BIANCA DE FÁTIMA BORIM PULINO

**Expressão imuno-histoquímica da β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos
ameloblastomas**

São Paulo

2013

BIANCA DE FÁTIMA BORIM PULINO

**Expressão imuno-histoquímica da β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos
ameloblastomas**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior

São Paulo

2013

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

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

Pulino, Bianca de Fátima Borim.

Expressão imuno-histoquímica da β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos ameloblastomas / Bianca de Fátima Borim Pulino; orientador Décio dos Santos Pinto Junior. -- São Paulo, 2013.

69 p.: il.: fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Ameloblastoma. 2. Imunohistoquímica. 3. Proliferação celular. 4. Proteínas.
I. Pinto Junior, Décio dos Santos. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pulino BFB. Expressão imuno-histoquímica da β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos ameloblastomas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais João e Dulcinea,
por estarem sempre ao meu lado, nos momentos de felicidade
e também nas dificuldades, sempre me apoiando e
mostrando o lado positivo da vida!*

*Obrigada pelo incentivo e auxílio em todos os sentidos, por me
ensinarem valores essenciais para meu crescimento pessoal e
profissional!!*

Muito obrigada por tudo!!!

*Agradeço minha irmã Beatriz,
pela sua torcida e apoio constante!*

*Agradeço muito a Deus por estar sempre ao meu lado, me guiar pelos
melhores caminhos e pelas oportunidades que me concede tanto para o
meu crescimento pessoal e profissional!*

Ao meu grande amigo João Felipe Moraes dos Santos, por ter despertado em mim o amor pela Estomatologia e ser o primeiro incentivador em seguir a carreira acadêmica. Sempre foi um exemplo pela sua dedicação profissional e respeito aos pacientes. Obrigada por todos os ensinamentos que me transmite na Cirurgia e Estomatologia! Muito obrigada pela amizade, conselhos e paciência!!

Aos amigos queridos que fiz durante esse período de pós-graduação, muito obrigada por dividirem conhecimentos, conselhos, bate-papos e experiências profissionais, pelo auxílio para a conclusão deste trabalho e por tornarem meus dias melhores por ter vocês ao meu lado!

Carina, Rita, Karín, Fabiana, Márcio, Nathálie, Lília, Juvani, Michela, Carol Vilela e Gabriela muito obrigada por tudo!!!

À amiga Alessandra Camargo por todo apoio, companhia e auxílio durante a realização deste trabalho!! Por sua disponibilidade em ajudar sempre e as valiosas opiniões que foram dadas na finalização desta dissertação! Muito obrigada!!

Aos amigos que já concluíram essa fase da pós-graduação e que deixaram muitas saudades pelo convívio diário. Carla, Gustavo e Ana Cláudia, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!!

Agradeço ao Marcelo Teixeira Passetto, pela compreensão e por permitir minha ausência no hospital inúmeras vezes, para que este trabalho pudesse ser concluído! Muito obrigada!

*Agradeço a amiga e colega de trabalho **Lúcia Regina Di Felice** por toda ajuda durante esse período, fazendo meus plantões e também compreendendo minha ausência! Obrigada pela amizade e por tornar meus dias **muito** mais divertidos!!!*

Agradeço a todos os colegas de trabalho do Hospital de Ensino Padre Anchieta pelo apoio durante esse período!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, por ter me aceitado como aluna nesta instituição, por ter confiado e acreditado em mim. Agradeço a oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelos ensinamentos valiosos e compreensão nos momentos de ausência, para que pudesse conciliar o trabalho com os estudos. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** e a **Profa. Dra. Andréa Mantesso** pelas sugestões durante este trabalho e por me ceder alguns anticorpos para esta pesquisa.

A **Profa. Dra. Suzana C. O. Machado de Souza** pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pelo exemplo de conduta profissional.

Aos Profs. Drs. Da Disciplina de Patologia Bucal **Marina H. C. Gallottini**, **Marília T. Martins**, **Karem Ortega**, **Nathalie Pepe Medeiros de Rezende**, por todo aprendizado, constante apoio e agradável convivência e companheirismo.

A **Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini** e a **Fabiana Martins**, por ter cedido um anticorpo para que se tornasse possível a confecção uma parte deste trabalho.

A **Profa. Dra. Jossi Ledo Kanda**, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado no Hospital de Ensino Padre Anchieta, por transmitir seus conhecimentos na Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pela compreensão e incentivo durante esse período.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pelos momentos que pudemos dividir nossas alegrias e anseios, pela troca de experiências e convívio agradável!

Aos queridos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal, **Zilda, Néia, Nair, Elisa, Juvani e Adriana**, pelo carinho e atenção. Agradeço pelos ensinamentos no laboratório, auxílio fundamental para que este trabalho fosse concluído!

Ao **Serviço de Documentação Odontológica** pela ajuda na formatação do trabalho.

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

(Antonie de Saint Exupéry)

RESUMO

Pulino BFB. Expressão imuno-histoquímica da β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos ameloblastomas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida.

O ameloblastoma é definido como um tumor odontogênico epitelial de crescimento lento e localmente invasivo, que acomete os maxilares com alta taxa de recorrência quando não removido adequadamente. Este trabalho tem por objetivo estudar as expressões imuno-histoquímicas das proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina em ameloblastomas. Para este estudo foram selecionados 40 casos de ameloblastoma, pertencentes aos arquivos do Serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. Para a realização das reações imuno-histoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti- β -catenina, anti-pAkt, anti-CD44 e anti-vimentina separadamente. O padrão de marcação celular da β -catenina nos ameloblastomas foi: marcação citoplasmática, nuclear e de membrana em 33 (82,5%) casos, marcação citoplasmática e de membrana em 7 (17,5%) casos; quanto à sua localização, em 21 (52,5%) casos marcações central e periférica, em 15 (37,5%) casos observou-se marcação central, em, 4 (10%) marcação periférica. Com relação à proteína p-AKT em 36 (90%) casos o padrão de marcação celular foi citoplasmático, sendo em 4 (10%) casos evidenciado o padrão citoplasmático e nuclear. De todos os casos analisados quanto a localização da marcação do p-AKT, 23 (57,5%) casos com marcação nas áreas central e periférica e 17 (42,5%) apresentaram marcação periférica. Nenhuma das lâminas estudadas apresentou marcação exclusiva em áreas centrais da lesão. Para a proteína CD44, 27 (67,5%) casos dos ameloblastomas estudados apresentou marcações citoplasmática e de membrana, enquanto 13 (32,5%) casos mostraram apenas marcações citoplasmáticas. No que diz respeito a localização, 28 (70%) casos apresentaram marcações centrais e periféricas concomitantes, 11 (27 %) casos marcações centrais, e 1 (2,5%) caso marcação periférica. 37 (92,5%) dos casos incluídos nesta pesquisa apresentou marcação citoplasmática para vimentina, sendo 3 (7,5%) casos negativos para a proteína. Dentre os casos com positividade, 22 (55%) referiram-se à região central 14 (7,5%) para as regiões central e periférica ,

e 1 (2,5%) caso para a região periférica. De acordo com os resultados obtidos, acredita-se que as áreas central e periféricas do tumor possuem células responsáveis pela proliferação e invasividade do tumor, assim como a presença de células tronco responsáveis pela invasividade do tumor, também estão presentes nessas áreas.

Palavras-chave: Ameloblastoma. Imuno-histoquímica. Proliferação de células. beta-Catenina.

ABSTRACT

Pulino BFB. Expression immunohistochemistry of β -catenin, p-Akt, CD44 and vimentin in ameloblastomas [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida.

The ameloblastoma is defined as an epithelial odontogenic tumor of slow growth, and locally invasive, affecting the jaws with a high rate of recurrence if not removed properly. This study aims to study the immunohistochemical expression of the protein β -catenin, p-Akt, CD44 and vimentin in ameloblastomas. For this study we selected 40 cases of ameloblastoma, from the archives of the Pathology of Oral Pathology FOU SP. To carry out the reactions immunohistochemical technique was used streptavidin-biotin and cuts subjected to anti- β -catenin, anti-pAkt, anti-CD44 and anti-vimentin separately. The pattern of cell labeling of β -catenin in ameloblastomas was: cytoplasmic, nuclear and membrane in 33 (82.5%) cases, cytoplasmic membrane in 7 (17.5%) cases, as regards its location in 21 (52.5%) cases markings central and peripheral in 15 (37.5%) cases observed central marking in, 4 (10%) peripheral marking. With respect to the p-AKT protein in 36 (90%) cases, the staining pattern was cytoplasmic cell, and 4 (10%) patients demonstrated the nuclear and cytoplasmic pattern. In all cases analyzed as marking the location of the p-AKT, 23 (57.5%) cases with marking the central and peripheral areas and 17 (42.5%) had peripheral marking. None of the studied thin sections show labeling exclusively in the central areas of the lesion. For protein CD44, 27 (67.5%) cases of ameloblastomas studied showed markings and cytoplasmic membrane, while 13 (32.5%) cases showed only cytoplasmic markings. Regarding localization, 28 (70%) presented concomitant central and peripheral markings, 11 (27%) patients central markings, and 1 (2.5%), peripheral marking case. 37 (92.5%) of the cases included in this study showed cytoplasmic staining for vimentin, and 3 (7.5%) cases negative for protein. Among the positive cases, 22 (55%) referred to the central 14 (7.5%) for the central and peripheral, and 1 (2.5%) case for the peripheral region. According to the obtained results, it is believed that central and peripheral areas of the tumor cells have responsible for the proliferation and invasiveness of the tumor, as well as the

presence of stem cells responsible for tumor invasiveness, are also present in these areas.

