

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE QUATRO PROTEÍNAS DO INVADOPÓDIO EM LESÃO CENTRAL E PERIFÉRICA DE CÉLULAS GIGANTES

BERNARDO DA FONSECA ORCINA¹; EZEQUIEL AZEVEDO SCHEMMFELNNIG²;
JOÃO DE JESUS VIANA PINHEIRO³; ADRIANA ETGES⁴

¹*Universidade Federal de Pelotas – bernardoforcina@outlook.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – ezequielazevedosch@gmail.com*

³*Universidade Federal do Pará – radface@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – aetges@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O granuloma central de células gigantes (GCCG) é definido como uma lesão benigna intraóssea da mandíbula. Sua localização mais comum é na porção anterior da mandíbula, afetando particularmente mulheres com menos de 30 anos (VERED; WRIGHT, 2022). Embora sua etiologia permaneça incompletamente compreendida, o GCCG ocasionalmente exibe comportamento osteolítico agressivo, resultando em dor, crescimento rápido, grande inchaço, reabsorção radicular, perfuração cortical e deslocamento dentário (CHUONG et al., 1986; VERED; WRIGHT, 2022). O exame histopatológico revela uma proliferação não encapsulada de células mononucleares fusiformes e poligonais acompanhadas por células gigantes multinucleadas de osteoclastos em um cenário vascular. Extravasamento de eritrócitos e pigmento de hemossiderina são frequentemente observados, bem como formação de osteoides (VERED; WRIGHT, 2022).

Já o granuloma periférico de células gigantes (GPCG) é uma lesão reativa localizado fora do osso, comumente encontrado na gengiva ou na mucosa da crista alveolar (VERED; WRIGHT, 2022). Normalmente, surge devido à irritação local do mucoperiósteo ou da porção coronal do ligamento periodontal, com maior incidência na mandíbula em comparação à maxila (VERED; WRIGHT, 2022). GPCG não exibe predileção significativa entre sexo e se manifesta em uma ampla faixa etária (LESTER et al., 2014). O exame histopatológico revela uma proliferação não encapsulada de células mononucleares fusiformes e poligonais, acompanhadas por células multinucleadas de osteoclastos, inseridas em um fundo vascularizado, frequentemente caracterizado por hemorragia abundante. Além disso, depósitos de pigmento de hemossiderina e osso imaturo são comumente observados (VERED; WRIGHT, 2022).

Invadopódios são estruturas celulares invasivas baseadas em actina que residem na superfície celular e têm a capacidade de perfurar a matriz extracelular subjacente (ECM), degradando-a enzimaticamente. Essas estruturas estão implicadas em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a remodelação de tecidos e invasão metastática (REVACH et al., 2020). Apesar dos avanços, os mecanismos que definem a formação do invadopódio permanecem incompreendidos na sua totalidade (REVACH et al., 2020). No entanto, é reconhecido que a via da tirosina quinase e proteínas relacionadas à organização do citoesqueleto de actina, como a tirosina quinase 4 (TKs4), tirosina quinase 5 (TKs5) e cortactina, desempenham papéis essenciais na gênese desses alongamentos protrusivos da membrana celular (MITRE et al., 2021; REVACH et al., 2020). A cortactina é uma proteína citoplasmática de ligação que realiza o rearranjo e a polimerização do citoesqueleto de actina (DA SILVA et al., 2022; MITRE et al., 2021). Já a TKs5 preside os alongamentos de invadopódio e regula a atividade proteolítica associada à cortactina (RIBEIRO et al., 2016). A TKs4 recruta a metaloproteinase de matriz tipo 1 da membrana (MT1-MMP), iniciando assim a degradação e invasão da matriz (MITRE

et al., 2021). A polimerização contínua do citoesqueleto de actina é hipotetizada para empurrar a membrana do invadopódio para fora e facilitar sua penetração na MEC vizinha (REVACH et al., 2020).

Assim, dadas suas características histopatológicas compartilhadas e o potencial para comportamento invasivo no GCCG, este estudo visa comparar a imunoexpressão das principais proteínas relacionadas aos invadopódios — cortactina, TKs4, TKs5 e MT1-MMP — entre amostras de GCCG e GPCG, com o objetivo de contribuir para a compreensão de seu comportamento distinto.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal multicêntrico envolvendo os casos de GCCG e GPCG das instituições Universidade Federal de Pelotas, através do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca, Universidade Centro de Patologia Oral e Maxilofacial do Pará e da Universidade Federal do Pará.

