide, do tumor odontogênico epitelial calcificante, em áreas mineralizadas do fibroodontoma ameloblástico e nas células fantasmas do tumor odontogênico cístico calcificante.

Muitos dos resultados confirmaram que a Rho-A parece ser importante principalmente para os tumores odontogênicos benignos onde existe a produção de tecido dentário duro como no fibroodontoma ameloblástico. Estas observações reforçam os achados de Xue et al. (2013), que sugeriu uma participação da Rho-A na odontogênese durante a produção normal do esmalte dentário.

No tumor odontogênico cístico calcificante foi observada uma fraca expressão da Rho-A na membrana, e no citoplasma a expressão da proteína foi variável, sendo forte em um dos dois tumores que estudamos (Tabela 10 e Figuras 12C e 12D).

No epitélio odontogênico, tanto as expressões membranosa como a citoplasmática das proteínas foram fortemente encontradas e provavelmente são de grande importância nesses tumores odontogênicos benignos.

Ao analisarmos a correlação entre a moesina e a Rho-A pelo teste de correlação de Spearman, verificamos que não houve uma correlação estatisticamente significativa entre as duas proteínas (Tabelas 11 e 12 e nos Gráficos 1 e 2), o que reforça que embora essas proteínas sejam expressas nas células epiteliais odontogênicas, nem sempre elas atuam conjuntamente.

Assim como observado em outros estudos, proteínas do complexo ERM, como a moesina, são importantes no processo de movimentação celular via citoesqueleto de actina, e que embora tenha sido sugerido, *in vitro*, que essas proteínas possam atuar com diferentes GTPases Rho, propagando sinais extracelulares (MARTÍN-VILLAR et al., 2006, WICKI; CHRISTOFORI, 2007), não conseguimos mostrar uma correlação entre a moesina e a Rho-A nos tumores odontogênicos benignos analisados no presente trabalho. Entendemos que esse processo de conexão dessas duas proteínas precisa ser melhor estudado *in vitro*, em linhagens celulares de origem odontogênica.

Podemos concluir que, como houve uma forte expressão de moesina e de Rho-A, principalmente nos epitélios dos tumores odontogênicos benignos, provavelmente estas proteínas estão atuando, também, no processo de movimentação celular e participam do mecanismo de crescimento e expansão local desses tumores.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir da análise da expressão de moesina e de Rho-A nos 45 tumores odontogênicos benignos, com e sem ectomesênquima, concluímos que as proteínas moesina e Rho-A são fortemente expressas pelo epitélio odontogênico e, o que sugere uma participação destas proteínas no crescimento e expansão local destes tumores odontogênicos benignos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. T. et al. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. **The Laryngoscope**, v. 111, p. 1285-1289, 2001.
- ALAN, J. K.; LUNDQUIST, E. A. Mutationally activated Rho GTPases in cancer. **Landes Bioscience**, v. 4, n. 3, p. 159-163, 2013.
- AMANO, N. et al. Rho-Kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. **Cytoskeleton**, v. 67, p. 545-554, 2010.
- ARPIN, M. et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. **Cell Adh Migr**, Texas, v. 5, n. 2, p. 199-206, 2011.
- BARNES et al. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, 2005.
- BARROS, F. B. A. Expressão de moesina e podoplanina no câncer de boca e sua relação com o processo de invasão tumoral. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2014.
- BATCHELOR, C. L; WOODWARD, A. M.; CROUCH, D. H. Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. **Experimental Cell Research**, v. 296, p. 208-222, 2004.
- BELBIN, T. J. et al. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 131, p. 10-18, 2005.
- BIZ, M. T. et al. GTPases Rho-A and Rac1 are important for amelogenin and DSPP expression during differentiation of ameloblasts and odontoblasts. **Cell Tissue Res**, v. 340, p. 459-470, 2010.
- CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1779-85, 2007.
- CHI, X. et al. Roles of Rho GTPases in Intracellular Transport and Cellular Transformation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7089-7108, 2013.
- CHIRCOP, M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. **Landes Bioscience**, v. 5, 2014.
- CLUCAS, J.; VALDERRAMA, F. ERM proteins in cancer progression. **J Cell Sci**, v. 127, n. 2, p. 267-75, 2014.

- COSTA, Y. F. et al. Are podoplanin and ezrin involved in the invasion process of the ameloblastomas? **The European Journal of Histochemistry**, v. 59, n. 1, p. 39-44, 2015.
- CUI, Y. et al. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. **Int. J. Cancer**, v. 124, p. 1614-1621, 2009.
- FAUSTINO, S. E. S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 37, p. 372-378, 2008.
- FERNÁNDEZ-MUÑOZ, B. et al. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 6, p. 886-896, 2011.
- FRITZ, G.; JUST, I.; KAINA, B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. **Int J Cancer**, v. 81, p. 682-687, 1999.
- FRITZ, G. et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 635-644, 2002.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, p. 509-514, 1998.
- HALL, A. Rho family GTPases. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 6, p. 1378-1382, 2012.
- HAYNES, J. et al. Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression. **Molecular Biology of the Cell**, in Press, 2011.
- HE, M. et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of Rho-A/ROCK-2/moesin cascade. **BMC Cancer**, v. 10, v. 170, 2010.
- HIRAO, M. et al. Regulation mechanism of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) protein/plasma membrane association: Possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 135, p. 37-51, 1996.
- HIRATA, T. et al. Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. **Int Immunol**, v. 24, n. 11, p. 705-717, 2012.
- ICHIKAWA, T. et al. Expression of moesin and its associated molecule CD44 in epithelial skin tumors. **J Cutan Pathol**, v. 25, p. 237-243, 1998.
- JULIAN, L; OLSON, M. F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. **Landes Bioscience**, v. 5, 2014.