Keywords: Ameloblastoma. Immunohistochemistry. Cell proliferation. beta-Catenin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 – Ilustração representa as características histológicas do ameloblastoma unicístico: luminal (cisto é revestido pelo epitélio ameloblástico); intraluminal (aumento de volume intraluminal que surge a partir da parede cística); mural (epitélio ameloblástico invade a parede cística).....28
- Figura 2.2 – Representação esquemática da β -catenina. A proteína contém sítios de ligação para a α -catenina, APC e E-caderina e um sítio de fosforilação para a GSK-3 β . A β -catenina também contém 12 repetições Armadillo de 42 aminoácidos e ainda um domínio de transativação de genes que levam à proliferação celular na porção C-terminal.....31
- Figura 2.3 – Via de sinalização Wnt/ β -catenina dependente. **A** – estado basal não estimulado. **B** – Estado estimulado pela indução da β -catenina; expressão de genes alvo TCF.....33
- Figura 2.4 – Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Ser473).....34
- Figura 2.5 – Atuação da proteína Akt na célula.....35
- Figura 5.1 – Características histológicas do ameloblastoma do tipo folicular (A/B) e do tipo plexiforme (C/D). (A) Presença de ilhas de epitélio ameloblástico composto por células colunares dispostas em paliçada com núcleos de polaridade invertida na periferia das ilhotas. (B) No centro da lesão, as células apresentavam um padrão frouxo, semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte (C) Presença de ilhas epiteliais que se intercomunicam formando cordões ou ilhas de epitélio odontogênico. (D) As ilhas epiteliais são delimitadas por células colunares ou cúbicas, com polarização reversa, semelhantes a ameloblastos.....49
- Figura 5.2 – Marcação imuno-histoquímica para β -catenina (A/B) e p-Akt (C/D) em ameloblastomas. (A) Marcação positiva para β -catenina nas células colunares periféricas e centrais. (B) Marcação nuclear para β -catenina nos ninhos de células poliédricas no centro do tumor. (C;D) Marcação positiva para p-Akt nas células colunares periféricas.....50

Figura 5.3 – Marcação imuno-histoquímica para CD44 (E/F) e vimentina (G/H) em ameloblastomas. (E) Marcação positiva para CD44 nas células poliédricas no centro do tumor. (F) Marcação positiva para CD44 nos ninhos de células poliédricas no centro do tumor. (G;H) Marcação positiva para vimentina nas células colunares periféricas.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	– Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas em ameloblastomas em material parafinado.....	42
Tabela 5.1	- Resultados referentes a marcação intracelular nas proteínas β catenina, p-Akt, CD44 e vimentina.....	49
Tabela 5.2	– Resultados referentes a localização de marcação celular nas proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Ameloblastoma.....	21
2.1.1 Ameloblastoma intra-ósseo sólido/convencional/multicístico.....	24
2.1.2 Ameloblastoma extra-ósseo/periférico.....	25
2.1.3 Ameloblastoma unicístico.....	26
2.1.4 Ameloblastoma desmoplásico.....	27
2.2 Estudos sobre o comportamento biológico dos ameloblastomas.....	28
2.3 β-catetina.....	29
2.4 Akt.....	32
2.5 CD44.....	34
2.6 Vimentina.....	35
3 PROPOSIÇÃO.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Materiais.....	39
4.1.1 Análise morfológica.....	39
4.1.2 Reações imuno-histoquímica.....	40
4.1.3 Análise de resultados.....	42
5 RESULTADOS.....	43

5.1 Análise morfológica.....	43
5.2 Resultados para análise imuno-histoquímica.....	44
5.2.1 Análise dos resultados para proteína β -catetina.....	45
5.2.2 Análise dos resultados para proteína p-Akt.....	45
5.2.3 Análise dos resultados para proteína CD44.....	45
5.2.4 Análise dos resultados para proteína vimentina.....	46
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma foi descrito por Broca em 1868, é definido pela Organização Mundial da Saúde como um tumor odontogênico epitelial de crescimento lento e localmente invasivo, que acomete os maxilares com alta taxa de recidiva quando não removido adequadamente.(1)

A etiologia é desconhecida, porém a desregulação de vários genes pode estar envolvida na patogênese da lesão, e podem desempenhar um importante papel na etiologia da doença. A origem da lesão é controversa, e diversas são as hipóteses consideradas, tais como: origem a partir do órgão do esmalte, remanescentes epiteliais, células basais do epitélio de superfície ou cistos do epitélio odontogênico. Contudo, a teoria mais aceita é de que a origem dos ameloblastomas ocorra a partir da lâmina dental.(2)

De acordo com a última classificação realizada pela Organização Mundial da Saúde, em 2005, foram reconhecidas quatro variantes para os ameloblastomas, sendo: ameloblastomas sólido/multicístico, ameloblastomas extra-ósseo/periférico, ameloblastomas unicístico e ameloblastomas desmoplásico. O agrupamento dessas variantes se fez necessário, devido as particularidades e diferenças nas características histológicas, sítio anatômico, aspecto radiográfico, e abordagem terapêutica e prognóstico.(3)

Até o momento, diversos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar a origem e o comportamento biológico desse grupo de lesões, visando otimizar a abordagem terapêutica e os prognósticos de tratamentos aos pacientes acometidos por esta neoplasia benigna. Diante do exposto, este estudo analisou a expressão imuno-histoquímica das proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina com o objetivo de elucidar o comportamento biológico do ameloblastoma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ameloblastomas

O ameloblastoma foi primeiramente descrito por Broca em 1868 e recebeu esse termo por Churchill em 1934 (4). Diversas eram as formas de classificação até o momento, e a partir de 1971, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a classificar a lesão como uma neoplasia benigna por causa do seu comportamento biológico. Em 1992, a OMS propôs uma nova classificação, e o ameloblastoma passou a fazer parte de um grupo de lesões, na qual a proliferação neoplásica do epitélio odontogênico ocorre sem a participação de elementos do ectomesênquima.(5)

A partir de 2005, ano da última classificação estabelecida pela OMS, o ameloblastoma passou a ser qualificado como um grupo heterogêneo de lesões, dividido em quatro variantes: o ameloblastoma sólido / multicístico, o ameloblastoma extra-ósseo/periférico, o ameloblastoma desmoplásico e o ameloblastoma unicístico.(6)

Definido como um tumor odontogênico benigno formado a partir do epitélio odontogênico, os ameloblastomas acometem predominantemente a mandíbula (5:1), com uma predileção pela região de ramo. Quando em maxila, a região anterior representa o sítio mais acometido, sendo homens e mulheres afetados de forma equalitária, apesar de alguns trabalhos relatarem um leve predomínio pelo sexo masculino. Apesar de acometer uma ampla faixa etária, a maior parte dos diagnósticos ocorre entre as 3ª e 5ª décadas de vida, sendo a lesão rara em pacientes abaixo dos 20 anos de idade.(7)(8)(9)

Radiograficamente o tumor pode exibir um aspecto multilocular com padrão de bolhas de sabão ou favos de mel. As loculações podem ser ovais ou arredondadas e de variadas dimensões. A esclerose cortical irregular nas margens do tumor é um achado típico, e quando o desenvolvimento da lesão ocorre em localização adjacente aos dentes, a perda de lâmina dura, reabsorção radicular e o deslocamento dental podem ser características comumente observadas.(10)

Diversas hipóteses já foram aventadas para elucidar a patogênese dos ameloblastomas, estando a maior parte delas relacionadas à reativação de estruturas envolvidas na odontogênese, tais como remanescentes da lâmina dental, o epitélio reduzido do órgão do esmalte, células da camada basal da mucosa oral ou o revestimento epitelial de um cisto dentífero, restos epiteliais de Malassez e até mesmo alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento normal dos dentes (11) (3). Dentre tantas teorias, a suposição mais aceita sugere que a origem do tumor seja relacionada aos remanescentes da lâmina dental. Mesmo assim novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese. (9)

Uma das características mais importantes dos ameloblastomas diz respeito ao seu comportamento biológico localmente invasivo (3). Essas são lesões caracteristicamente expansivas, com limites radiográficos festonados, bem definidos na maior parte dos casos, que muitas vezes levam à perfuração da cortical óssea com invasão dos tecidos moles adjacentes.(10)

Segundo a literatura, fatores como a idade do paciente, a localização do tumor e as características imagenológicas, podem influenciar o prognóstico desses tumores.(6) Sabe-se que muitas vezes o tratamento dos ameloblastomas consta de uma abordagem radical, explicada, em parte, pelo comportamento biológico agressivo e localmente invasivo do tumor.(10)

De modo geral as variantes do ameloblastoma apresentam características clínicas em comum, tais como: o abaulamento intra ou extra-oral assintomático das tábuas ósseas, hipostesia, mobilidade dentária, alteração oclusal, dor e rompimento da mucosa gengival (12). Para lesões intra-ósseas, geralmente a mucosa adjacente mantém seu aspecto de normalidade, sendo que raras vezes processos infecciosos e solução de continuidade estão presentes. Desta maneira, não é incomum que na maioria dos casos o diagnóstico seja efetuado por meio de um exame de imagem. (13)

Como a região de ramo mandibular normalmente é a mais acometida pelo tumor, a sua associação com dentes inclusos, especialmente o 3º molar, é verificada. Nestas circunstâncias o diagnóstico diferencial com o cisto dentífero deve ser considerado (14). Para lesões multiloculares os diagnósticos diferenciais de tumor odontogênico queratocístico, mixoma, querubismo, lesão central de células gigantes, também devem ser considerados.(15)

A classificação dos ameloblastomas deve ser baseada não apenas nas características clínicas, mas também nas histopatológicas e imagenológicas do tumor. Só assim a conduta terapêutica adequada pode ser tomada de forma segura para cada caso.(16)

Por exemplo para Olaitan et al, o tratamento inicial conservador poderia ser indicado para pequenas lesões de pequenas dimensões em corpo mandibular, desde que não apresentem o envolvimento da borda inferior e regiões anteriores de mandíbula e maxila, no qual há envolvimento de áreas estéticas. Já para as lesões em maxila que estão próximas, ou atingem estruturas paracranianas, a ressecção passa a ser a técnica preconizada independente do tamanho do tumor. (1)

De maneira geral, o tratamento radical é o que fornece maior índice de cura, mas trata-se de um procedimento mais invasivo, que frequentemente esta associado a cirurgias reconstrutivas. Ao se considerar ao alto índice de recidiva a doença como único critério de sucesso do tratamento, esta abordagem é a que oferece melhores resultados. Já o tratamento conservador baseia-se em uma abordagem cirúrgica de menor morbidade. Entretanto, o índice de recidiva tende a ser maior neste grupo de pacientes.(10)

Microscopicamente o ameloblastoma é composto por ninhos, ilhas e cordões de epitélio ameloblástico, todos separados por quantidade relativamente pequena de estroma de tecido conjuntivo fibroso (10). De acordo com suas características clínico-imagenológica-histopatológicas, a lesão pode ser classificada em:

1. Ameloblastoma intra-ósseo sólido/convencional/multicístico;
 - a) Folicular
 - b) Plexiforme
 - c) Acantomatoso
 - d) Células granulares
 - e) Células basais
2. Ameloblastoma extra-ósseo / periférico;
3. Ameloblastoma unicístico;

4. Ameloblastoma desmoplásico;

2.1.1 Ameloblastoma intra-ósseo sólido/convencional/multicístico

Os ameloblastomas sólidos/multicísticos apresentam padrões histopatológicos variáveis, que podem estar presentes isolados ou simultaneamente em uma mesma lesão. O tumor pode ser caracterizado por proliferações de células epiteliais, com núcleos de polaridade invertida, semelhantes a ameloblastos, que se localizam na periferia dos ninhos, ilhas ou cordões de epitélio ameloblástico, separados por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo fibroso.(5)