As lâminas de 30 amostras de GCCG e 12 amostras GPCG foram desparafinizadas em xanol antes de serem hidratadas em soluções decrescentes de etanol. Elas foram então submersas em uma mistura 1:1 de 6% de peróxido de hidrogênio e metanol por 20 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada em uma câmara de pressão Pascal (Dako) por 30 segundos em tampão citrato (pH 6,0). Sítios de ligação não específicos foram bloqueados por 1 hora em solução salina tamponada com fosfato com 1% de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich). Tecidos de GCCG e GPCG foram tratados por 1 hora com Anti-TKS5 primário (1:100; Sigma), Anti-cortactina (1:50; Sigma), Anti-TKS4 (1:25; Biorbyte) e Anti-MT1-MMP (1:25; R&D Systems). O sistema de detecção EnVision + (Dako) foi usado para incubar as lâminas por 30 minutos.

O cromógeno foi diaminobenzidina (DAB; Dako). Após coloração com hematoxilina de Mayer (Sigma), as lâminas foram montadas com Permount (Fisher Scientific). Amostras de carcinoma espinocelular oral foram usadas como controle positivo. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune.

O software *ImageJ* (NIH) foi usado para avaliar a imunocoloração. A análise semiautomática de imagens foi realizada em cinco fotos obtidas aleatoriamente da região epitelial de cada amostra e salvas no formato TIFF. De acordo com Shu et al. (2016), o plugin IHC Toolbox foi usado para identificar a cor da coloração DAB, que pode ser usada de forma eficiente para avaliar materiais corados imuno-histoquimicamente. Para esta investigação, o modelo de detecção de pixel marrom foi modificado. As fotos são transformadas em arquivos de 8 bits quando o computador reconhece a coloração causada pela reação DAB. A intensidade média dos pixels em tons de cinza é então mostrada usando inversão de cores, que gera uma porcentagem de marcação por área, permitindo comparações. A quantificação foi realizada em células gigantes multinucleadas (CGM) e separadamente em células mononucleadas fusiformes e poligonais (SPMC) que circundam células gigantes multinucleadas.

O software GraphPadPrism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para avaliar os dados coletados. A distribuição dos dados foi confirmada usando o teste de Shapiro-Wilk. Quando a distribuição era paramétrica, o teste *t* de Student foi usado para comparar as diferenças entre os grupos de estudo; em distribuições não paramétricas, o teste de Mann-Whitney foi empregado. A significância estatística foi definida como um valor de *p* de 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando a imunoexpressão entre as CGM e SPMC de GCCG e GPCG foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas CGM de cortactina, MT1-MMP, TKS4 e TKS5 e nas SPMC apenas em cortactina e TKS5.

De acordo com Mitre et al. (2021), as quatro proteínas avaliadas são provavelmente as mais significativas na ligação cruzada da atividade do invadopódio. Dos 30 casos avaliados com GCCG, 23 (76,66%) eram mulheres e 7 (23,33%) eram homens, com média de idade de 33,7 anos; a média de idade é ligeiramente superior à da literatura, mas próxima, mostrando também a alta prevalência de lesões centrais em mulheres (CHRCANOVIC et al., 2018). Nas GPCG, 6 casos eram homens (50%) e 6 eram mulheres (50%), com média de idade de 31,08 anos.

Lesões tumorais compreendem um microambiente celular heterogêneo e componentes não celulares, sendo esse conjunto denominado de microambiente tumoral (POLTAVETS et al., 2018). Devido ao aumento da expressão de proteínas no GCCG, acredita-se que o aspecto intraósseo dessas lesões favoreça a criação de um ambiente que induza essa exacerbação.

A cortactina atua na conjugação de várias proteínas necessárias para a montagem dos invadopódios em seu local de iniciação, porque participa da montagem do núcleo invadopodial, onde por meio de seu recrutamento sustentará Arp23, Cofilina e N-WASP na membrana (MADER et al., 2011). A maior expressão da cortactina em CGM e SPMC em GCCG pode contribuir para a destruição local da lesão, aumentando sua expressão no local da invasão. A superexpressão dessa proteína em algumas lesões odontogênicas (DA SILVA et al., 2022; RIBEIRO et al., 2016), assim como nas avaliadas em CGM e SPMC possivelmente ajudam a elucidar o comportamento destrutivo local da GCCG.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são a família mais importante de enzimas na clivagem e degradação de todos os componentes da matriz extracelular e pericelular e na geração de moléculas bioativas (BAUVOIS, 2012). Dada sua importância na formação dos invadopódios e na degradação da matriz extracelular, bem como sua presença em várias patologias odontogênicas que exibem comportamento destrutivo local, a expressão de MT1-MMP em CGM nos GCCG pode ajudar a explicar o seu comportamento clínico semelhante.