JUNG, W. Y. et al. Expression of moesin and CD44 is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. **Histopathology**, v. 63, n. 4, p. 474-81, 2013.

KARLSSON, R. et al. Rho GTPase function in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, p. 91-98, 2009.

KINOSHITA, T. et al. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: Moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, p. 378-383, 2012.

KOBAYASHI, H. et al. Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 6, p. 344-349, 2003.

KOBAYASHI, H. et al. Clinical significance of cellular distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 2, p. 572-580, 2004.

LALLEMAND, D.; ARPIN, M. Moesin/ezrin: a specific role in cell metastasis? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 1, p. 6-7, 2010.

LANKES, W. et al. A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. **Biochem J**, v. 251, p. 831-842, 1988.

LIM, J.; THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. **Development**, v. 139, p. 3471-3486, 2012.

LOUVET-VALLEE, S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. **Biol Cell**, v. 92, n. 5, p. 305-16, 2000.

MADAN, R. et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 28, n. 11, p. 1018-1027, 2006.

MADAULE, P.; AXEL, R. A Novel ras-Related Gene Family. **Cell**, v. 41, p. 31-40, 1985.

MANGEAT, P.; ROY, C.; MARTIN, M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 187-192, 1999.

MANITI, O.; CARVALHO, K.; PICART, C. Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin. **Biochimie**, v. 95, p. 3-11, 2013.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Sci**, v. 119, n. 21, p. 4541-4553, 2006.

- MATSUI, T. et al. Rho-Kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 647-657, 1998.
- MERAJVER, S. D.; USMANI, S. Z. Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 291-298, 2005.
- MODOLO, F. et al. Immunohistochemical expression of Rho GTPases in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, v. 41, p. 400-407, 2012.
- NAKAMURA, H.; OZAWA, H. Immunolocalization of CD44 and the Ezrin–Radixin–Moesin (ERM) family in the stratum intermedium and papillary layer of the mouse enamel organ. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 11, p. 1481-1492, 1997.
- NEISCH, A. L.; FEHON, R. G. Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 4, p. 377-82, 2011.
- NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral & maxilofacial**. 2009, 3ed, 992.
- O'CONNOR, K. L.; CHEN, M. Dynamic functions of Rho-A in tumor cell migration and invasion. **Landes Bioscience**, v. 4, n. 3, p.141-147, 2013.
- OLIVEIRA, D. T. et al. The relationship between ezrin and podoplanin expressions in keratocystic odontogenic tumors. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 150, 2014.
- PEARSON, M. A. et al. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. **Cell**, v. 101, p. 259-270, 2000.
- RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, p. 389-399, 1992.
- SCHLECHT, N. F. et al. Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck Pathol**, v. 6, p. 232-243, 2012.
- SCHOFIELD, A. V.; BERNARD, O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 48, n. 4, p. 301-316, 2013.
- SOINI, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology**, v. 39, n. 2, p. 179-86, 2001.
- SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. **Landes Bioscience**, v. 5, n. 2, p. 170-180, 2011.
- TSUKITA, S. et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **The Journal of Cell Biology**, v. 126, n. 2, p. 391-401, 1994.

VEGA, F. M.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. **FEBS Letters**, v. 582, p. 2093-2101, 2008.

XUE, H. et al. Ameloblasts require active Rho-A to generate normal dental enamel. **Eur J Oral Sci**, v. 121, p. 293-302, 2013.

WANG, C. C. et al. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. **Histopathology**, v. 61, n. 1, p. 78-87, 2012.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. **Br J Cancer**, v. 96, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

YOGESHA, S. D. et al. Unfurling of the band 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of the merlin tumor suppressor. **Protein Society**, v. 20, p. 2113-2120, 2011.

ZEGERS, M. M.; FRIEDL, P. Rho GTPases in collective cell migration. **Landes Bioscience**, v. 5, 2014.

Anexo

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Participação das proteínas moesina e Rho-A na evolução dos tumores odontogênicos benignos

Pesquisador: Paula Nascimento Antonio

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 34480714.7.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Existem mais imagens nos resultados das expressões das proteínas moesina e RhoA,

Data do Envio: 14/05/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.114.005

Data da Relatoria: 17/06/2015

Apresentação da Notificação:

Notificação referente ao envio do relatório final do projeto.

Objetivo da Notificação:

Análise do relatório final do projeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório final está condizente com o projeto aprovado pelo CEP, com os resultados e estatística adequados. O relatório contém as tabelas dos resultados bem como as figuras resultantes das colorações imuno-histoquímicas usadas na metodologia.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 1.114.005

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP reunido ordinariamente no dia 17.06.2015 acata por unanimidade o parecer APROVADO emitido pelo relator, sobre o relatório final da pesquisa.

BAURU, 18 de Junho de 2015

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br