Os padrões histopatológicos dos ameloblastomas sólidos / multicísticos ainda podem ser agrupados em 5 subtipos:

a) Folicular: padrão histopatológico mais comum. Nele, ilhas de células epiteliais, semelhantes ao epitélio do órgão do esmalte, encontram-se imersas em um estroma de tecido conjuntivo fibroso. Na periferia dessas ilhas, células colunares de polarização reversa são encontradas e na porção central muitas vezes pode ser comum a formação de cistos e microcistos. Atividade mitótica e pleomorfismo celular são raramente notados.(3)

b) Plexiforme: padrão caracterizado por longos cordões de epitélio ameloblástico, que por vezes se anastomosam formando lençóis de epitélio odontogênico. Estes cordões ou lençóis encontram-se delimitados por células colunares ou cúbicas, com polarização reversa, semelhantes a ameloblastos. O estroma de sustentação tende a ser vascularizado e arranjado frouxamente. A formação cística é rara nesta variedade.(17) Assim como no padrão folicular, atividade mitótica e pleomorfismo celular raramente ocorrem.(3)

c) Acantomatoso: este padrão ocorre quando existem áreas de metaplasia escamosa, muitas vezes associadas à formação de queratina nas porções centrais de ilhas epiteliais de um ameloblastoma folicular.(3)

d) Células Granulares: caracterizado pela presença de células granulares que passam a apresentar citoplasma abundante e grânulos eosinofílicos, cujas características estruturais se assemelham aos lisossomos. Estes grânulos podem aparecer nas células centrais do tumor e por vezes em todas as células das ilhotas.(17)

e) Células Basais: subtipo menos comum da variante sólida/multicística. As lesões são compostas por ninhos de células basalóides uniformes e de células cuboidais periféricas, histopatologicamente muito semelhante ao carcinoma basocelular de pele. Não há presença de retículo estrelado na porção central dos ninhos e as células da periferia tendem a ser cúbicas ao invés de colunares.(17)

2.1.2 Ameloblastoma extra-ósseo/periférico

O ameloblastoma extra-ósseo/periférico apresenta as mesmas características histopatológicas de um ameloblastoma intra-ósseo, porém com desenvolvimento em gengiva ou em mucosa alveolar. Sendo assim, as lesões consistem de um epitélio odontogênico com características morfológicas semelhantes ao ameloblastoma sólido/multicístico, sem continuidade com o tecido ósseo, e imersas em um tecido conjuntivo gengival. O estroma é caracterizado por um tecido conjuntivo maduro e fibroso.(3)

Clinicamente a apresenta-se como uma massa nodular, pediculada ou séssil, não ulcerada e indolor à palpação. Em alguns casos o osso subjacente pode apresentar uma reabsorção com imagem radiográfica identificada como uma depressão em forma de pires.(17)

O bom prognóstico associado a variante deve-se pelo diagnóstico precoce em detrimento a outras variantes, e a ausência de comunicação com o

osso medular. Nessas situações o osso cortical provavelmente promovia uma barreira física à progressão e invasão tumoral.(11)

2.1.3 Ameloblastoma unicístico

Citada por Robson e Martinez em 1977 como uma entidade distinta de outras lesões com aspecto cístico, em 1980 Gardner e Pecak, definiram o tumor como uma lesão cística com as seguintes situações:

- Epitélio de revestimento ameloblastoso;
- Um ou mais nódulos de projeção ameloblástica no lúmen cístico;
- Epitélio ameloblástico de revestimento proliferado no tecido conjuntivo da parede do cisto;

A variante pode ser ainda agrupada em 3 subtipos, à saber:

- a) Luminal
- b) Intraluminal
- c) Mural

a) **Luminal:** o tumor encontra-se confinado à superfície luminal do cisto, ou seja, a lesão consiste na parede fibrosa do cisto com um limitante constituído parcial ou totalmente pelo epitélio ameloblástico. É constituído por uma camada basal de células cúbicas ou colunares, com núcleos hipercromáticos que mostram, polarização invertida e vacuolização do citoplasma basilar. A disposição da camada basal relembra o retículo estrelado do órgão do esmalte.(17)

b) **Intraluminal:** um ou mais nódulos de ameloblastoma projetam-se do limite cístico para a luz do cisto. Os nódulos podem ser pequenos ou grandes, o suficiente para preencher a luz do cisto. Este subtipo, algumas vezes é classificado como ameloblastoma unicístico/plexiforme, devido à projeção para a luz do cisto apresentar um aspecto plexiforme.(18)

- c) **Mural:** a parede fibrosa do cisto é infiltrada por ameloblastoma com características foliculares ou plexiformes. A profundidade e a extensão da infiltração podem variar consideravelmente, sendo necessários vários cortes histológicos para determinar a extensão do tumor.(17)

A figura 2.1, apresenta as características histológicas acima descritas.

Conclui-se assim que o diagnóstico do ameloblastoma unicístico só pode ser emitido frente a análise completa da peça, quando também verifica-se a infiltração da cápsula pelo ameloblastoma. Sendo assim, a biópsia incisional serve apenas com indicador diagnóstico.(19)

Segundo a literatura, o ameloblastoma unicístico apresenta um comportamento biológico menos agressivo, com menor tendência a recidiva e melhor prognóstico quando comparado ao ameloblastoma sólido/multicístico.

Figura 2.1 – Ilustração representa as características histológicas do ameloblastoma unicístico: luminal (cisto é revestido pelo epitélio ameloblástico); intraluminal (aumento de volume intraluminal que surge a partir da parede cística); mural (epitélio ameloblástico invade a parede cística) (Figura adaptada de Barnes et al., 2005 (3))

2.1.4 Ameloblastoma desmoplásico

O ameloblastoma desmoplásico foi descrito em 1984 por Eversole como um novo tipo de ameloblastoma, especialmente por apresentar características clínicas, radiográficas e um padrão histopatológico únicos. O aspecto histopatológico do ameloblastoma desmoplásico é descrito como pequenas

ilhas e cordões de epitélio odontogênico amplamente separados por tecido conjuntivo fibroso denso moderadamente celularizado. As ilhas epiteliais são compostas por células colunares com polaridade reversa, mas não representam a característica dominante. Trabéculas ósseas lamelares maduras são encontradas em íntimo contato com o tumor, indicando seu potencial invasivo e justificando a imagem radiográfica difusa. Nessa variante observa-se uma profunda colagenização do estroma denominada desmoplasia.(20)(21)

Radiograficamente a lesão apresenta aspecto misto, de limites pouco definidos, semelhantes à uma lesão fibro-óssea benigna, com predileção pela região anterior dos maxilares. Apesar dessas características tão peculiares, vale a pena salientar que o tumor não parece exibir um comportamento clínico diferente do ameloblastoma sólido / multicístico. (22)

2.2 Estudos sobre o comportamento biológico dos ameloblastomas

Muito se discute sobre o comportamento biológico dos ameloblastomas. Nesse sentido a classificação de variantes é fundamental para se definir o prognóstico e a conduta terapêutica adequada para cada caso.(1)

Como regra geral, ameloblastomas sólidos/multicísticos tendem a apresentar um prognóstico reservado, para o caso, com um custo cirúrgico elevado, especialmente se o paciente diagnosticado apresentar uma baixa faixa etária, ou de acordo com o sítio anatômico acometido. Quando estruturas nobres são envolvidas pelo tumor, se faz necessário realizar ressecções cirúrgicas amplas, que na maioria as vezes, envolvem reabilitações extensas que comprometem a qualidade de vida do paciente.(4)

Por outro lado, tumores classificados como periféricos e unicísticos apresentam melhor prognóstico e terapêutica curativa menos onerosa em termos de remoção cirúrgica. Nestes casos pode-se pensar na realização de cirurgias menos invasivas, como a curetagem ou enucleação seguida de ostectomia periférica.(1)

Autores como Piatteli et al analisaram a marcação nuclear para Ki-67, localizada principalmente em células ameloblásticas periféricas de

ameloblastomas sólidos/multicísticos, variantes plexiformes e foliculares; e nas células basais de ameloblastomas unicísticos. (23) Segundo os pesquisadores, este padrão de marcação sugere que o crescimento da lesão possa estar concentrado em áreas da periferia, composta por células ameloblásticas.(24)

Outro fato interessante é a demonstração da atividade da telomerase, que esta diretamente ligada com a imortalização celular. Esta também pode ser associada com o potencial proliferativo das células do ameloblastoma. De acordo com Barretos et al, a atividade da telomerase detectada nos ameloblastomas, reflete características do tumor como a habilidade de invasão local e altas taxas de recorrência.(25)

À exemplo dos estudos acima descritos, diversos são os trabalhos realizados desde a década de 90, sobre o comportamento, padrões de desenvolvimento e crescimento de ameloblastomas. Todo o conhecimento adquirido proporciona a compreensão dos possíveis mecanismos de tumorigênese, contribuindo com um tratamento adequado e melhor prognóstico do paciente.(2)

2.3 β -Catenina

O gene da β -catenina (*CTNNB1*) está localizado no cromossomo 3p22, em uma região frequentemente alterada em uma ampla variedade de tumores. A β -catenina trata-se de uma proteína multifuncional, que é formada por uma porção N-terminal de 130 aminoácidos, uma porção central de 550 aminoácidos e uma porção C-terminal composta por 100 aminoácidos.(26)

A região N-terminal possui sítios de fosforilação para a GSK-3 β (glicogênio sintetase quinase-3 beta), e a região C-terminal desempenha uma função transativadora de genes que participam do processo de proliferação celular. Na região central há 12 sequências repetidas de 42 aminoácidos conhecidos como “Repetições Armadillo”, que são necessárias para a interação com proteínas, como: caderinas, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) e TCF/LEF (*T-cell fator/lymphoid-enhancer binding fator*) (27). A figura 2.2 mostra a representação esquemática da β -catenina.