As proteínas adaptadoras TKs são reguladoras essenciais de vários processos fisiológicos e patológicos, atuando como estruturas que aproximam a membrana e os componentes celulares de estruturas como podossomos e invadopódio. A TKS5 atua como precursora da formação de invadopódio, mediando a invasão celular (SAINI; COURTNEIDGE, 2018). Também, atua como uma proteína de andaime para polimerização de actina, recrutando Nck1 e Nck2, mediando a ativação de NWASp e Arp2/3 (STYLLI et al., 2009). Além disso, facilita a geração localizada de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de promover a localização e ativação de proteases no invadopódio (SAINI; COURTNEIDGE, 2018). Já a TKS4 é responsável pela localização, secreção e estabilização de MT1-MMP, promovendo a proteólise da matriz extracelular e mediando a invasão tumoral (COURTNEIDGE, 2012). Em nosso estudo, a diferença estatística na TKS4 foi apenas nas CGM, enquanto na TKS5 foi nas CGM e SPMC. Esse aumento estatisticamente maior nas GCCG em comparação à GPCG é possivelmente explicado pelos diferentes comportamentos biológicos das duas patologias.

4. CONCLUSÕES

A análise imunohistoquímica mostrou evidências preliminares de um aumento estatisticamente significativo na expressão de cortactina (CGM, SPMC), TKS4 (CGM),

TKS5 (CGM, SPMC) e MT1-MMP (CGM) em GCCG, o que provavelmente ajuda a explicar o comportamento biológico dessas lesões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VERED, M.; WRIGHT, J.M. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. **Head Neck Pathol**, v.16, n.1, p.63-75, 2022.
- CHUONG, R.; KABAN, L.B.; KOZAKEWICH, H.; PEREZ-ATAYDE, A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.44, p.708-713, 1986.
- LESTER, S.R.; CORDELL, K.G.; ROSEBUSH, M.S.; PALAIODOGOU, A.A.; MANEY, P. Peripheral giant cell granulomas: a series of 279 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.118, n.4, p.475-482, 2014.
- REVACH, O.Y.; GROSHEVA, I.; GEIGER, B. Biomechanical regulation of focal adhesion and invadopodia formation. **J Cell Sci**, v.133, n.20, 2020.
- MITRE, G.P.; BALBINOT, K.M.; RIBEIRO, A.L.R.; DA SILVA KATAOKA, M.S.; DE MELO ALVES JÚNIOR, S.; DE JESUS VIANA PINHEIRO, J. Key proteins of invadopodia are overexpressed in oral squamous cell carcinoma suggesting an important role of MT1-MMP in the tumoral progression. **Diagn Pathol**, v.16, n.1, p.33, 2021.
- DA SILVA, K.D.; NEUTZLING GOMES, A.P.; BALBINOT, K.M.; SENA, Y.R.; MOSCONI, C.; DE MENDONÇA, E.F. et al. Glandular odontogenic cysts: A collaborative investigation of 22 cases and proteins related to invasiveness. **J Oral Pathol Med**, v.51, n.4, p.342-349, 2022.
- RIBEIRO RIBEIRO, A.L.; DA COSTA, N.M.; DE SIQUEIRA, A.S.; BRASIL DA SILVA, W.; DA SILVA KATAOKA, M.S.; JAEGER, R.G. et al. Keratocystic odontogenic tumor overexpresses invadopodia-related proteins, suggesting invadopodia formation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.122, n.4, p.500-508, 2016.
- SHU, J.; DOLMAN, G.E.; DUAN, J.; QIU, G.; ILYAS, M. Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers. **Biomed Eng Online**, v.15, p.1-16, 2016.
- CHRCANOVIC, B.R.; GOMES, C.C.; GOMEZ, R.S. Central giant cell lesion of the jaws: An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. **J Oral Pathol Med**, v.47, n.8, p.731-739, 2018.
- POLTAVETS, V.; KOCHETKOVA, M.; PITSON, S.M.; SAMUEL, M.S. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. **Front Oncol**, v.8, p.431, 2018.
- MADER, C.C.; OSER, M.; MAGALHAES, M.A.; et al. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. **Cancer Res**, v.71, p.1730-1741, 2011.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochem Biophys Acta**, v.1825, p.29-36, 2012. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.08.002.
- SAINI, P.; COURTNEIDGE, S.A. Tks Adaptor Proteins at a Glance. **J Cell Sci**, v.131, 2018.
- STYLLI, S.S.; STACEY, T.T.; VERHAGEN, A.M.; et al. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. **J Cell Sci**, v.122, p.2727-2740, 2009.
- COURTNEIDGE, S.A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. **Biochem Soc Trans**, v.40, p.129-132, 2012.