O TCF/LEF são fatores de transcrição responsáveis pela ativação de diversos genes, cujos produtos promovem a proliferação celular. Eles são ativados pela β -catenina, pela interação de seus sítios de ligação às regiões promotoras de seus genes.(28)

Além da importante função de proliferação celular, a β -catenina parece estar envolvida na organização da arquitetura tecidual e na manutenção da polaridade celular. Portanto qualquer aumento ou inibição dos níveis da β -catenina celulares podem induzir irregularidades na organização dos tecidos.(29)

Outra importante função relacionada ao gene consta do processo de adesão celular, dentro do qual a β -catenina é capaz de se conectar as caderinas e à actina do citoesqueleto, formando um complexo de adesão célula – célula.(28)

Figura 2.2 - Representação esquemática da β -catenina. A proteína contém sítios de ligação para a α -catenina, APC e E-caderina e um sítio de fosforilação para a GSK-3 β . A β -catenina também contém 12 repetições Armadillo de 42 aminoácidos e ainda um domínio de transativação de genes que levam à proliferação celular na porção C-terminal (Figura adaptada de Akiyama, 2000(27))

A via Wnt/ β -catenina dependente pode levar a regulação da atividade transcripcional de TCF/LEF, que determina o destino celular, determinação de

células tronco, proliferação e diferenciação. Esta via tem como papel determinante o acúmulo de β -catenina associada com um complexo de proteínas. Este complexo consiste de um núcleo de proteínas, Axin, APC e GSK-3 β , outras proteínas também podem estar associadas a este complexo.(30)

Na ausência do receptor Wnt (estado basal não estimulado) este complexo de degradação rapidamente fosforila a β -catenina e a degrada pela via de ubiquitinação proteossômica (figura 2.3a).(31)

Quando a proteína Wnt é secretada, esta pode agir direta ou indiretamente com receptores codificados pela família do gene *frizzled*. Em resposta ao sinal Wnt, os receptores *frizzled* ativam a fosfoproteína *dishevelled*. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, a proteína *dishevelled* inibe a função da proteína GSK-3 β . Este processo leva a um acúmulo de β -catenina hipofosforilada no citoplasma e, subsequentemente no núcleo, onde irá se ligar aos fatores de transcrição TCF/LEF, e, desta forma, estimula a expressão de vários genes alvos (figura 2.3b).(32)

Esta sinalização nuclear pela β -catenina está envolvida na regulação de vários eventos celulares durante o desenvolvimento embrionário, e a ativação aberrante da transativação mediada pela β -catenina pode contribuir para a tumorigênese por causa do aumento da proliferação celular. Como se vê, importantes funções de homeostase celular são comandadas pela expressão do gene β -catenina cuja desregulação pode contribuir com aparecimento de patologias.(33)

Autores como Siriwardena et al, analisaram a expressão de β -catenina em ameloblastomas. O estudo apresentou marcações nucleares para a β -catenina correlacionando sua marcação à agressividade do tumor, visto que em outros tecidos, associam a translocação da β -catenina para o núcleo à transformação maligna da lesão.(34)

Para Siar et al, a inibição e/ou redução de proteínas responsáveis pela adesão celular pode ser relacionada à invasão tecidual local tão característica em ameloblastomas. Acredita-se a expressão aberrante do complexo E-caderina e β -catenina em diferentes subtipos de ameloblastomas são de significância clínica, porque a inibição ou a redução das proteínas de adesão

celular, tornou-se um marcador de invasão local em neoplasias benignas e malignas.(35)

Figura 2.3 - Via de sinalização Wnt/β-catenina dependente. **A** – estado basal não estimulado. **B** – Estado estimulado pela indução da β-catenina; expressão de genes alvos TCF (Figura adaptada de Sethi; Vidal-Pluig, 2010 (31)).

2.4 Akt

O estudo da família Akt iniciou-se com o isolamento de dois genes, o Akt1 e o Akt2, que foram identificados como homólogos humanos a partir do oncogene viral v-Akt, responsável por leucemia em ratos (36). Nos mamíferos, esta proteína apresenta três isoformas conhecidas: a PKBα (Akt1), PKBβ (Akt2) e PKBγ (Akt3).(37)

A descrição das isoformas - Akt1, 2 e 3 – se faz importante, visto que apresentam domínios distintos localizados nos sítios de ligação que promovem a ativação da proteína. Por exemplo, o domínio PH que vêm do inglês pleckstrin homology, apresenta cerca de 100 aminoácidos na região N-terminal, e é responsável pela ancoragem da proteína à membrana plasmática, seguido

por um domínio catalítico, e uma região regulatória C-terminal, conforme ilustra a figura 2.4.(38)

Uma vez ativada em humanos, a proteína Akt pode promover uma proliferação não coordenada, acarretando o aumento de sobrevivência celular e, desta forma, contribuindo com a progressão de neoplasias malignas. Em 1997 em um estudo conduzido por Cheng et al., observaram que na superexpressão de Akt2, havia progressão e aceleração do ciclo celular, e concluiu que o Akt provavelmente desempenha um papel na progressão entre as fases G1-S do ciclo celular.(39)

Fonte:

Figura 2.4 - Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Ser473)

A proteína Akt faz parte da via de sinalização PI3K - fosfatidilinositol-3 quinase – na qual a sua ativação depende da disponibilidade intracelular de PI3K. Por meio de sinais extracelulares, como por exemplo, o fator de crescimento epidermal, ou o fator de crescimento de fibroblasto, e as interleucinas 3 e 6, a proteína Akt é ativada, culminando com a cascata de eventos que determinam a fosforilação do p110, e consequente formação do PIP3. A união do PIP3 ao domínio PH da proteína Akt representa um passo essencial de ativação, pois esta união promoverá a translocação do Akt para o interior da membrana plasmática (40). Após esta etapa, o Akt passará a ter localização citoplasmática e nuclear (41), regulamentando vários processos celulares como a apoptose, a proliferação e sobrevivência celular, diferenciação,

metabolismo e angiogênese (37) A figura 2.5 ilustra todo o processo, para maior compreensão do leitor.

A análise da expressão da proteína p-Akt em ameloblastomas, do tipo folicular e plexiforme e ameloblastomas metastáticos foi realizada por Kumamoto e Ooya. No estudo, as lesões demonstraram uma forte reatividade nas células colunares periféricas do epitélio ameloblástico em contraste à fraca marcação encontrada nas células poliédricas centrais. Segundo os autores, os resultados sugerem que o Akt contribui para a sobrevivência das células neoplásicas nas variantes de ameloblastomas analisadas.(42)

Figura 2.5 - Atuação do Akt na célula (Figura adaptada de Osaki et al., 2004 (38))

2.5 CD44

O CD44 é uma glicoproteína de membrana na qual o ácido hialurônico atua como um dos principais ligantes. É também um componente comum presente na matriz extracelular e nos fluídos extracelulares.(43)

Em humanos, a expressão do CD44 é codificada por um único gene localizado no cromossomo 11p13, que compreende pelo menos 20 exons, com quatro domínios funcionais, sendo o domínio extracelular distal o principal responsável pela ligação do CD44 com o ácido hialurônico, enquanto o domínio extracelular proximal representa o sítio de ligação desta proteína à membrana plasmática.(44)

A ligação do CD44 com o ácido hialurônico resulta em uma via de sinalização intracelular que está relacionada com a ativação de diversas habilidades tais como a adesão, migração e invasão celular; todas importantes no processo de migração neoplásica e no desenvolvimento metastático. Esta proteína participa de uma grande variedade de funções celulares incluindo ativação de linfócitos, recirculação e direcionamento celular, hematopoiese e no mecanismo de geração de metástase tumoral.(43)

A expressão do CD44 ocorre em uma grande variedade de células hematopoiéticas (linfócitos T, células B, monócitos, granulócitos, eritrócitos), epiteliais (queratinócitos, condrócitos), células endoteliais e neurais. Dentre as principais isoformas da molécula destacam-se o CD44s, que está expresso na maioria dos leucócitos, células hematopoiéticas e fibroblastos; e o CD44E, associado com a divisão de células epiteliais (queratinócitos).(43)

Até o momento poucos estudos sobre o comportamento biológico de ameloblastomas e CD44 foram realizados, contudo um estudo preliminar sobre a expressão do CD44 em tumores odontogênicos, sugere que altos níveis de expressão epitelial destas proteínas, possa ser relacionado à comportamento biológico mais agressivo das lesões.(45)

2.6 Vimentina

O citoesqueleto das células eucarióticas detém um poder de reorganização contínuo, ativado sempre que a célula altera sua forma e se divide ou responde ao seu ambiente. Ele é composto por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos, sendo que os filamentos

intermediários ainda podem ser divididos em três grupos: queratinas, neurofilamentos semelhantes a proteínas e vimentina.(46)

O filamento de vimentina é formado pela união de dois homodímeros no domínio central, dando origem a dímeros. Esses dímeros podem se associar em grupos denominados tetrâmeros, que se reúnem em protofilamentos que resultam nos filamentos de vimentina. Ele está presente na maioria das células mesenquimais, sendo utilizado como marcador de desenvolvimento celular e tecidual.(47)

A vimentina é o principal filamento intermediário de células de origem mesenquimal como os fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. O papel desempenhado pela vimentina na arquitetura celular e integridade tecidual já são bastante conhecidos na literatura. Contudo, existem evidências que este filamento possa exercer um papel regulatório em outras funções celulares como adesão, migração e sinalização celular.(47)

As células epiteliais são caracterizadas pela estabilidade do contato célula-célula e a formação de junções aderentes. Estas junções são predominantemente dependentes da E-caderina, conectada a filamentos de actina através da α - ou β -catenina. A perda da E-caderina e a realocização da β -catenina da membrana para o núcleo é frequentemente observada em células tumorais passando pela transição epitélio-mesenquimal. Ou seja, a vimentina pode ser utilizada como um marcador clássico da transição epitélio-mesenquimal e está presente em células mesenquimais controlando sua motilidade.(48)

A transição epitélio-mesenquimal é um processo biológico complexo e reversível, no qual uma célula do tumor epitelial altera sua polaridade e o fenótipo de adesividade, dando lugar a um fenótipo mesenquimal caracterizado pelo aumento da migração, potencial de invasão, remodelação do citoesqueleto e resistência à apoptose.(48)

Normalmente a expressão de vimentina em células epiteliais esta associada a perda de E-caderina dentre outras proteínas sinalizadoras e moléculas de adesão. Devido a essa perda de adesão, sugere-se que o aumento da expressão de vimentina seja também relacionado ao aumento na invasão celular e presença de metástases em linhagens de carcinoma de mama, colón, bexiga e colo de útero, entre outros. Por exemplo, nos

carcinomas de mama a presença de vimentina sugere uma progressão da doença com pior prognóstico.(49)

De acordo com Alma Florescu et al. observou-se forte expressão de vimentina nas células do estroma adjacente as ilhas de epitélio neoplásico. Nestas ilhas também observou-se marcação positiva para vimentina e fraca expressão para E-caderina.(50)

Resultados similares foram descrito por González-Alva et al. que notou a reatividade para vimentina nas células do estroma, porém reação parcial ou nenhuma foi observada em células neoplásicas. Assim, eles concluíram que o padrão de expressão de vimentina em conjunto com a fraca reatividade da E-caderina sugere-se que não ocorra envolvimento da transição epitélio-mesenquima no processo de invasão local do ameloblastoma.(51)

3 PROPOSIÇÃO

Baseado nas evidências expostas na revisão de literatura, o presente trabalho teve como propósito avaliar as expressões imuno-histoquímicas das seguintes proteínas:

- 1- β -catenina;
- 2- p-Akt;
- 3- CD44;
- 4- Vimentina

Dentre as principais funções das proteínas acima citadas estão: a proliferação, invasão e sobrevivência celular. Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar o comportamento biológico nos ameloblastomas sólidos/multicísticos, nas variantes foliculares, plexiformes e de células granulares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) aprovou a realização deste estudo em 11/11/2012 por meio do parecer de número 110/11 - CAAE 0135.0.017.000-11 (Anexo A).

4.1 Materiais

Para a realização deste estudo foram selecionados 40 casos de ameloblastomas dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo.

Os blocos utilizados representavam fragmentos de biópsias de ameloblastomas, cujas análises histopatológicas com finalidade diagnóstica foram efetuadas neste Laboratório.

Foram incluídos na amostra apenas casos de ameloblastomas do tipo sólido/multicístico com confirmação histopatológica, devido a alta agressividade relatada na literatura e pior prognóstico dessas lesões. Desta forma, casos de ameloblastoma unicísticos, extra-ósseos/periféricos e desmoplásicos foram desconsiderados.

4.1.1 Análise morfológica

A análise morfológica dos casos deste trabalho foi feita a partir do estudo de cortes de 5µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina, e observados ao microscópio de luz. Todo o material utilizado encontrava-se fixado em formol e posteriormente emblocado em parafina.

Os casos de ameloblastoma sólido/multicístico e suas variantes foram descritos de acordo com a classificação da OMS de 2005. Esta variante apresenta padrões histopatológicos variáveis, que podem estar presentes na lesão de forma isolada ou simultânea.

4.1.2 Reações de imuno-histoquímica

Para a realização das reações imuno-histoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti- β -catenina (DAKO, Carpinteria, CA, USA), anti-pAkt (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD44 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e anti-vimentina (DAKO, Carpinteria, CA, USA) separadamente. Foram preparados, a partir do material emblocado em parafina cortes de 3 μ m, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas para aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lâmina. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e, a seguir, reidratados em cadeias descendentes de etanóis. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação de hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos. Após lavagem em água, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica, feito com lâminas totalmente imersas em solução de Tris; EDTA; Tween 20, pH 9,0, colocadas em banho de água aquecido a 95°C, durante 30 minutos.

Ao final do tratamento da recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água destilada, durante 10 minutos, e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

Repetida a lavagem em água, os cortes foram imersos em solução de TRIS pH 7,6, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na sequência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6.

Os anticorpos foram diluídos em solução tampão de TRIS, pH 7,6, acrescido de albumina bovina a 1% e foram incubados sobre os cortes durante

1 hora, as respectivas diluições e tratamentos encontram-se na tabela 4.1. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema do kit LSAB+ (DAKO, Carpinteira, CA, USA) em incubações de 30 minutos cada.

Tabela 4.1 – Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas em ameloblastomas em material parafinado

ANTICORPO	CÓDIGO/MARCA	DILUIÇÃO/TRATAMENTO
β-catenina Anti-camundongo Monoclonal	M3539 DAKO	1:500 TRIS, EDTA, TWEEN 20 pH 9 1 hora/95°C BM*
p-AKT Anti-coelho policlonal	16646 Santa Cruz	1:200 TRIS, EDTA, TWEEN 20 pH 9 1 hora/95°C BM*
CD44 Anti-camundongo monoclonal	5650 Cell Signaling	1:250 TRIS, EDTA, TWEEN 20 pH 9 1 hora/95°C BM*
Vimentina Anti-camundongo monoclonal	M 0725 DAKO	1:800 TRIS, EDTA, TWEEN 20 pH 9 1 hora/95°C BM*

* BM lê-se banho-maria.

As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO, Liquid DAB+, K3468) através da incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer.

Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem permanente em *PermOUNT* no aparelho *Tissue Tek®* SCA (Sakura) para microscopia.

A localização celular para imunofenotipagem para β -catenina foi determinada na membrana, núcleo e citoplasma. Para o anticorpo p-AKT a localização foi determinada no citoplasma e núcleo, no anticorpo CD44 foi em membrana e vimentina foi citoplasmática.

4.1.3 Análise de resultados

A análise dos resultados foi efetuada de forma descritiva, sendo consideradas marcações de grupos celulares e as localizações das células marcadas, em campos significativos e representativos de ameloblastomas. Logo, os cortes foram examinados e capturados em microscópio de luz.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 40 blocos parafinados de ameloblastomas sólidos / multicístico sendo 32 classificados como a variante plexiforme, 07 folicular e 1 caso como variante de células granulares.

5.1 Análise morfológica

Todos as amostras de ameloblastomas sólidos/multicístico classificadas como o subtipo folicular (7 casos), apresentara ilhas de epitélio ameloblástico composto por células colunares dispostas em paliçada com núcleos de polaridade invertida na periferia das ilhotas. No centro da lesão, as células apresentavam um padrão frouxo, semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte. Em alguns casos, pode-se observar no centro das ilhotas, degeneração cística ou metaplasia escamosa. A figura 5.1 lilustra essas características dos ameloblastomas na coloração de Hematoxilina e Eosina.

No subtipo plexiforme (32 casos) as ilhas epiteliais se intercomunicavam formando cordões ou placas de epitélio odontogênico. A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo denso, que em alguns casos exibia um infiltrado inflamatório mononuclear discreto. A figura 5.1 lilustra essas características dos ameloblastomas na coloração de Hematoxilina e Eosina.

No subtipo classificado como ameloblastoma de células granulares (01 caso) as ilhas epiteliais apresentavam na sua periferia células colunares dispostas em paliçada e em algumas ilhotas observou-se a transformação da células epiteliais em células granulares. Nas células granulares observou-se citoplasma abundante contendo grânulos eosinofílicos. O estroma era constituído por tecido conjuntivo denso que exibia infiltrado inflamatório mononuclear.

5.2 Resultados para análise imustoquímica

Em todas as amostras de ameloblastomas incluídas neste estudo – 40 casos – foram realizadas análises imuno-histoquímicas para os anticorpos β -catenina, p-AKT, CD44 e vimentina.

A análise de cada anticorpo foi efetuada individualmente, e para facilitar a análise, será descrita de forma independente. Os resultados poderão ser encontrados nas tabelas 5.1 e 5.2 para facilitar o entendimento do leitor.

5.2.1 Análise dos resultados para marcação da proteína β -catenina

Todos os casos analisados para a marcação do anticorpo β -catenina apresentaram positividade na membrana, tanto nas células da camada basal quanto nas células arranjadas mais frouxamente no centro da lesão.

Foi possível observar a formação de pequenos ninhos de células neoplásicas no centro da lesão em 15 (37,5%) dos casos, a marcação observada foi em núcleo e citoplasma e estas também foram totalmente positivas para a proteína β -catenina. A figura 5.2 ilustra essas características.

Em relação à marcação celular, 33 (82,5%) casos apresentaram marcações citoplasmática, nuclear e de membrana simultaneamente; 7 (17,5%) casos apresentaram marcações citoplasmática e de membrana.

Quanto a localização da marcação, áreas de marcação central e periférica foram observadas em 21 (52,5%) casos, enquanto 15 (37,5%) casos apresentaram marcações centrais e 4 (10%) casos marcações periférica. A figura 5.2 representa as características acima citadas.

Não observou-se diferença significativa em relação padrão de marcação celular nos subtipos histológicos estudados.

5.2.2 Análise dos resultados para a marcação da proteína p-AKT

Todos os casos incluídos no estudo apresentaram positividade para o anticorpo pAkt, tanto em células da camada basal quanto em células arranjadas mais frouxamente no centro das lesões independente do subtipo estudado. Não foi possível observar exclusivamente ninhos de células neoplásicas no interior da lesão com marcação positiva para a proteína p-Akt.

Em relação ao padrão de marcação celular, 36 (90%) casos apresentaram marcação citoplasmática, enquanto 4 (10%) casos mostraram marcações citoplasmática e nuclear. A Figura 5.2 ilustra essas características.

Quanto a localização de marcação, observou-se positividade em 23 (57,5%) casos nas áreas central e periférica, áreas com marcação apenas periférica foram em 17 (42,5%) casos, e não ocorreu marcação apenas nas áreas centrais da lesão.

Assim como ocorreu para a marcação da proteína β -catenina, nenhuma diferença significativa foi verificada entre os subtipos de ameloblastomas sólidos/multicísticos com relação aos padrões de marcação do p-Akt nos subtipos histológicos estudados.

5.2.3 Análise dos resultados para a marcação da proteína CD44

Dentre os 40 casos analisados, todos apresentaram marcação positiva para o anticorpo CD44, tanto em células da camada basal quanto em células arranjadas mais frouxamente no centro da lesão.

Nos casos em que foi possível observar pequenos ninhos de células neoplásicas no centro da lesão, 11 (27,5%) casos foram positivos para a proteína CD44. Com relação ao padrão de marcação celular 27 (67,5%) casos apresentaram marcação de membrana. Quanto a localização da marcação, 28 (70%) casos exibiram marcação central e periférica, 11 (27 %) casos apenas

marcação central e em 1 (2,5%) caso pode ser verificada marcação periférica. A figura 5.2 ilustra essas características.

Nenhuma diferença significativa pode ser observada com relação aos subtipos histopatológicos de ameloblastomas sólidos/multicísticos incluídos neste estudo.

5.2.4 Análise dos resultados para marcação de vimentina

De todos os casos estudados, 37 (92,5%) apresentaram positividade para a proteína vimentina, tanto em células da camada basal quanto em células arranjadas mais frouxamente no centro das lesões.

Nos casos em que foi possível observar a presença de pequenos ninhos de células neoplásicas no centro da lesão 22 (55%) foram totalmente positivas para a proteína vimentina. A figura 5.2 ilustra essas características.

Em relação ao padrão de marcação celular, 37 (92,5%) dos casos apresentaram marcação citoplasmática exclusiva enquanto 3 (7,5%) casos foram negativos para a proteína vimentina.

22 (55%) casos analisados demonstraram marcação central para a proteína vimentina, 14 (7,5%) exibiram marcação central e periférica, e em apenas 1 (2,5%) caso pode ser constatada marcação periférica exclusiva. A figura 5.2 representa as características acima citadas.

Assim para todos os outros anticorpos, nenhuma marcação específica com relação aos subtipos histopatológicos estudados pode ser verificada.

Tabela 5.1 – Resultados referentes a marcação intracelular nas proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina

MARCAÇÃO				
INTRACELULAR	β-CATENINA	P-AKT	CD44	VIMENTINA
Membrana	-	-	27 (67,5%)	-
Citoplasma	-	36 (90%)	-	37 (92,5%)
Citoplasma	-	4 (10%)	-	-
Núcleo				
Citoplasma	7 (17,5%)	-	-	-
Membrana				
Núcleo	33 (82,5%)	-	-	-
Citoplasma				
Membrana				

Tabela 5.2 – Resultados referentes a localização de marcação celular nas proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina

LOCALIZAÇÃO				
CELULAR	β-CATENINA	P-AKT	CD44	VIMENTINA
Central	15(37,5%)	-	11 (27%)	22 (55%)
Periférico	4 (10%)	17 (42,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)
Central				
Periférico	21 (52,5%)	23 (57,5%)	28 (70%)	14 (7,5%)

Figura 5.1 – Características histológicas do ameloblastoma do tipo folicular (A/B) e do tipo plexiforme (C/D). (A) Presença de ilhas de epitélio ameloblástico composto por células colunares dispostas em paliçada com núcleos de polaridade invertida na periferia das ilhotas. (B) No centro da lesão, as células apresentavam um padrão frouxo, semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte (C) Presença de ilhas epiteliais que se intercomunicam formando cordões ou ilhas de epitélio odontogênico. (D) As ilhas epiteliais são delimitadas por células colunares ou cúbicas, com polarização reversa, semelhantes a ameloblastos

Figura 5.2 – Marcação imuno-histoquímica para β -catenina (A/B) e p-Akt (C/D) em ameloblastomas. (A) Marcação positiva para β -catenina nas células colunares periféricas e centrais. (B) Marcação nuclear para β -catenina nos ninhos de células poliédricas no centro do tumor. (C;D) Marcação positiva para p-Akt nas células colunares periféricas.

Figura 5.3 – Marcação imuno-histoquímica para CD44 (E/F) e vimentina (G/H) em ameloblastomas. (E) Marcação positiva para CD44 nas células poliédricas no centro do tumor. (F) Marcação positiva para CD44 nos ninhos de células poliédricas no centro do tumor (G;H) Marcação positiva para vimentina nas células colunares periféricas.

6 DISCUSSÃO

A falta de estudos precisos em relação ao comportamento biológico dos ameloblastomas tem levado muitos profissionais a tratar esta patologia através da cirurgia radical, com o intuito de evitar a recidiva local. Assim, a elucidação dos mecanismos moleculares e da patogênese do ameloblastoma auxiliaria tanto na identificação do prognóstico da lesão, como na aplicabilidade correta dos tratamentos disponíveis.(52)

Neste estudo optamos por avaliar o comportamento das proteínas β -catenina, p-Akt, CD44 e vimentina, com a intenção de compreender com maior clareza seus mecanismos relacionados a invasividade, proliferação e sobrevivência celular nos ameloblastomas.

A β -catenina possui funções importantes na manutenção das células e tecidos humanos, dentre as quais, podemos citar: organização da arquitetura e manutenção da polaridade celular e no processo de adesão celular. De acordo com os níveis da β -catenina celular, podem ocorrer irregularidades nos tecidos humanos.(28) (29)

A β -catenina foi originalmente isolada por sua associação com o domínio citoplasmático da molécula caderina de adesão celular, possuindo um papel importante no controle da proliferação e morte celular. Esta proteína é capaz de se conectar as caderinas e à actina do citoesqueleto, formando o complexo de adesão célula-célula.(2)

Estudos que investigam a atuação da β -catenina e da E-caderina, mostram resultados contraditórios no padrão de expressão deste complexo e no comportamento biológico dos tumores odontogênicos. A maioria dos estudos relatam que a redução na expressão deste complexo esta associado com maior agressividade no comportamento biológico do tumor e pior prognóstico para o paciente.(53)

Acredita-se que o acúmulo nuclear da β -catenina pode estar relacionado a tumorigênese dos ameloblastomas, por a mesma não ser detectada nos germes dentários. Além disso, nos carcinomas de cólon e pilomatricoma a localização nuclear da β -catenina é atribuída a mutação de *CTNNB1* ou *APC*.(54)

A literatura mostra que 42 casos de ameloblastomas foram investigados para a mutação do gene *CTNNB1*, entretanto apenas 03 casos foram positivos para essa mutação, e estes mesmos 03 casos apresentaram marcação nuclear para β -catenina.(34)(55)

Tanahashi et al., acreditam que novos estudo devem ser realizados, para investigar se outras moléculas da via de sinalização Wnt estão relacionadas com a translocação da β -catenina para o núcleo nos ameloblastomas. Segundo estes autores, não ocorreu mutação nos genes *CTNNB1*, *APC*, *Axin 1* e *Axin 2* nos 14 casos de ameloblastomas sólido/multicístico e nos 04 casos de ameloblastomas unicísticos avaliados. Diante desses resultados acredita-se que estes genes não desenvolvem um papel significativo na acúmulo da β -catenina no núcleo nos ameloblastomas.(55)

Em nosso estudo, dos 40 casos de ameloblastomas solido/multicístico selecionados, 33 (82,5%) casos apresetaram marcação em citoplasma, membrana e núcleo e 7 (17,5%) casos apresentaram marcação em citoplasma e membrana. Em relação a localização da marcação celular, em 15 (37,5%) casos observou-se marcação apenas em ninhos de células presentes nas áreas centrais do tumor, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte.

De acordo com Tanahashi et al., a β -catenina esta expressa na fase de capuz na formação do germe dentário, nas camadas do epitélio, nas células do retículo estrelado do órgão do esmalte e na lâmina dental. Em seu estudo, detectou-se a positividade para β -catenina nuclear em 11 dos 18 casos de ameloblastoma (08 casos do subtipo sólido/multicístico e 03 casos do subtipo unicístico) e 16 casos apresentaram expressão para β -catenina em membrana e/ou citoplasma, sugerindo que as células que constituem o ameloblastoma correspondem aos componentes epiteliais dos tecidos dos germes dentários, especialmente aqueles que estão no estágio de capuz.(55)

Para Sekine et al., a reatividade da β -catenina foi reconhecida na membrana e citoplasma das células neoplásicas dos ameloblastomas. Estas características sugerem que a β -catenina desenvolve um papel duplo no mecanismo de adesão célula-célula e na transdução do sinal no epitélio odontogênico neoplásico.(56)

Kumamoto e Ooya, estudaram a expressão da β -catenina em 40 ameloblastomas (23 folicular, 17 plexiforme, 10 acantomatoso, 06 de células granulares, 03 de células basais e 04 do subtipo desmoplásico) e 10 casos de germes dentários. Observaram a expressão da β -catenina em membrana e citoplasma nas células normais e neoplásicas do epitélio odontogênico e marcação nuclear para β -catenina apenas nas células epiteliais odontogênicas neoplásica. Nos germes dentários, a β -catenina foi expressa na maioria das células epiteliais do órgão do esmalte e na lâmina dental.(57)

Resultados semelhantes foram descritos por Alves Pereira et al., no qual observou-se a expressão de β -catenina na membrana e citoplasma de células epiteliais odontogênicas em ameloblastomas e germes dentários. A intensidade da imunexpressão em germes dentários foi observada em 4 casos (80%), com forte marcação nas células da membrana do retículo estrelado e fraca marcação nas células da camada interna, intermediária e externa do epitélio do órgão do esmalte. Estas características sugerem que a β -catenina pode participar na adesão célula-célula e na via de sinalização Wnt durante a odontogênese ou nos ameloblastomas.(2)

Os relatos da literatura mostram que a expressão da β -catenina parece estar relacionada ao processo de diferenciação celular, entretanto outros mecanismos podem estar envolvidos para influenciar o comportamento biológico dos ameloblastomas.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, acredita-se as células com marcação nuclear positiva para β -catenina, que compõe os ninhos no centro da lesão são responsáveis pela proliferação celular nos ameloblastomas. Este achado vai de acordo com os relatos da literatura, no qual diversos autores afirmam que a presença da β -catenina no núcleo celular está relacionado com a tumorigênese e proliferação celular.

Especificamente nos casos que apresentaram localização central foi possível observar ninhos de células epiteliais, com forte marcação nuclear. Dentre os casos remanescentes, observou-se áreas de marcação nuclear nas áreas periférica e/ou periférica e central nas células epiteliais odontogênicas, dessa forma aventamos a hipótese de que a proliferação celular nos ameloblastomas ocorra tanto nas áreas periféricas como nas regiões centrais da lesão.

As ações relativas à ativação da proteína Akt, ocorrem no citoplasma das células, entretanto tem se investigado sobre a atuação do Akt de localização nuclear. Alguns estudos tem demonstrado que a proteína Akt, após ativação na membrana, pode sofrer translocações para o núcleo. Sugeriu-se a hipótese da translocação ocorrer por meio de proteínas transportadoras, semelhante ao mecanismo utilizado pelas MAP kinases.(58)

Ainda permanece incerto o papel da proteína Akt nuclear, mas investigações têm demonstrado que sua localização nuclear está relacionada a tumorigênese e a supressão de estímulos apoptóticos, através do bloqueio de DNase ativada por caspase e inibição de condensação da cromatina.(59)

Os ameloblastomas exibem alterações na expressão das moléculas que desempenham um papel importante no crescimento e sobrevivência de células neoplásicas. As análise imuno-histoquímicas do Akt pode provar ser uma valiosa ferramenta diagnóstica, determinando a agressividade individual dos ameloblastomas, podendo assim colaborar para a individualização dos tratamentos.(52)

Em nosso estudo observamos que em 42,5% dos casos apresentaram células imunorreativas na periferia, ou seja próximo a membrana basal e 57,5% dos casos apresentaram positividade das células neoplásicas nas áreas da periferia e central dos ameloblastomas. Assim como foi possível observar a positividade nuclear para p-Akt em 4 (10%) casos de ameloblastomas, tanto nas áreas periféricas como nas áreas centrais do tumor.

De acordo com estudo realizado por Kumamoto e Ooya, observou-se imunoreatividade para p-Akt, PI3K e PTEN em germes de tecidos dentários, sugerindo que a via de sinalização Akt regula a sobrevivência e crescimento celular durante o desenvolvimento dentário, sendo mediado por sinais de fatores de crescimento. Os autores avaliaram 40 casos de ameloblastoma e 05 casos de ameloblastoma metastático; a expressão de p-Akt e PI3K foi detectada na membrana e citoplasma das células dos tecidos epiteliais normal e neoplásico. Todos os casos apresentaram forte marcação para p-Akt e PI3K nas células cuboidais e colunares da periferia e fraca marcação para as células poliédricas centrais. O PTEN apresentou marcação na maioria das células colunares da periferia e nas células poliédricas centrais. Diante dos resultados apresentados, os autores concluíram que, a diminuição da expressão do PTEN

pode participar na oncogênese do epitélio odontogênico pela ativação da via de sinalização Akt e estas características sugerem que a via de sinalização do Akt pode estar envolvida na estruturação tecidual e na diferenciação celular dos ameloblastomas.(42)

Em outro estudo Kumamoto e Ooya observaram que os níveis de expressão do p-Akt em tumores ameloblásticos malignos e benignos foram ligeiramente maior que nos germes dentários, sugerindo que a regulação do Akt pode desenvolver um papel importante na oncogênese do epitélio odontogênico.(60)

Para Scheper et al., o PTEN estava completamente ausente em 33% dos casos de ameloblastomas estudados, enquanto que na forma ativa, estabilizada e fosforilada estava ausente em 83,3% dos casos. A perda da atividade do PTEN pode ocorrer por um aumento da ativação do Akt, com forte expressão para p-thr Akt em 93,3% e p-ser Akt em 56,6% dos casos. Realizou-se uma correlação entre a inibição do PTEN e a regulação da via de sinalização Akt. Ao contrário do que ocorreu com os ameloblastomas, os folículos dentários apresentaram expressão positiva para PTEN e p-PTEN em todos os casos analisados, entretanto a expressão e/ou a fosforilação de AKT foi verificada em 80% dos casos estudados. A falta de uma correlação inversa entre a expressão de PTEN e p-PTEN e a ativação de AKT nos folículos dentários pode indicar a incapacidade do PTEN de suprimir a sinalização do AKT durante o desenvolvimento dentário.(52)

Para Nodit et al. os níveis de expressão de PTEN nos ameloblastomas foram significativamente baixos quando comparados com germes dentários. Estas características sugerem que a diminuição da expressão do PTEN pode participar na oncogênese do epitélio odontogênico, pela ativação da via de sinalização do Akt.(61)

Diantes dos resultados apresentados, acredita-se que o Akt pode contribuir para a sobrevivência das células neoplásicas nas regiões periféricas do tumor. A presença de marcação nuclear na células do epitélio odontogênico neoplásico tanto nas regiões centrais e como nas áreas periféricas do ameloblastoma, nos leva a aventar a hipótese de que a proliferação celular ocorra nestas duas regiões.

O CD44 é uma glicoproteína de superfície celular expressa no linfócitos, monócitos e granulócitos, que tem sido identificados como marcadores de células tronco para carcinoma de cabeça e pescoço, mama, próstata e pâncreas.(62)

Acredita-se que os tumores iniciam-se a partir de células tronco normais ou de seus descendentes imediatos e são perpetuadas por uma minoria dessas células, conhecidas como células tronco neoplásicas ou células de iniciação tumoral. De acordo com a Associação Americana para Pesquisas de Câncer, a célula de um tumor que possui a capacidade de se auto renovar e gerar linhagens heterogêneas de células neoplásicas que compreende o tumor, é conhecida como células trono neoplásicas. Esta observação implica em dizer que, dentro do tumor pode existir uma pequena população de células com a capacidade de se comportar como células tronco.(63)

Xu et al., demonstraram a presença de células tronco em tumores benignos. Eles isolaram células semelhantes a células tronco multipotentes, que se auto renovavam, de vários adenomas pituitários. Implantados em camundongos imunodeficientes, essas células iniciaram tumores pituitários transplantados que eram semelhantes aos tumores primários.(64)

A presença de células tronco neoplásicas em ameloblastomas permanece incerta, entretanto, se estas células estão presentes, torna-se importante identificar que tipo de células possui essas características e qual a sua atuação na progressão e recorrência do tumor.(65)

Neste estudo foram avaliados a marcação de CD44 em 40 casos de ameloblastomas, no qual apresentaram positividade para as células da camada basal e nas células semelhantes ao retículo estrelado na porção central. Observou-se positividade para a marcação de CD44 em pequenos ninhos de células neoplásicas no centro da lesão. Em relação a localização encontrada, os casos com marcação de membrana foram 27 (67,5%). As áreas com marcação apenas central foram em 11 (27%) casos, marcação apenas periférica foi em 1 (2,5%) e a grande maioria apresentou marcação central e periférica com 28 (70%) dos casos.

Para Sathi et al., a expressão de CD44 foi mais intensa em pequenos folículos do tumor, apresentando semelhança com os nossos resultados. Para estes autores o ameloblastoma do tipo plexiforme mostrou intensa

imunorreação no centro das células semelhantes ao retículo estrelado. Estes autores também avaliaram a marcação de CD133, com localização de marcação citoplasmática e intensa imunocoloração foi observada em pequenos folículos do tumor e células semelhantes a ameloblastos.(65)

O CD44 e CD133 são dois marcadores que apresentam similar padrão de marcação e estão principalmente localizados nas células periféricas dos ameloblastomas. Sendo assim sugere-se que estas duas moléculas podem ser biomarcadores para a iniciação, progressão e diferenciação nos ameloblastomas (65). Há relatos de que células positivas para CD44 possui a capacidade de iniciar a recorrência do tumor após o término do tratamento.(66)

A presença de células tronco neoplásicas em ameloblastomas enfatiza os achados de estudos prévios que revelam que é possível que células tronco neoplásicas estejam presentes não apenas em lesões malignas, mas também em lesões benignas. Nos ameloblastomas, as células centrais semelhantes ao retículo estrelado, apresentaram positividade para biomarcadores como CD44, desta forma esta células podem ser candidatas a células tronco nos ameloblastomas.(65)

De acordo com os nossos resultados, no qual foi possível observar a presença de marcação positiva para CD44 em ninhos de células epiteliais no centro da lesão, podemos aventar a hipótese de que estas células também são candidatas a células tronco e que como já foi dito anteriormente, a proliferação do ameloblastoma ocorra em áreas centrais e periféricas e que essa proliferação esta ligada a alta taxa de recorrência do tumor.

A vimentina esta relacionada com a invasão tumoral, isso se dá através do movimento das células gerado pela matriz extracelular, é um processo complexo que implica em alterações nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, remodelação da matriz extracelular, reorganização do citoesqueleto e aumento da motilidade celular. O processo de invasão requer a expressão e/ou a ativação de múltiplos genes e de seus produtos.(51)

A transição epitélio-mesenquima é uma mudança completa das propriedades das células epiteliais caracterizada pela conversão do fenótipo, em que células epiteliais perdem sua polaridade e adesão e adquire características migratórias e de fibroblastos. O ganho dessa capacidade

migratória e autonomia celular gera o desenvolvimento da invasividade e metástase dos tumores.(67)

Com base neste processo, encontra-se modificação no perfil dos filamentos intermediários do citoesqueleto com início da expressão para vimentina. Dessa forma, a expressão da vimentina tornou-se um marcador para a transição epitélio mesenquima.(50)

No presente estudo observou-se marcação em 92,5% dos casos de ameloblastomas estudados. Em relação a marcação celular encontrada, a maioria dos casos apresentaram marcação apenas citoplasmática, em 37 (92,5%) e em 3 (7,5%) casos foram negativos para a proteína vimentina. Quanto a localização de marcação, as áreas com marcação apenas central foram em 22 (55%) casos, marcação apenas periférica ocorreu em 1 (2,5%) caso e central e periférica foram em 14 (7,5%) casos.

Para Alma Florescu et al., verificou que a reatividade da vimentina foi observada no tecido conjuntivo dos ameloblastomas analisados e o padrão de reação foi citoplasmático. A reação da vimentina nas células neoplásicas foi observada na células colunares e cuboidais da periferia que pertenciam as ilhas do tumor, especialmente nos casos com invasão óssea.(50)

Resultados similares foram relatados por González-Alva et al., em que a reatividade da vimentina foi encontrada nas células do tecido conjuntivo, porém reação parcial ou nenhuma foi observada nas células neoplásicas.(51)

Ao avaliar a marcação da vimentina e da E-caderina, Alma Florescu et al., concluíram que o padrão de expressão da vimentina juntamente com a E-caderina poderia sugerir que não há envolvimento da transição epitélio-mesenquima no processo de invasão local dos ameloblastomas.(50)

A presença de positividade para vimentina nas células epiteliais dos ameloblastomas sugere sua capacidade de invasão e agressividade do tumor. Não foi possível observar a ocorrência de transição epitélio-mesênquima, pois não são observadas alterações fenotípicas nas células neoplásicas odontogênicas. De acordo com os resultados obtidos com as marcações para vimentina, as células que promovem a invasividade dos ameloblastomas estão localizadas nas áreas centrais e periféricas do tumor.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos com as reações imuno-histoquímicas, através de marcadores celulares que estão ligados a proliferação, sobrevivência e invasão celular, podemos aventar as seguintes hipóteses para o comportamento biológico dos ameloblastomas:

- 1- A positividade nuclear para β -catenina, p-Akt e CD44 nas células epiteliais em ninhos localizados nas regiões centrais e na periferia dos ameloblastomas, sugere que a proliferação celular ocorra tanto nas áreas centrais como na periferia do tumor.
- 2- Quanto a proteína vimentina, não foi possível observar a ocorrência de transição epitélio-mesênquima, pois não foram observadas alterações fenotípicas nas células neoplásicas odontogênicas. E as células que promovem a invasão celular nos ameloblastomas estão localizadas nas áreas centrais e periféricas do tumor.

REFERÊNCIAS¹

1. Olaitan AA, Adeola DS, Adekeye EO. Ameloblastoma: clinical features and management of 315 cases from Kaduna, Nigeria. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* [Internet]. 1993 Dec [cited 2013 Jan 19];21(8):351–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113429>
2. Alves Pereira KM, Do Amaral BA, Dos Santos BRM, Galvão HC, Freitas RDA, De Souza LB. Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in ameloblastomas and tooth germs. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Mar [cited 2012 Jul 19];109(3):425–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219600>
3. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. No Title. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: IARC: World Health Organization; 2005.
4. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *European journal of cancer. Part B, Oral oncology* [Internet]. 1995 Mar [cited 2012 Nov 15];31B(2):86–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7633291>
5. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The World Health Organization histological typing of odontogenic tumours. Introducing the second edition. *European journal of cancer. Part B, Oral oncology* [Internet]. 1993 Jul [cited 2012 Nov 15];29B(3):169–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298419>
6. Reichart P a, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)--any changes? *Oral oncology* [Internet]. 2006 Sep [cited 2012 Jul 19];42(8):757–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679047>
7. Osterne RLV, Brito RGDM, Alves APNN, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Apr [cited 2012 Jul 19];111(4):474–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239191>
8. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 2001 Apr 15 [cited 2012 Oct

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

13];19(8):2201–5. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304772>

9. Curi MM, Dib LL, Pinto DS. Management of solid ameloblastoma of the jaws with liquid nitrogen spray cryosurgery. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics [Internet]. 1997 Oct;84(4):339–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347494>

10. Rocha AC. Estudo clínico, radiográfico, microscópico e terapêutico de ameloblastomas. [Tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2008.

11. Gardner DG, Pecak AM. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. Cancer [Internet]. 1980 Dec 1 [cited 2012 Nov 18];46(11):2514–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7438024>

12. Tamme T, Tiigimäe J, Leibur E. Mandibular ameloblastoma: a 28-years retrospective study of the surgical treatment results. Minerva stomatologica [Internet]. [cited 2012 Nov 15];59(11-12):637–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217628>

13. Kim SG, Jang HS. Ameloblastoma: a clinical, radiographic, and histopathologic analysis of 71 cases. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics [Internet]. 2001 Jun [cited 2012 Jul 19];91(6):649–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402276>

14. Hollows P, Fasanmade A, Hayter JP. Ameloblastoma--a diagnostic problem. British dental journal [Internet]. 2000 Mar 11 [cited 2012 Nov 15];188(5):243–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758685>

15. Chapelle K a OM, Stoelinga PJW, De Wilde PCM, Brouns JJ a, Voorsmit R a C a. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. The British journal of oral & maxillofacial surgery [Internet]. 2004 Oct [cited 2012 Jul 19];42(5):381–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336762>

16. Lagares DT, Cossío PI, Guisado JMH, Luis J, Pérez G, Becario FPD. Ameloblastoma mandibular . Revisión de la literatura y presentación de seis casos Mandibular ameloblastoma . A review of the literature and presentation of six cases. 2004;(1):231–8.

17. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J. Patologia Oral e Maxilofacial. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p. 940.

18. Philipsen HP, Reichart P a. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. Oral oncology [Internet]. 1998 Sep;34(5):317–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861335>

19. Gardner DG. Some current concepts on the pathology of ameloblastomas. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* [Internet]. 1996 Dec [cited 2012 Nov 18];82(6):660–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974139>

20. Eversole LR, Leider AS, Hansen LS. Ameloblastomas with pronounced desmoplasia. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* [Internet]. 1984 Nov [cited 2012 Nov 17];42(11):735–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6593446>

21. Waldron CA, el-Mofty SK. A histopathologic study of 116 ameloblastomas with special reference to the desmoplastic variant. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* [Internet]. 1987 Apr [cited 2012 Nov 17];63(4):441–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472145>

22. Cervelli D, Marianetti TM, Boniello R, Grussu F, Gasparini G, Azzuni C, et al. Giant neglected desmoplastic ameloblastoma: reconstruction with free fibula flap. *The Journal of craniofacial surgery* [Internet]. 2012 May [cited 2012 Nov 17];23(3):e171–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627421>

23. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral oncology* [Internet]. 2008 Aug [cited 2012 Nov 18];44(8):805–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207448>

24. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* [Internet]. 2010 Sep [cited 2012 Jul 19];39(8):585–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618608>

25. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *Journal of dental research* [Internet]. 2000 Jun [cited 2012 Nov 15];79(6):1418–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890722>

26. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science (New York, N.Y.)* [Internet]. 2004 Mar 5 [cited 2012 Nov 8];303(5663):1483–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3372896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

27. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine & growth factor reviews* [Internet]. 2000 Dec [cited 2012 Nov 19];11(4):273–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959075>

28. Polakis P. Wnt signaling and cancer Wnt signaling and cancer. 2000;1837–51.
29. Silva R. Envolvimento da Beta-catenina na via Wnt em meduloblastomas: estudo molecular e imunohistoquímico. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.
30. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annual review of cell and developmental biology [Internet]. 2004 Jan [cited 2012 Jul 13];20:781–810. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473860>
31. Sethi JK, Vidal-Puig A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. The Biochemical journal [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2012 Jul 19];427(1):1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226003>
32. Barth AI, Näthke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. Current opinion in cell biology [Internet]. 1997 Oct [cited 2012 Nov 19];9(5):683–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330872>
33. Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. Journal of cell science [Internet]. 2000 Sep [cited 2012 Nov 19];113 (Pt 1):3127–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10954412>
34. Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, Tilakaratne WM, Takata T. Aberrant beta-catenin expression and adenomatous polyposis coli gene mutation in ameloblastoma and odontogenic carcinoma. Oral oncology [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Feb [cited 2012 Jul 19];45(2):103–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486530>
35. Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, et al. Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology [Internet]. 2012 Apr [cited 2012 Jul 19];41(4):332–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077561>
36. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 1987 Jul [cited 2013 Jan 5];84(14):5034–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=305241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular signalling [Internet]. 2002

May;14(5):381–95. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882383>

38. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* [Internet]. 2004 Nov;9(6):667–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505410>

39. Cheng J, Altomare D, Klein M, Lee W, Kruh G, Lissy N. Transforming activity and mitosis-related expression. of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene*. 1997;14:2793–801.

40. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell* [Internet]. 2005 Sep [cited 2012 Jul 12];8(3):179–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169463>

41. Filippa N, Sable CL, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Molecular and cellular biology* [Internet]. 2000 Aug [cited 2013 Jan 5];20(15):5712–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86048&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

42. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K, and PTEN in ameloblastic tumors. *Oral diseases* [Internet]. 2007 Sep [cited 2012 Jul 19];13(5):461–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714348>

43. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical reviews in oncology/hematology* [Internet]. 2003 May [cited 2013 Jan 6];46(2):165–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711360>

44. Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Experimental and molecular pathology* [Internet]. 2009 May [cited 2012 Oct 31];86(2):95–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167378>

45. Salehinejad J, Saghafi S, Sharifi N, Zare-Mahmoodabadi R, Saghravanian N, Ghazi N, et al. Evaluation of osteopontin and CD44v6 expression in odontogenic cystic lesions by immunohistochemistry. *Pathology, research and practice* [Internet]. 2012 Jul 15 [cited 2012 Nov 14];208(7):410–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658130>

46. Mor-Vaknin N, Legendre M, Yu Y, Serezani CHC, Garg SK, Jatzek A, et al. Murine Colitis is Mediated by Vimentin. *Scientific reports* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Jan 12];3:1045. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304436>

47. Ivaska J, Pallari H-M, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental cell research* [Internet]. 2007 Jun 10 [cited 2012 Oct 30];313(10):2050–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512929>
48. Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* [Internet]. 2012 Nov 19 [cited 2013 Jan 1]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182398>
49. Islam S, Kim JB, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KR. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *Journal of cellular biochemistry* [Internet]. 2000 Apr [cited 2013 Jan 12];78(1):141–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797573>
50. Florescu A, Mărgăritescu C, Simionescu CE, Stepan A. Immunohistochemical expression of MMP-9, TIMP-2, E-cadherin and vimentin in ameloblastomas and their implication in the local aggressive behavior of these tumors. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Jan 12];53(4):975–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303021>
51. González-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Miyazaki Y, Okamoto E, Fujinami M, et al. Enhanced expression of podoplanin in ameloblastomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Jan 12];39(1):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691459>
52. Scheper MA, Chaisuparat R, Nikitakis NG, Sauk JJ. Expression and alterations of the PTEN / AKT / mTOR pathway in ameloblastomas. *Oral diseases* [Internet]. 2008 Sep [cited 2012 Nov 21];14(6):561–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18826385>
53. Bánkfalvi A, Krassort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* [Internet]. 2002 Sep [cited 2013 Mar 3];31(8):450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220351>
54. Sorkin BC, Wang MY, Dobeck JM, Albergo KL, Skobe Z. The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* [Internet]. 2000 Mar [cited 2013 Mar 3];48(3):397–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681393>

55. Tanahashi J, Daa T, Yada N, Kashima K, Kondoh Y, Yokoyama S. Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of beta-catenin. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology [Internet]. 2008 Oct [cited 2012 Jul 19];37(9):565–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284543>
56. Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, et al. β -Catenin Mutations Are Frequent in Calcifying Odontogenic Cysts, but Rare in Ameloblastomas. *The American Journal of Pathology* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2003 Nov [cited 2012 Jul 19];163(5):1707–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010635286>
57. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology [Internet]. 2005 Aug;34(7):401–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011608>
58. Andjelkovic M, Alessi D, Meier R, Fernandez A, Lamb N, Frenc M. Role of translocation in the activation and function of protein kinase b. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31515–24.
59. Marques YMFS. Análise da via do Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares. [Tese de Doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2010. p. 84.
60. Kumamoto H, Ooya K. Expression of tumor necrosis factor alpha, TNF-related apoptosis-inducing ligand, and their associated molecules in ameloblastomas. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology [Internet]. 2005 May [cited 2013 Mar 6];34(5):287–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817072>
61. Nodit L, Barnes L, Childers E, Finkelstein S, Swalsky P, Hunt J. Allelic loss of tumor suppressor genes in ameloblastic tumors. *Modern pathology* : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc [Internet]. 2004 Sep [cited 2013 Mar 6];17(9):1062–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133474>
62. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2007 Jan 16 [cited 2013 Mar 9];104(3):973–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1783424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

63. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2013 Feb 28];66(19):9339–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990346>

64. Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, et al. Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *British journal of cancer* [Internet]. 2009 Jul 21 [cited 2013 Mar 9];101(2):303–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2720199&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>

65. Sathi GA, Tamamura R, Tsujigiwa H, Katase N, Lefevre M, Siar CH, et al. Analysis of immunoexpression of common cancer stem cell markers in ameloblastoma. *Experimental and therapeutic medicine* [Internet]. 2012 Mar [cited 2013 Mar 9];3(3):397–402. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3438649&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>

66. Huang X, Sheng Y, Guan M. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surgical oncology* [Internet]. 2012 Jun [cited 2013 Mar 10];21(2):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764578>

67. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *British journal of cancer* [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2013 Mar 10];96(1):1–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360213&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Patologia Bucal

DECLARAÇÃO

Declaro junto ao Comitê de Ética, que o trabalho intitulado: Estudo da via beta catenina nos tumores odontogênicos, será realizado com acervo dos Laboratórios de Patologia Cirúrgica, e Laboratório de Imunohistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia do Departamento de Estomatologia da FOUSP, pela aluna **Bianca de Fátima Borim Pulino** de Pós-Graduação em Odontologia, Programa de Patologia Bucal da FOUSP. Por ser verdade, assumo total responsabilidade pela informação.

São Paulo, 03 de novembro de 2011.

Prof. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa
Disciplina de Patologia Bucal
Responsável

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

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 110/11
CAAE 0135.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Estudo da via beta-catenina nos tumores odontogênicos**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Bianca de Fatima Borim Pulino, sob orientação do Professor Doutor Décio dos Santos Pinto Júnior.

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

São Paulo, 11 de novembro de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turola Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP