LILIAN CALDAS QUIRINO

**Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC
e via Wnt1 nos ameloblastomas**

São Paulo

2014

LILIAN CALDAS QUIRINO

**Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC
e via Wnt1 nos ameloblastomas**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o 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 Júnior

São Paulo

2014

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

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Quirino, Lilian Caldas.

Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC e via Wnt1 nos ameloblastomas/ Lilian Caldas Quirino; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2014.

60p. : fig., tab., graf.; 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. Proteínas. 3. Imunohistoquímica. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Quirino LC. Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC e via Wnt1 nos ameloblastomas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Bento e Benedita, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos e nas grandes decisões da minha vida, sempre me orientando e me aconselhando em tudo, agradeço por todo carinho e amor incondicional a mim dedicado, sem esse apoio e esforço seria impossível alcançar tudo o que conquistei hoje e tudo o que ainda esta por vir, meus agradecimentos eternos de todo o meu coração.

Dedico também ao esposo, Fabio Almeida, meu amor, meu amigo, companheiro para todas as horas, o qual me incentivou a iniciar esse mestrado e com o qual tive todo o apoio, ajuda e ideias para a melhoria do mesmo, me impulsionou quando tive vontade de desistir, me aconselhou e ouviu todas as minhas angústias, dúvidas, sempre com muito amor e paciência, obrigada por tudo meu amor.

À minha irmã Tatiane, unidas pelo sangue e pela profissão, por todo o apoio, torcida, pelos desabafos e motivação em todos os momentos.

Aos meus amigos que me apoiaram e me ajudaram de maneira direta ou indireta para a concretização deste trabalho, meu muito obrigada.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos derramadas na minha vida, por estar sempre presente em todos os momentos, me guiando, iluminando os meus passos, minhas palavras, me dando sabedoria e paciência para acreditar que tudo valerá a pena se tiver fé, amor e caridade.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.**, pela oportunidade, por ter confiado em mim a imensa responsabilidade da realização deste trabalho, por ter “puxado a orelha” quando necessário e por toda a orientação, que foi de suma importância para o meu crescimento profissional, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** pela participação da minha qualificação e pelas dicas para a melhoria deste estudo e da minha conduta como profissional e como clínica também.

À **Profa. Dra. Marília T. Martins**, pelas oportunidades de participação nas suas aulas, onde aprendi muito, pelas orientações sempre pertinentes, pelas dicas para a montagem do meu casamento, vestido de noiva, com a qual sempre pude conversar sobre todos os assuntos.

À **Profa. Dra. Suzana C. O. Machado de Souza** e à **Profa. Dra. Marina Helena C. Gallottini** também pelas aulas e considerações pertinentes e pelo aprendizado e convivência.

À **Profa. Dra. Andréa Mantesso** pela orientação no PAE, atividade que acrescentou muito para o meu crescimento e pela experiência como docente.

Aos **Prof. Drs Celso Lemo, Norberto Sugaia e Fabio Alves** e aos **funcionários** do departamento, pela oportunidade de participação das atividades na clínica de Estomatologia, atividade que pude aprender e vivenciar momentos únicos como profissional atuante e aprendendo a cada paciente, experiência que veio a somar na minha vida.

Às secretárias **Zilda e Néia** pela ajuda e paciência com todas as papeladas, mas que fazem de forma prática toda essa parte burocrática.

À equipe do laboratório **Adriana, Elisa e Juvani**, sempre orientando com paciência e me ajudando com todas as muitas dúvidas que tive durante a realização laboratorial deste trabalho, sem eles seriam quase impossível à confecção do mesmo.

Aos meus amigos de pós-graduação, em especial a **Renata, Lara, Bianca, Bruno e Nelise** que me ajudou com os cortes histológicos, muito obrigada a todos mesmo pela companhia, pelo aprendizado e convivência nesses anos e por tornar mais leve e divertido a vida na pós-graduação.

Quase...

Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez, é a desilusão de um quase. É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata trazendo tudo o que poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase morreu está vivo, quem quase amou não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perdem por medo, nas ideias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de viver no outono. Pergunto-me às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna, ou melhor não me pergunto, contesto.

A resposta eu sei de cor, está estampada na distância e frieza dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos " bom dia", quase que sussurrados.

Sobra covardia e falta coragem até para ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai.

Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor, sentir o nada, mas não são.

Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os dias seriam nublados e o arco-íris em tons de cinza.

O nada não ilumina, não inspira, não aflige e nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que a fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance, para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer.

Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo.

De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma.

Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.

Desconfie do destino e confie em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu!

Luiz Fernando Veríssimo.

Resumo

Quirino LC. Expressão imuno-histoquímica da Axina1, GSK3 β , APC e via Wnt1 nos ameloblastomas. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida

Os ameloblastomas são tumores odontogênicos, de origem epitelial, que demonstra crescimento lento e comportamento invasivo e altamente recidivante. No entanto os mecanismos moleculares e as vias de sinalização celulares envolvidas na progressão desse tumor não estão claros. Estudos relatados na literatura indicam que aberrações nas vias de sinalização similares as encontradas durante o desenvolvimento dentário, incluindo a via Wnt1 e as proteínas GSK3 β , APC e Axina1, que formam o complexo de degradação da β -catenina podem estar alteradas nos ameloblastomas, levando a proliferação e progressão tumoral. O objetivo deste trabalho foi analisar a relação da expressão das proteínas Wnt1, GSK3 β , APC e Axina1 com a proliferação tumoral dos ameloblastomas por meio de reações de imuno-histoquímicas. Para este estudo foram selecionados 40 casos com o diagnóstico de ameloblastoma, pertencentes aos arquivos do Serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP e utilizada a técnica imunohistoquímica da estreptavidina-biotina em blocos parafinados destes casos selecionados. Nos resultados foram observados marcações positivas para a proteína Wnt1 em 25 (62,5%) casos, Axina1 em 23(57,5%), APC de 26(65%) casos e GSK3 β em 34(85%) casos.

Palavras chave:1 Ameloblastoma.2. Proteínas. 3 Imunohistoquímica.

Abstract

Quirino LC. Expression immunohistochemistry of Axina1, GSK3 β , APC e Wnt1 signaling in ameloblastomas. [dissertation]. São Paulo: Univerdidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida

Ameloblastomas is an odontogenic tumors of epithelial origin, which shows slow-growing, highly invasive and recurrent behavior. Nevertheles the molecular mechanisms and cellular signaling pathways involved in the progression of this tumour are not yet clear. Reported studies in leterature indicates that aberrations in signaling pathways similar to those found during tooth development, including Wnt1 and GSK3 β pathways, APC and Axin1 proteins which form the β -catenin degradation complex may be altered in ameloblastoma, leading to proliferation and tumour progression. The aim of this study was to analyze the relationship betw the expression of Wnt, β GSK3, APC and Axin1 proteins with the tumour proliferation in ameloblastomas by immunohistochemical reactions. For this study, 40 cases were selected with the diagnosis of ameloblastoma, from the Oral Pathology department archives, Dental School, University of São Paulo and the immunohistochemistry technique of streptavidin-biotin in paraffin blocks of these selected cases was perfomed. Positive results to the Wnt protein were observed in 25 (62.5%) cases, Axina1 in 23 (57.5%), APC of 26 (65%) cases and GSK3 β in 34 (85%) cases.

Keywords: 1 Ameloblastoma.2. Proteínas. 3 Imunohistoquímica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.2 - β -catenina/via Wnt Canónica. β -catenina é um componente de estruturas de adesão célula-célula. As junções aderentes são um fator-chave na sinalização da via Wnt24
- Figura 2.3 - A via de sinalização Wnt canónica. Na ausência de sinal, a ação do complexo de destruição ($\text{CKI } \alpha$, $\text{GSK3 } \beta$, APC, axina) cria uma β catenina hiperfosforilada, o que é um alvo para ubiquitinação e degradação pelo proteossoma. A ligação do ligante ao Wnt um complexo receptor Frizzled / LRP-5/6 conduz a uma estabilização do β catenina hipofosforilada, que interage com proteínas LEF / TCF no núcleo para ativar a transcrição. Em um caminho canónico, $\text{CKI } \alpha$, $\text{GSK3 } \beta$, APC, e Axin atuam como reguladores negativos e todos os outros componentes atuam de forma positiva.....28
- Figura 2.6 - Vias de sinalização que regulam o alvo do destino celular dos diferentes subconjuntos de substratos GSK335
- Figura 5.1.2- Marcação imuno-histoquímica para Wnt1 nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.46
- Figura 5.1.3- Marcação imuno-histoquímica para Axina1 nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.47
- Figura 5.1.4- Marcação imuno-histoquímica para APC nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.....48
- Figura 5.1.5- Marcação imuno-histoquímica para $\text{GSK3}\beta$ nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.....49

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.2- Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas em blocos parafinados de ameloblastomas.	39
Quadro 4.2.2- Quadro representando os anticorpos primários, secundários e terciários bem como suas concentrações, solução de recuperação antigênica e solução reveladora utilizadas nas reações imuno-histoquímicas nos ameloblastomas.....	40
Quadro 5.1.2 Quadro indicando em porcentagens as marcações das reações imuno-histoquímicas para as proteínas Wnt1, APC, GSK3 β e Axina1, analisados juntamente com as marcações nas regiões centrais semelhantes ao retículo estrelário do órgão do esmalte e periféricas na membrana das células da periferia.	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Ameloblastoma.....	16
2.1.1 <i>Ameloblastoma intraósseo multicístico ou sólido convencional</i>	18
2.1.2 <i>Ameloblastoma unicístico</i>	19
2.1.3 <i>Ameloblastoma periférico extra-ósseo</i>	20
2.1.4 <i>Ameloblastoma desmoplásico</i>	21
2.2 β -catenina	21
2.3 Via Wnt1	24
2.4 APC	28
2.5 Axina1	31
2.6 GSK3 β	33
3.PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Seleção dos casos	37
4.2 Reações de Imuno-histoquímica	37
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico com origem do epitélio odontogênico derivando de remanescentes da lâmina dentária. Apresentam um crescimento lento, localmente invasivo, com capacidade de infiltração pelos espaços medulares do osso, altamente recidivante, porém, apresentam um curso benigno na maioria dos casos.

São responsáveis por 10-30% de todos os tumores odontogênicos e 1% de todos os tumores orais que afetam os ossos do complexo maxilomandibular, sendo mais frequente em mandíbula do que na maxila. O tratamento é cirúrgico e pode variar desde um tratamento agressivo como a ressecção em bloco com margens de segurança como um tratamento mais conservador, incluindo enucleação, crioterapia, curetagem ou uma associação destas técnicas.

Por ser um tumor de origem epitelial algumas vias de sinalização que ocorrem no epitélio podem estar alteradas ou superexpressas, sendo a β -catenina uma proteína importante nessas vias, pois sua função sinalizadora está relacionada com a sua participação na via de sinalização Wnt, responsável pela transcrição de vários genes, controlando diversos aspectos do desenvolvimento embrionário e de doenças humanas, incluindo apoptose, proliferação e diferenciação celular. Um dos genes alvos desta cascata é o *CMyc*, e isto explica porque a auto ativação da via do Wnt pode levar a formação neoplásica.

Na ausência de sinais mitogênicos a β -catenina forma um complexo quaternário com o APC, GSK3 β e Axina1 que leva à sua ubiquitinação e degradação via proteossomo impedindo assim sua translocação para o núcleo.

As cateninas residuais mantêm as células unidas ligando-se as caderinas e mediando a ligação com o citoesqueleto de actina. Quando um sinal mitótico é enviado pela via de sinalização Wnt, a GSK3 β é antagonizada, evitando a degradação da β -catenina aumentando sua concentração no citoplasma. Dessa forma ocorrem ligações principalmente com fatores de transcrição que são

transportadas para o núcleo, como o LEF1 ativando a proliferação celular e sendo o ameloblastoma um tumor de origem epitelial alterações nessas vias poderiam levar à progressão do ameloblastoma, portanto o objetivo foi analisar por meio de reações imuno-histoquímicas a expressão das proteínas APC, GSK3 β , Axina1 e Wnt.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Semelhante a odontogênese, os tumores odontogênicos exibem características do ectomesênquima das interações que ocorrem durante a formação dentária. Após a formação da coroa acredita-se que restos epiteliais da região cervical que são deixadas no ligamento periodontal, originem vários tumores odontogênicos epiteliais. (Sukarawan et al, 2010)

2.1 Ameloblastoma

Ameloblastoma (da palavra em inglês *amel*, ou seja, esmalte, e a palavra grega *blastos*, que significa germe). Foi reconhecido em 1827 por Cusack, porém em 1885 foi denominado como epiteloma adamantino por Malassez e foi sendo renomeado a cada autor até que em 1930, Ivey e Churchill o denominaram como ameloblastoma (Martins et al., 2007; More et al., 2012).

Após diversas modificações na sua classificação, em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) dividiu o ameloblastoma em quatro subtipos biológicos: Ameloblastoma sólido/multicístico, ameloblastomas unicístico, ameloblastomas extra-ósseo/periférico e ameloblastoma desmoplásico. Também é descrito sua contraparte maligna, sendo o ameloblastomas maligno, termo usado quando há uma metástase de um ameloblastomas primário e este é histologicamente igual ao tumor primário e seu grau de malignidade é dado pela evolução clínica; e o carcinoma ameloblástico, o qual apresenta características de malignidade no tumor primário ou em metástases (Barnes et al., 2005; Neville et al., 2009.)

É um tumor odontogênico benigno que representa 1% de todos os tumores orais de origem epitelial e representa de 10% - 30% dos tumores de origem odontogênica. Excluindo o odontoma e o tumor odontogênico queratocístico, sua frequência relativa se iguala ou supera o combinado total de todos os outros tumores odontogênicos. Origina-se do epitélio odontogênico, provavelmente de derivar de remanescentes da lâmina dentária (Neville et al., 2009; Martins et al., 2007; More et al., 2012)

Não há diferenças na distribuição com relação ao sexo e raça, porém alguns estudos indicam uma maior predileção pelo sexo feminino em 1:1,3. Atinge uma ampla faixa etária que varia dos 07- 80 anos, com ocorrências uniformes entre a segunda e quinta década de vida e idade média de 37 anos (Kumamoto; Ooya., 2005; Martins et al., 2007; Miloro et al., 2008; Neville et al., 2009; Kleis; Costa., 2012; More et al., 2012;).

Por ser um tumor benigno apresenta crescimento lento, indolor e persistente. São localmente invasivos, e se iniciam como uma lesão óssea central e crescimento expansivo e destrutivo pela medular óssea, sem fenestrações das corticais ósseas na maioria dos casos, porém, tem o potencial para se comportar localmente de forma agressiva e causar metástases à distância, mais frequentes nos pulmões (Martins et al., 2007; Neville et al., 2009; Kleis; Costa., 2012).

Clinicamente a presença física do ameloblastoma pode causar alterações na oclusão, deslocamento e ou reabsorção dentária, edema gengival, ulcerações, abaulamento das corticais ósseas causando assimetrias faciais, causando deformidades estéticas, porém a dor e parestesia são incomuns mesmo em tumores grandes. (Martins et al, 2007; Neville et al.,2009).

Sua localização mais frequente é na mandíbula em torno de 80%, atingindo o ramo mandibular, na maioria dos casos associado a um terceiro molar incluso, a maxila é mais afetada na região do túber, porém quando atinge a maxila devido sua anatomia óssea, tendem a serem mais agressivos e difusos podendo atingir estruturas anatômicas importantes levando a um tratamento mais radical na maioria dos casos (Martins et al., 2007; Neville et al., 2009; Kleis; Costa, 2012).

Radiograficamente apresentam-se como lesões radiolúcidas multicísticas, com margens bem delimitadas, descritas como “bolhas de sabão” quando as loculações são grandes e como “ favos de mel” quando pequenas. Também podem ser uniloculares. Causam a reabsorção das raízes dentárias adjacentes ao tumor, porém com a preservação das corticais ou basal óssea (Martins et al., 2007; Neville et al., 2009).

O tratamento é cirúrgico e pode variar desde um tratamento agressivo como a ressecção em bloco com margens de segurança, como um tratamento mais conservador, incluindo enucleação, crioterapia, curetagem ou uma associação dessas técnicas. O índice de sucesso na sua remoção depende da técnica do procedimento realizado e apresenta um alto risco de recorrências (50-90%) quando não removido adequadamente, além das mutilações a cada procedimento cirúrgico advinda dessas recorrências (Neville et al., 2009; Kleis; Costa, 2012; More et al., 2012; Sathi et al., 2012; Wei et al, 2013).

O ameloblastoma ocorre em quatro diferentes situações clínico-radiográficas que merecem considerações em separados por causa do tratamento e prognósticos diferentes (Neville et al., 2009; Martins et al., 2007; Miloro et al., 2008).

2.1.1 Ameloblastoma intraósseo multicístico ou sólido convencional

Radiograficamente apresenta-se como uma lesão radiolúcida multilocular. Macroscopicamente, observa-se que a maioria dos tumores apresentam combinações variáveis dos aspectos sólido e cístico. Tumores grandes apresentam muitas vezes uma combinação de aspectos microscópicos que são divididos em 5 padrões (Neville et al., 2009).

- 1) **Padrão folicular:** é o mais frequente, apresentando ilhotas epiteliais que lembram o epitélio do órgão do esmalte em um estroma de densidade variável. As células das ilhotas são do tipo colunares, dispostas em paliçadas

semelhantes aos ameloblastos. Os ninhos de epitélio possuem uma área central composta de células arranjadas frouxamente, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte. Em outras áreas, as células periféricas podem ser mais cubóides e lembrar células basais. A forma cística é comum e pode variar de microcistos, que se formam dentro das ilhas epiteliais, a cistos macroscópicos (Martins et al., 2007; Neville et al., 2009).

- 2) **Padrão Plexiforme:** composto por longos cordões uniformes ou placas de epitélio odontogênico anastomosados, que são circundados por células colunares ou cúbicas semelhantes a ameloblastos. Apresenta um estroma vascularizado e composto de tecido conjuntivo fibroso. A formação cística é relativamente incomum (Martins et al., 2007; Neville et al., 2009).
- 3) **Padrão acantomatoso:** denominado quando apresenta uma extensa metaplasia escamosa, muitas vezes associada com a formação de queratina, nas porções centrais das ilhas epiteliais de um ameloblastoma folicular (Neville et al., 2009).
- 4) **Padrão de células granulares:** caracterizado pela presença de grupos de células granulares, com citoplasma abundante, contendo grânulos eosinofílicos. Pode ser considerado como um amadurecimento ou alteração degenerativa nas lesões de longa duração, e não tem sido observada em pacientes jovens ou em tumores clinicamente agressivos (Neville et al., 2009).
- 5) **Padrão de células basais:** é o menos frequente e constituído por ninhos de células basais uniformes. Não apresenta retículo estrelado nas porções centrais destes ninhos (Neville et al., 2009).

2.1.2 Ameloblastoma unicístico

Ocorre entre 10 e 15% de todos os ameloblastomas intraósseos. São encontrados frequentemente em pacientes mais jovens, na segunda década de vida,

com média de 23 anos, acometendo mandíbula em 90% dos casos na região posterior (Neville et al., 2009;; Kleis; Costa, 2012; More et al., 2012).

Radiograficamente apresentam-se como lesões radiolúcidas que circundam a coroa de um terceiro molar incluso, ou como áreas radiotransparentes bem definidas. Pode apresentar fenestrações em algumas áreas, mostrando algumas multilocularidades devido ao crescimento do tumor (Neville et al., 2009; Kleis; Costa, 2012).

O diagnóstico é realizado em conjunto da análise macroscópica e histológica da lesão. São divididos nas variantes:

- a) **Ameloblastoma unicístico luminal:** o tumor está restrito á superfície luminal do cisto. Apresenta camada basal de células cúbicas ou colunares, com núcleos hipercromáticos com polarização invertida e o citoplasma vacuolizado. As células epiteliais suprajacentes mostram-se dispostas frouxamente e lembram o retículo estrelado (Neville et al., 2009; Kleis; Costa., 2012).
- b) **Ameloblastoma unicístico intraluminal:** formações de projeções do epitélio ameloblástico projetando-se do limitante cístico para a luz do cisto, podendo preencher toda a luz do cisto (Neville et al., 2009; Keis; Costa, 2012).
- c) **Ameloblastoma unicístico mural:** ocorre uma invasão da parede fibrosa do cisto por um ameloblastoma típico folicular ou plexiforme determinando um comportamento mais agressivo (Neville et al., 2009; Kleis; Costa, 2012).

O tratamento é cirúrgico e pode variar desde um tratamento agressivo como a ressecção em bloco com margens de segurança, como um tratamento mais conservador como a enucleação, ou por uma associação de técnicas como a enucleação, crioterapia, osteotomia periférica ou uma combinação destas técnicas. Sua recorrência é menor quando comparado ao ameloblastoma sólido/multicístico (Milloro et al., 2008; Neville et al., 2009; Sukarawan et al., 2010; Kleis; Costa, 2012).

2.1.3 *Ameloblastoma Periférico (extra-ósseo)*

É a forma menos comum, representando menos de 1% de todos os ameloblastomas. Desenvolve-se no tecido gengival, mimetizando um fibroma ou o granuloma piogênico, indolor, mais frequentes na mandíbula do que na maxila. Atinge uma faixa etária adulta, variando dos 40 a 60 anos de idade e geralmente não ocorre a invasão óssea da lesão ficando restrita aos tecidos moles. Apresenta as mesmas características histopatológicas de um ameloblastoma intra-ósseo. O tratamento consiste da excisão local da lesão com raras recidivas (Neville et al, 2009; Milloro, 2008; Kleis; Costa, 2012).

2.1.4 *Ameloblastoma Desmoplásico*

Apresenta predileção pela região anterior da mandíbula e radiograficamente mimetiza uma lesão fibro-óssea com margens mal definidas. Ocorre uma desmoplasia do tecido conjuntivo associado à proliferação tumoral. Histologicamente apresenta pequenas ilhas e cordões de epitélio odontogênico imerso em um estroma densamente colagenizado (Neville et al., 2009; Martins et al., 2007).

2.2 β -catenina

A β -catenina foi originalmente isolada como uma proteína associada à região citoplasmática da caderina E, uma proteína transmembrânica envolvida na adesão celular, possui papel fundamental na adesão celular mediada por Ca^{2+} . Seu nome vem da palavra latina *catena*, que significa cadeia, devido à sua provável ancoragem ao citoesqueleto. Pertence à superfamília *Armadillo*, que são proteínas com domínio central comum com 12 sequências de repetição de 42 aminoácidos que interagem com diversas proteínas. A β -catenina consiste de uma região N-terminal com aproximadamente 130 aminoácidos com uma região central com 550 aminoácidos e uma região C-terminal 100 aminoácidos. Na região N-terminal contém sítios de fosforilação para GSK3 β , enquanto a região terminal possui a função de transativação requerida para a ativação de genes alvos. Além da função sinalizadora na via do Wnt e adesão celular, a β -catenina possui várias funções interagindo com proteínas incluindo a actina, facina e Presenilinas. A β -catenina possui 70% de similaridade com a placoglobina, encontrada nos desmossomos (Pinto Jr, 2003; Schussel, 2007).

A β -catenina possui duas funções distintas. A primeira é na junção celular, ligando-se tanto ao domínio citoplasmático da caderina E quanto à porção amino terminal da alfa catenina, sendo essencial para a promoção da adesão intercelular, através da conexão da caderina E com o citoesqueleto de actina. A segunda função é na forma monomérica ou livre e na via de sinalização Wnt, que envolve o complexo de transativação com os fatores de transcrição LEF/TCF, que quando se liga ao fator de transcrição celular, migra para o núcleo, onde atua na atividade transcricional com atuação em vários genes alvo, entre eles a ciclina D1. Esta vasta possibilidade de interações com diversos elementos faz da β -catenina uma proteína versátil com funções estruturais e sinalizadoras (Pinto Jr, 2003; Sekine et al, 2003; Schussel, 2007; Sathi et al., 2012)

A função sinalizadora da β -catenina está relacionada com a sua participação na via de sinalização Wnt. A β -catenina é um componente importante na via sinalizadora Wnt que regula a proliferação e morte celular. A via Wnt é responsável

pela transcrição de vários genes, controlando diversos aspectos do desenvolvimento embrionário e de doenças humanas, incluindo apoptose, proliferação e diferenciação celular. A principal característica é o acúmulo da β -catenina no citoplasma e consequentemente a sua translocação nuclear com a ativação dos fatores de transcrição, como observado na Figura 2.2 (Kumar et al., 2008; Wei et al., 2013).

Na ausência de Wnt, o complexo de destruição da β -catenina reside no citoplasma, onde se liga e fosforila a β -catenina, que em seguida, deixa o complexo ao ser ubiquitinizado por b-TRCP e é então degradada pelo proteassomo. Wnt induz a associação de Axina1, que funciona como uma ponte dando proximidade física para a interação com outras proteínas, com LRP fosforilada. A destruição do complexo se desfaz, e a β -catenina está estabilizada. (Pinto Jr, 2003; Clevers; Nusse, 2012).

O Complexo de destruição citoplasmática APC / Axina1 regulamenta a saída da via Wnt, controlando e estabilizando a β -catenina citoplasmática, que apresenta um papel chave na sinalização de saída da cascata Wnt canônica (Clevers; Nusse, 2012).

Em alguns casos, a ativação da via de sinalização Wnt pode aumentar o teor global de β -catenina, sem qualquer quantidade detectável da proteína no núcleo (Clevers; Nusse, 2012).

Mutações em *CTNNB1* alteram o motivo de consenso para a fosforilação pela GSK3 β permitindo a β -catenina de escapar da protease da via de degradação (Tanahashi et al., 2008).

A expressão alterada das caderinas e das cateninas foi associada com a perda de diferenciação, aquisição de fenótipo invasivo e prognóstico pobre em vários tipos de cânceres. A redução da adesão intercelular nos tumores pode significar um papel importante do complexo caderina E / β catenina (Pinto Jr, 2003; Schussel, 2007).

Durante a amelogenese a β -catenina é expressa na fase de campânula nos epitélios internos e externos, estrato intermediário, retículo estrelário e papila dental. (Tanahashi et al., 2008).

No estudo realizado por Siriwardena foi relacionado a agressividade do tumor com as marcações nucleares de β – catenina , bem como a perda da adesividade com a invasão tecidual nos ameloblastomas(Siriwardena et al, 2009; Siar et al, 2012)

Figura 2.2 – β -catenina/ via Wnt Canônica . β -catenina é um componente de estruturas de adesão célula-célula. As junções aderentes são um fator-chave na sinalização da via Wnt (Howard et al., 2003)

2.3 Via Wnt

O gene Wnt1, originalmente chamado Int-1, foi identificado em 1982 como um gene ativado por integração do tumor mamário de camundongos com DNA proviral em tumores de mama induzidos por vírus. O Wingless, gene da mosca *Drosophila* (GP), que controla a polaridade do segmento durante o desenvolvimento larvar, foi mais tarde demonstrado ser um homólogo de Wnt1. Alguns anos mais tarde, grandes lacunas na transdução de sinal Wnt foram fechados com a identificação de TCF / LEF, fatores de transcrição como efetores nucleares Wnt e como receptores Frizzleds Wnt(Clevers; Nusse, 2012).

Wnts são glicoproteínas segregadas que se ligam a sete receptores transmembrânicos chamado frizzleds. LRP 5 e 6 funcionam como co-receptores essenciais de ligantes de Wnt (Parveen et al., 2011).

A família dos genes Wnt codifica moléculas de sinalização rica em cisteína que controlam diversos processos celulares, incluindo a especificação do destino celular, proliferação, diferenciação e migração celular durante o desenvolvimento e homeostasia dos tecidos pós-natal, morfologia e motilidade em vertebrados e invertebrados. Wnt1 foi o primeiro membro da família Wnt a ser descoberto e é um fator de crescimento que modula a adesão de célula à célula. (Nakajima et al., 2003; Sukarawan et al., 2010; Clevers; Nusse, 2012; Siar et al, 2012).

Até o momento, os papéis Wnt foram reconhecidos em três vias distintas: a via canônica β -catenina, o caminho polaridade celular planar, e a via Wnt Ca^{2+} . A via Wnt canônica / β -catenina foi investigada em maior detalhe do que as outras duas vias, e inclui a proteína de polipose adenomatosa coli (APC), axina, e β -catenina. B-catenina é o fator-chave e funciona como um ativador da transcrição da via de sinalização Wnt, que é importante no desenvolvimento embrionário e tumorigenesis, ela regula o seu nível e localização sendo fundamental para mediar sinais Wnt (Wei et al., 2013; Senda et al., 2005).

Wnt é um fator solúvel que pode induzir a proliferação celular ligando-se ao seu receptor e transmitindo sinais que evitam a degradação de β catenina, o que permite sua translocação para o núcleo, onde age como um ativador da transcrição em conjunto com TcF. Nas células quiescentes, que não são expostas a Wnt, a β -catenina citoplasmática é degradada pelo complexo de destruição. A via de sinalização Wnt leva a estabilização de b- catenina citosólica (Kumar et al., 2008; Parveen et al., 2011; Clevers; Nusse, 2012).

As alterações do estado de fosforilação de proteínas são fundamentais para a regulação da sinalização Wnt. Vários componentes da via de sinalização Wnt incluindo axina1, 25olipose adenomatosa coli (APC) , o glicogênio sintase –quinase 3 (GSK3 ; tanto GSK β e GSK3 α) , e β – catenina são fosfoproteínas que são regulados através de fosforilação. A β – catenina ubiquitinizada é rapidamente degradada pelo proteassoma 26S, assegurando que as concentrações citoplasmáticas de β catenina fiquem muito baixas. Os ligantes Wnt secretados

agem sobre a célula no receptor de superfície Frizzled, que consiste em uma lipoproteína de baixa densidade, e ativam Dishevelled (DVL), através de um mecanismo mal compreendidos. (Salahshor; Woodgett, 2005; Tanahashi et al., 2008; Parveen et al., 2011). (Figura 2.3).

A β -catenina citoplasmática que se acumula no citoplasma transloca a degradação do proteossoma para o núcleo, o que resulta na ativação de células e fator 1 (TCF/LEF1) dependentes nas vias de transcrição. Desta forma a β -catenina acelera a expressão de vários tipos de genes alvos que codificam proteínas do ciclo celular ou da unidade de proliferação, incluindo a ciclina D1, fator de crescimento endotelial, vascular e *C-myc*. (Kumamoto; Ooya, 2005; Tanahashi et al, 2008) (Figura 2.3).

O processo de transmissão de sinal de Wnt, a formação de compostos é uma necessidade que induz a fosforilação de β -catenina e faz com que ela seja degradada, inibindo, assim, esta via. B-catenina é o fator regulador positivo da via de transmissão de sinal de Wnt, ao passo que a proteína APC, a GSK-3, e axina são fatores reguladores negativos (Wei et al., 2013).

Inibidores naturais do Wnt, por diversas formas de receptores de sinalização Wnt / β -catenina é regulada em vários níveis, inclusive por proteínas secretadas que antagonizam o ligante. Entre estes estão as proteínas secretadas Frizzled relacionadas (sFRPs) e proteína inibitórias Wnt (WIF), ambos os quais podem ligar Wnts, inibindo assim as interações entre os receptores de Wnt. Outros inibidores de Wnt incluem proteínas do Dickkopf (DKK) e APCDD1 que é uma glicoproteína ligada à membrana que inibe a sinalização Wnt ligando tanto Wnt e LRP (Clevers; Nusse, 2012).

A função do Wnt ainda é contraditória, pois evidências sugerem que Wnt possui propriedades oncogênicas e que aumentam o comportamento agressivo e maligno de vários tumores. Por outro lado, tem sido considerado um supressor tumoral no neuroblastoma. Quando superexpresso promove a sobrevivência das células inculindo uma perda de inibição de contato, perda de dependência de ancoragem e a taxa de formação tumoral em camundongos, assim como o aumento da migração celular e reorganização da actina (Sukarawan et al., 2010).

A via de sinalização Wnt desempenha um papel essencial no desenvolvimento dentário. Têm sido demonstrado que as moléculas de sinalização Wnt, incluindo a β -catenina, APC, Axina1 e 2 são alternadamente expressas durante as várias etapas da amelogenese. É possível que a sinalização da via Wnt anormal esteja correlacionada com a tumorigênese do ameloblastoma, além de perturbação do processo de diferenciação adequada dos tecidos odontogênicos progressão tumoral e sua manutenção (Sekine et al., 2003; Kumamoto; Ooya, 2005; Salahshor; Woodgett, 2005; Tanahashi et al., 2008; Siriwardena et al., 2009; Sukarawan et al., 2010).

Em camundongos mutantes, o desenvolvimento dos dentes é inibida quando a via Wnt é bloqueada pela inativação *LEF1* função ou pela superexpressão do inibidor de Wnt, *Dkk*. A função de *LEF1* é ativar genes alvo Wnt e no nó do esmalte, que é necessária para a transição de botão para capuz durante a morfogênese do dente. Estudos sugerem que a supressão da função Wnt é necessária durante fases específicas do desenvolvimento dentário e / ou no nó de esmalte (Lammi et al, 2004).

Alguns estudos indicam que a ruptura da sinalização de Wnt leva à falha de desenvolvimento dos dentes, ao passo que um aumento de sinalização leva ao desenvolvimento de dentes supranumerários. No entanto, outros estudos indicam que a superestimulação da via Wnt pode também levar a uma falha da morfogênese dentária. Dados recentes com base em um modelo matemático para via Wnt e sua confirmação experimental indicam que Axina1 e APC promovem a formação de complexos de degradação β -catenina de maneiras muito diferentes (Lammi et al., 2004).

Assim, é proposto que a ativação da via de sinalização Wnt pode contribuir para ameloblastoma (Wei et al., 2013).

Figura 2.3 – A via de sinalização Wnt canônica. Na ausência de sinal, a ação do complexo de destruição (CKI α , GSK3 β , APC, axina) cria uma β catenina hiperfosforilada, o que é um alvo para ubiquitinização e degradação pelo proteossoma. A ligação do ligante ao Wnt um complexo receptor Frizzled / LRP-5/6 conduz a uma estabilização do β catenina hipofosforilada, que interage com proteínas LEF / TCF no núcleo para ativar a transcrição. Em um caminho canônico, CKI α , GSK3 β , APC, e Axin atuam como reguladores negativos e todos os outros componentes atuam de forma positiva.

(http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html)

2.4 APC

A Polipose Adenomatosa Coli (APC) é uma proteína grande, com vários domínios de ligação para uma variedade de proteínas que estão envolvidas em diferentes funções de sinalização e do citoesqueleto. (Harris; Nilson, 2010). O gene APC é constituído por 15 exons e codifica uma proteína de 300 kDa, constituído 2.843 aminoácidos (Senda et al., 2005).

Superexpressão da APC inibe a progressão do ciclo celular de G0/G1 para a fase S e, por conseguinte foi sugerido que a APC pode associar-se com os microtúbulos e, assim, regular a migração celular (Senda et al., 2005).

A proteína Polipose adenomatosa coli (APC) é o produto de um gene supressor de tumor mutante em câncer colorretal e outros tipos de cânceres, é um organizador de citoesqueleto para a migração celular e um suporte para GSK3 β /CKI-mediada por fosforilação e degradação efetor de β -catenina pela via Wnt. Ainda não está claro se essas diferentes funções de APC estão acopladas ou reguladas de maneira independentes ou localizadas (Harris; Nilson, 2010; Wei et al., 2103).

A odontoma adenomatosa coli (APC) se liga a β -catenina e regula a via de sinalização Wnt, como é o caso de outros genes supressores tumorais, a APC regula negativamente o ciclo celular e inibe a proliferação celular. É basicamente uma proteína citoplasmática em condições normais das células epiteliais (Senda et al., 2005).

A APC foi encontrada por se ligar a β -catenina, o qual foi inicialmente identificada como uma proteína de adesão de caderina-E. Além disso, a co-localização de APC e β -catenina foi demonstrada ao longo de junções célula-célula entre as células epiteliais intestinais adjacentes mas ainda não está claro se a APC regula β -catenina no complexo caderina (Senda et al., 2005; Harris; Nilson, 2010;).

APC desempenha um papel importante na via de sinalização Wnt canônica, controlando os níveis de β -catenina, sendo uma chave efetora na via regulando negativamente a via de sinalização Wnt, portanto induzindo a degradação de β -catenina e inibindo a progressão do ciclo celular e progressão do tumor (Senda et al., 2005).

Foi sugerido que a APC nuclear pode estar envolvida na segregação cromossômica. Assim, as mutações em APC podem contribuir para a instabilidade cromossômica em cânceres. Além disso, a APC tem um sinal de exportação nuclear, o que é importante para o vaivém de β -catenina a partir do núcleo para o citoplasma. Com o acúmulo de β -catenina nuclear, o APC nuclear pode interceptar o excesso de β -catenina e enviar do núcleo para o citoplasma, onde β -catenina sofreriam degradação (Senda et al., 2005; Siriwardena et al., 2009).

Defeitos no gene APC causam a perda da regulação de β -catenina e facilita a ativação da via Wnt, semelhante á mutações da β -catenina (Kumamoto; Ooya, 2005).

Ratos selecionados para a molécula de sinalização Wnt LEF1 mostraram a inibição da morfogênese do dente (FAP), causada por mutações da linha germinativa do gene APC, que é um gene autossômico dominante e além da Síndrome da 30dontoma adenomatosa familiar, caracterizada por múltiplos pólipos adenomatosos no cólon e reto, muitas vezes associado com anomalias dentárias, como 30dontoma e dentes supranumerários e raramente ameloblastomas, como na Síndrome de Gardner (Kumamoto; Ooya, 2005; Tanahashi et al., 2008) .

Por APC ligar-se a β –catenina , o seu envolvimento na via sinalização Wnt tem sido investigado intensivamente , levando para uma compreensão do mecanismo pelo qual mutações de APC resulta na carcinogénese . Além disso, a identificação de novas proteínas de ligação a APC tem proporcionado alguns novos aspectos das funções do APC exceto supressão do tumor (Senda et al., 2005).

A expressão de β -catenina e APC em germes dentários e em ameloblastomas sugerem que a aberração da via de sinalização Wnt pode desempenhar um papel importante na tumorigênese e citodiferenciação do epitélio odontogênico na desregulação da proliferação celular (Kumamoto; Ooya, 2005).

Kumamoto em seu estudo analisou a por técnicas imuno-histoquímicas a expressão de β -catenina e APC em 10 germes dentários, 40 ameloblastomas e 5 carcinomas ameloblásticos e observou a imunorreatividade de APC no citoplasma de células normais e nas células neoplásicas, nos germes dentários teve maior expressividade nas células do epitélio do órgão do esmalte do que nas demais células(Kumamoto; Ooya, 2005).

A alta frequência da expressão de β -catenina nuclear e citoplasmática e a mutação missense do APC foram observados nos ameloblastomas, o que sugere que a acumulação de β -catenina no núcleo e a mutação missense do APC pode desempenhar um papel importante para a patogénese dos tumores odontogénicos epiteliais incluindo o ameloblastoma (Siriwardena et al., 2009).

2.5 Axina1

Axina1 foi originalmente identificado como o produto do gene do rato chamado " *fused* " ou "*fu*" (rebatizado Axina1), e tem sido demonstrado desempenhar um papel crucial no controle do eixo de formação durante o desenvolvimento embrionário e a superexpressão de Axina1 em embriões de rã inibe formação do eixo dorsal (Salahshor; Woodgett, 2005).

A compreensão das funções de Axinas é baseada em rato e peixe-zebra mutantes (também conhecidos como "Paulistinhas"), que mostram que a função de Axina 1 é necessária para a formação do eixo embrionário e para o desenvolvimento normal do tubo neural e do coração (Lammi et al, 2004).

Axina1, que codifica para uma das isoformas α e β , e Axina2 (também chamado *Axil* ou *Conductin*) tem 45 % identidade ao nível dos nucleotídeos e as proteínas que eles codificam parecem ser funcionalmente semelhantes e frequentemente desregulada em células cancerosas. Axina1 é componente constitutivamente expresso do complexo de degradação da β catenina e é essencial para a manutenção da baixa atividade da sinalização da via Wnt e sua manutenção no estado basal. Em contraste, a axina2 é regulada em resposta ao aumento da concentração de β catenina e serve, assim, para limitar a duração e intensidade do sinal Wnt. Axina1 é regulador negativo da via Wnt e é desfosforilada após estimulação Wnt, o que leva a desestabilização da Axina1 ao longo do tempo. As células que recebem os sinais do ligante Wnt têm baixas concentrações de axina1. Estudos bioquímicos demonstram que as concentrações intracelulares de axina1 são cerca de 1000 vezes menor do que dos outros componentes do complexo de destruição da β -catenina, sugerindo que axina1 é o fator limitante da via (Salahshor; Woodgett, 2005).

A proteína supressora de tumor Axina1 atua como o suporte do complexo de destruição, interagindo com β -catenina, as proteínas supressoras de tumor APC e

Wnt, e duas serina-treonina quinase constitutivamente ativas (CK1 α / d GSK3 α) (Nakajima et al., 2003; Clevers; Nilsson, 2012; Wei et al., 2013).

Além disso, Wnt modulam o padrão de formação e a morfogênese da maioria dos órgãos de influenciar e controlar a proliferação, motilidade e destino celular (Salahshor; Woodgett, 2005).

O efeito da Axina1 em concentrações de β catenina, juntamente com a sua inativação bialélica em alguns carcinomas hepatocelular humanos, indicaram que Axina1 é um gene supressor tumoral (Salahshor; Woodgett, 2005).

A axina1 tem duas funções de transdução de sinal: atua como um regulador negativo da via de sinalização Wnt e como um regulador positivo de via de sinalização TGF- β . Alguns dos alvos a “jusante” de sinalização TGF- β são genes *checkpoint* do ciclo celular importantes, incluindo CDKN1A (p21), CDKN1B (p27) e CDKN2B (p15), e sua ativação conduz à paragem do crescimento. Assim, o TGF- β serve como um supressor tumoral no epitélio intestinal normal e, inibindo a proliferação das células e indução de apoptose. (Parveen et al., 2011).

O efeito pleiotrópico em várias vias de sinalização faz axina1 uma proteína de suporte notável. Ela é a plataforma central para a APC – GSK3 β , complexo degradação β catenina, bem como em SAPK /JUN, TGF- β , aberrações em qualquer caminho na axina1 levando sua desregulação leva à perturbação da via de sinalização e suas interações (Parveen et al., 2011).

Enquanto a maioria dos genes-alvo Wnt são de tecido ou fase específica de desenvolvimento, o gene Axina1 é geralmente considerado como um alvo transcricional e, por conseguinte, um indicador geral da atividade da via Wnt (Clevers; Nusse, 2012).

Axina1 tem surgido como uma importante proteína de suporte para regular uma variedade de vias de sinalização e funções biológicas (Parveens et al., 2011).

Axina1 foi expresso uniformemente nas mandíbulas em desenvolvimento. Mutações germinativas em Axina1 e 2 foram relatadas para causas familiares de agenesias dentárias. Estes achados sugerem que a via de sinalização Wnt desempenha um papel crítico no desenvolvimento dentário e a axina por ser um

fator limitante da via Wnt sendo um regulador negativo, pode atuar na proliferação dos ameloblastomas, porém poucos estudos relacionam a axina ao ameloblastomas. (Tanahashi et al., 2008; Wei et al., 2013).

2.6 GSK3 β

A serina / treonina-quinase de glicogênio-sintase-quinase-3 (GSK-3), foi inicialmente identificada e estudada na regulação da síntese de glicogênio. A GSK-3 funciona em uma ampla variedade de processos celulares (McCubrey et al., 2014).

GSK3 desempenha papéis pleiotrópicos na promoção da ativação da via sinalização Wnt no nível do receptor, ao mesmo tempo, atuando como um regulador negativo da β -catenina (Clevers; Nusse, 2012).

GSK-3 tem vários papéis no câncer, que, mesmo depois de anos de estudo permanecem complexos e controversos. A atividade aberrante de GSK-3 tem sido implicada em muitas patologias humanas, incluindo: depressão bipolar, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, câncer, diabetes mellitus não-insulino-dependente (DMNID). A GSK-3 é tumorigêneses em vários tipos de tumores, incluindo; tumores de cólon, fígado, ovário e pâncreas (McCubrey et al., 2014).

Três formas similares de glicogênio sintase –quinase 3 (GSK- 3- α , GSK- 3 β 1 e GSK- 3 β 2) têm um papel importante nas vias de sinalização Wnt e Hedgehog em regular o ciclo de divisão celular, renovação e diferenciação de células-tronco, apoptose, o ritmo circadiano, a transcrição e a ação insulina (Meijer et al., 2004) (Figura 2.6)

A maior estratégia tem sido amplamente utilizada para inativar a enzima de GSK3, porém efeito inibidor da GSK3 na inibição do sinal de Wnt deve-se ao

acoplamento direto da GSK3 para os receptores Wnt pelo suporte proteínas APC e Axina1 (Clevers; Nusse, 2012).

Mutações somáticas de β – Catenina envolvendo glicogênio-sintase-quinase-3 β (GSK-3 β) dependentes de locais de fosforilação foram relatados em vários tumores. Isto resulta na estabilização da β – catenina inibindo a degradação proteossomal e constitui a ativação de TCF/LEF1 (Sekine et al., 2003).

Embora ambos, β -catenina e Wnt são reguladores positivos da via e têm sido identificados como proto-oncogenes, APC e axina1 são considerados como efetores negativos da via e funcionam como supressores. Este modelo afirma que, por causa APC, GSK3 e Axina1 a degradação mediada de β -catenina é inibida por ambos os sinais de Wnt ou mutação nos componentes da via de sinalização Wnt, a concentração de β -catenina em células é aumentado, levando a um aumento de células proliferação e câncer (Salahshor; Woodgett, 2005).

Primeiramente, GSK- 3 β é regulada por fosforilação pós- translacional de Ser9 (inibitória) e Tyr216 (ativar) (Ser21 e Tyr279 , respectivamente, na GSK -3 α) Fosforilada Ser9 no domínio N –terminal de GSK – 3 β atua como um pseudo – substrato que bloqueia o acesso de substratos para o sítio catalítico. Em segundo lugar, GSK- 3 β é regulada por interações com muitas outras proteínas. Axina1 e presenilina atuam como proteínas de ancoragem que permitem que os substratos façam contato com o priming quinase [caseína quinase (CK1) e proteína quinase A , respectivamente] e de GSK- 3 . As proteínas pode, assim , especificar diferentes funções para GSK – 3 na célula . Em terceiro lugar de ação, a GSK – 3 requer a fosforilação primária de seus substratos por outra cinase de um resíduo de serina localizado quatro aminoácidos C –terminal para a fosforilação de GSK3 β site. Em quarto lugar , a GSK -3 é regulada por meio de sua distribuição intracelular (Meijer et al., 2004).

Muitos tipos de câncer, especialmente câncer colorretal, têm defeitos em elementos da via Wnt, que resultam na ativação anormal de sinalização Wnt e acumulação de β – catenina, um fator que controla cotranscrição de numerosos genes envolvidos na carcinogênese. Além disso, a inibição de GSK3 β estabiliza três reguladores do ciclo celular, ou seja, ciclina D1, ciclina E e de *c-Myc*, a superexpressão dos quais está ligado com tumorigênese (Meijer et al., 2004).

3 Proposição

Este trabalho teve por objetivo analisar a relação da expressão das proteínas Wnt, GSK3 β , APC e Axina1 nos ameloblastomas por meio de reações de imunohistoquímicas.

4 Materiais e Métodos

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), que aprovou a realização desta pesquisa em 06/08/14, por meio de parecer do número CAAE 18929213.4.0000.0075 (Anexo A)

4.1 Seleção dos casos

Foram utilizados 40 casos de biópsias, diagnosticados como ameloblastoma, sendo 39 casos em mandíbula e 1 caso em maxila, pertencentes ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

Foram excluídos blocos diagnosticados como ameloblastoma desmoplásico, periféricos, carcinoma ameloblástico, ameloblastoma maligno, blocos danificados ou com material insuficiente para a realização das reações imuno-histoquímicas.

Casos de carcinoma epidermóide foram utilizados como controle positivo em todos os anticorpos estudados.

4.2 Reações de Imuno-histoquímica

Do material emblocado em parafina, foram obtidos cortes histológicos com 3 µm em espessura, dispostos em lâminas histológicas de vidro (26mm x 76mm), previamente silanizadas. Após, as lâminas seguiram para uma estufa a 60°C,

permanecendo um tempo estimado de 24h. A seguir, foi realizado a desparafinização em dois banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto I, etanol absoluto II, etanol absoluto III, etanol 95%, etanol 90%, etanol 85%, e etanol 80%) durante 3 minutos cada. Após a reidratação, foi realizado a remoção do pigmento formólico através de incubação em solução de hidróxido de amônia e a 10% em etanol 95% durante 5 minutos. Após essa etapa, seguiu-se duas lavagens em água destilada por 5 minutos, sendo que a segunda lavagem a água destilada foi aquecida por 2 minutos no microondas. A recuperação antigênica foi realizada com solução de ácido cítrico com pH de 6.0 por 30 minutos em banho-maria com temperatura de 95°C para todos os anticorpos analisados nessa pesquisa. Após os 30 minutos a solução de ácido cítrico foi retirada aos poucos com água destilada até chegar à temperatura ambiente. A seguir foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol em 2 banhos por 15 minutos cada. Logo após foi realizado um tamponamento com 2 banhos de TRIS pH 7,6, por 10 minutos cada. Os anticorpos utilizados estão listados na Quadro 4.2 a seguir:

Anticorpo 1°	Clone	Número	Marca	Origem
GSK3 β	Monoclonal de coelho	Y 174	Abcam	EUA
Wnt1	Policlonal de coelho	15251	Abcam	EUA
APC	Policlonal de coelho	15270	Abcam	EUA
Axina1	Policlonal de cabra	115205	Abcam	EUA

Quadro 4.2 – Anticorpos utilizados nas reações imunohistoquímicas em blocos parafinados de ameloblastomas

O passo seguinte foi a incubação com o anticorpo primário bem como as demais sequências que seguem descritas no Quadro 4.2.2 abaixo:

Anticorpo 1° (1 hora)	Concentração	Recuperação antigênica (30 min)	Anticorpo 2° (30 min)	Anticorpo 3 ° (30 min)	Solução Reveladora (10 min)
GSK3 β	1:400	Ác. Cítrico, pH 6.0	B.L.U*	<i>Streptavidin- HRP</i>	DAB (DAKO#k3468)
Wnt1	1:300	Ác. Cítrico, pH 6.0	B.L.U	<i>Streptavidin- HRP</i>	DAB (DAKO#k3468)
APC	1:400	Ác. Cítrico, pH 6.0	B.L.U	<i>Streptavidin- HRP</i>	DAB (DAKO#k3468)
Axina1	1:400	Ác. Cítrico, pH 6.0	B.L.U	<i>Streptavidin- HRP</i>	DAB (DAKO#k3468)

*B.L.U : *Biotinylated Link Universal*

Quadro 4.2.2 – Quadro representando os anticorpos primários, secundários e terciários bem como suas concentrações, solução de recuperação antigênica e solução reveladora utilizadas nas reações imunohistoquímicas nos ameloblastomas.

A solução foi colocada sobre os cortes permanecendo por 1 hora. Após, foram novamente lavadas 3 vezes com TRIS, por 5 minutos cada e incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos com a solução *biotinylated Link Universal*. Após, foram realizadas mais 3 lavagens com TRIS, 5 minutos cada. Após esta etapa, seguiu-se a incubação com o anticorpo terciário com a solução Streptavidin-HRP por mais 30 minutos e depois novamente 3 lavagens de 5 minutos cada com TRIS.

Após o DAB (DAKO, #k3468), os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Mayer (LAFAN # 15772), lavados em imersões de água, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%,75% 80%,85% 90%, 95%, 100%) 3 minutos em cada solução, diafanizados em 2 banhos de xilol I por 3 minutos e xilol II por 5 minutos e montados mecanicamente pelo aparelho *Tissue Tec* (SCA) Sakura para microscopia.

4.3 Análise dos resultados

As lâminas foram analisadas e descritas as marcações imuno-histoquímicas desses anticorpos nos cortes histológicos desses ameloblastomas por dois observadores previamente calibrados, que analisaram a marcação imuno-histoquímica na membrana para o anticorpo Wnt, citoplasma para os anticorpos GSK3 β , APC, Axina1 e no núcleo para o anticorpo APC nas áreas centrais semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte e na região periférica em campos representativos de ameloblastomas em microscópio de luz da marca Olympus CH-2.

5 Resultados

Foram analisados 40 blocos parafinados de ameloblastomas pertencentes ao arquivo ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

5.1.1 Resultado para a análise imuno-histoquímica

Em todos os 40 casos de ameloblastoma desta pesquisa foram realizados reações imuno-histoquímicas para os anticorpos Wnt1, Axina1, GSK β e APC, e os resultados foram descritos de forma independente e resumidos no Gráfico 5.1.1 a fim de melhor compreensão do leitor.

5.1.2 Análise dos resultados para a marcação da proteína Wnt

Para a proteína Wnt1 observamos marcação positiva em 25 (62,5%) casos, sendo observada essa marcação na região central semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte em 23 (92%) casos e na região periférica em 19 (76%) casos, como descrito no Quadro 5.1.2 e ilustrado na Figura 5.1.2.

5.1.3 Análise dos resultados para a marcação da proteína Axina1

Houve marcação positiva em 23 (57,5%) casos, sendo observada essa a marcação na região central semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte em 21 (91,3%) casos e na região periférica em 13 (56,5%) casos, observado no Quadro 5.1.2 e ilustrada na Figura 5.1.3.

5.1.4 Análise dos resultados para a marcação da proteína APC

Houve marcação positiva em 26 (65,0%) casos, sendo observado essa marcação na região central semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte em 26 (100%) casos e na região periférica em 17 (65,4%) casos. Não foi observada marcação nuclear em nenhum dos casos analisados, como observado no Quadro 5.1.2 e ilustrado na Figura 5.1.4.

5.1.5 Análise dos resultados para a marcação da proteína GSK3 β

Observamos marcação positiva em 34 (85,0%) casos, sendo essa marcação na região central semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte em 34 (100%) casos e na região periférica em 23 (67,6%) casos. Conforme ilustrado na Figura 5.1.2 e no Quadro 5.1.5..

Anticorpo	Wnt1	APC	GSK3 β	Axina1
Marcação Positiva (40) casos	25 (62,5%)	26 (65%)	34 (85%)	23 (57,5%)
Região central	23 (92%)	26 (100%)	34(100%)	21 (91,3%)
Região periférica	19 (76%)	17 (65,4%)	23 (67,6%)	13 (56,5%)

Quadro 5.1.2 Quadro indicando em porcentagens as marcações das reações imuno-histoquímicas para as proteínas Wnt1, APC, GSK3 β e Axina1, analisados juntamente com as marcações nas regiões centrais semelhantes ao retículo estrelário do órgão do esmalte e periféricas na membrana das células da periferia.

Gráfico 5.1.1 - P (Positivo) N (Negativo). Gráfico comparativo em porcentagens das marcações das reações imuno-histoquímicas para as proteínas GSK3 β , APC, Axina1 e Wnt1.

Figura 5.1.2 – Marcação imuno-histoquímica para Wnt1 nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.

Figura 5.1.3 – Marcação imuno-histoquímica para Axina1 nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.

Figura 5.1.4 – Marcação imuno-histoquímica para APC nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.

Figura 5.1.5 – Marcação imuno-histoquímica para GSK3 β nos ameloblastomas, onde podemos observar a marcação positiva nas células centrais organizadas frouxamente que semelhantes o retículo estralado do órgão do esmalte e também nas células periféricas da lesão.

6 Discussão

Vários estudos recentes têm relatado alterações citogenéticas nos tumores odontogênicos de origem epitelial, no entanto os mecanismos de progressão e citodiferenciação permanecem desconhecidos (Kumamoto; Ooya, 2005).

B-catenina, foi originalmente isolada pela sua associação com o domínio citoplasmático da molécula de adesão celular de caderina e tem um papel importante na sinalização da via Wnt para controlar proliferação e morte celular (Wei et al., 2013).

O acúmulo da β -catenina está relacionada a tumorigenese, progressão e a um pior prognóstico em diversos tipos de cânceres, como por exemplo no carcinoma hepatocelular, e no melanoma, a expressão de β -catenina é aumentada no interior das células, enquanto que na membrana celular do câncer de esôfago, de mama e outros cânceres a expressão diminui. Os dois modos de expressão aberrante mostram assim que β -catenina desempenha diferentes papéis no desenvolvimento do câncer (Wei et al., 2013).

No estudo realizado por Pulino, 2013 foi realizado imuno-histoquímica em 40 casos de ameloblastoma para análise da expressão de β -catenina e foi observado marcação positiva em 33 (82,5%) casos na membrana, citoplasma e núcleo e 7 (17,5%) casos na membrana e citoplasma. Em 15 (37,5%) casos com marcação nas áreas centrais do tumor, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte e concluíram que a proliferação celular nos ameloblastomas ocorre nas áreas centrais e periféricas (Pulino, 2013).

Estudar os mecanismos que fazem com que a β -catenina escape da degradação realizada pelo complexo residente no citoplasma, são importantes a fim de evitar um aumento da transcrição de genes alvo de Wnt (Lammi et al., 2004).

É possível que a sinalização anormal da via Wnt esteja relacionada com tumorigênese do ameloblastoma, além da interferência do processo adequado de diferenciação dos tecidos odontogênicos (Tanahashi et al., 2008).

Várias linhas de estudos sugerem que a aberração nas vias de sinalização similares às que são utilizadas durante o desenvolvimento dos dentes, incluindo a

via de Wnt, pode ser a causa de tumorigênese odontogênica e sua manutenção (Sukarawan et al., 2010).

A transdução do sinal da via Wnt é necessária para a formação dos dentes na amelogênese em especial para o órgão do esmalte. Verifica-se que a ruptura da sinalização de Wnt leva a falha de desenvolvimento dos dentes, enquanto que aumentou sinalização leva ao desenvolvimento de dentes supranumerários (Lammi et al., 2004; Kumamoto; Ooya, 2005).

Em 2008, Tanahashi et al realizaram um estudo em 18 casos de ameloblastoma para verificar expressão de β -catenina e estado mutacional dos genes envolvidos na via de sinalização Wnt, incluindo *CTNNB1*, *APC*, *Axin1* e *Axin2* e observou que as mutações nesses genes não está implicada na acumulação nuclear b-catenina e que outros membros da via de sinalização Wnt ,Frizzled, GSK3 β ou vias alternativas envolvidas na degradação de β -catenina independente da via de sinalização Wnt canônica, por exemplo, presenilina 1, pode estar envolvida na acumulação nuclear de β -catenina e deve ser sujeito de uma investigação mais aprofundada(Tanahashi et al., 2008).

Em nosso estudo, dos 40 casos de ameloblastoma analisados por métodos imuno-histoquímicos a proteína Wnt1 e observamos marcação positiva em 25 (62,5%) casos, sendo que, as células da região central, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte foi marcado em 23 (92%) casos quando comparado a marcação na membrana das células da região periférica em 19 (76%) casos, ,o que nós leva a sugerir que com a ativação dessa via a β -catenina não é degradada pelo complexo de degradação, sugerindo que a região central seja uma região onde ocorre uma maior proliferação quando comparado a região periférica dos ameloblastoma.

Porém a falta de estudos específicos relacionando Wnt1 aos ameloblastomas dificulta uma comparação efetiva com os nossos resultados.

Várias moléculas de sinalização Wnt, incluindo a β -catenina e APC são expressas durante o desenvolvimento dentário. Anomalias dentárias como os odontomas e dentes supranumerários estão associados a mutações na linha germinativa do gene APC. Siriwardena et al em 2009, observaram em seu estudo a

mutação do gene APC em 50% dos casos de ameloblastomas estudados. (Kumamoto; Ooya, 2005)

Kumamoto e Ooya em seu estudo analisaram a por técnicas imuno-histoquímicas a expressão de β -catenina e APC em 10 germes dentários, 40 ameloblastomas e 5 carcinomas ameloblásticos e observou a imunorreatividade normal de APC no citoplasma de células dos ameloblastomas e nas células neoplásicas, porém nos germes dentários teve maior expressividade nas células do epitélio do órgão do esmalte do que nas demais células, sugerindo que a transdução do sinal Wnt é necessária para a formação dos dentes. Neste estudo, imunorreatividade para APC em ameloblastomas benignos e malignos foi significativamente menor do que em germes dentários. Esta redução da expressão da APC é considerada por ser ligada a translocação nuclear de β -catenina em ameloblastomas, e a via de sinalização Wnt desregulada está possivelmente envolvida na tumorigênese ou citodiferenciação de epitélio odontogênico (Kumamoto; Ooya, 2005).

Em nosso estudo, dos 40 casos de ameloblastomas analisados para a proteína APC houve marcação positiva em 26 (65,0%) casos, sendo observada essa marcação na região central com as células semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte em 26 (100%) casos e no citoplasma das células da região periférica em 17 (65,4%) casos. Não foi observada marcação nuclear em nenhum dos casos analisados. Esses resultados nos sugerem que a β -catenina que está no núcleo não está sofrendo a ação de exportação da APC nuclear, colaborando para que esse acúmulo de β -catenina leve a crescimento dos ameloblastomas.

APC tem um sinal de exportação nuclear de β – catenina e devido a esse componente nuclear seria esperado uma marcação nuclear de APC, porém não foi observado em nosso estudo , o que nos leva a sugerir que a β – catenina acumulada no núcleo não está retornando do núcleo pela ação da APC nuclear para o citoplasma e conseqüentemente levando a crescimento do ameloblastoma.

Seria esperado em nosso estudo uma menor marcação citoplasmática da proteína APC, indo de encontro aos resultados obtidos por Kumamoto e Ooya, 2005; em 2008, sugerindo que uma baixa concentração de APC associado a desregulação da via Wnt levaria a tumorigênese do ameloblastoma, porém foi observado uma

marcação equivalente de APC comparado a marcação de Wnt nos ameloblastomas, levando a hipótese da proteína APC estar estabilizando a β -catenina citoplasmática.

GSK3 β foi originalmente identificado como uma importante enzima reguladora do metabolismo do glicogénio. Desde então, esta proteína foi identificada como sendo um regulador importante da sobrevivência celular e apoptose. Recentemente, estudos demonstraram que GSK3 β pode regular positivamente a proliferação e apoptose das células tumorais. Teoricamente, a inativação de GSK3 β pode levar ao aumento dos níveis de β -catenina citoplasmática e da ativação da via de sinalização Wnt (Zeng et al., 2014).

GSK3 β é amplamente estudada em diversos tipos de patologias humanas, como depressão bipolar, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, câncer, diabetes mellitus –insulino não –dependente (DMNID), entre outras (McCubrey et al., 2014). Porém faltam estudos em ameloblastomas.

Por fazer parte do complexo de degradação da β -catenina, nos propomos a analisar a expressão imuno-histoquímica de GSK3 β nos ameloblastomas e observamos marcação positiva em 34 (85,0%) casos, sendo observada essa a marcação nas células centrais semelhantes ao retículo estralado do órgão do esmalte em 34 (100%) casos e no citoplasma das células da região periféricas em 23 (67,6%) casos.

Diante desses resultados podemos especular que a proteína GSK3 β está relacionada com a progressão do ameloblastoma, permitindo a translocação da β -catenina para o núcleo, porém GSK3 β pode interagir com múltiplas vias de sinalização, tais como: PI3K/ PTEN/ Akt/ mTORC1, Ras / Raf / MEK / ERK, Wnt / beta-catenina, Hedgehog, Notch entre outras, oque talvez explique este resultado expressivo , dificultando assim a real interpretação dos nossos resultados(McCubrey et al., 2014).

Ainda não há estudos relacionando diretamente a proteína GSK3 β aos ameloblastomas, dificultando uma comparação entre nossos resultados com os achados na literatura.

Axin1 é um regulador negativo da via de sinalização Wnt. Acelera a fosforilação e ubiquitinação de β -catenina, inibindo assim a importação de β -catenina para o núcleo e a proliferação das células de controle (Nakajima et al, 2003).

Quando estudado o estado de Axina em células tumorais com invasão de vasos linfáticos, a expressão foi reduzida ou perdida, na maioria dos casos, o que sugere que a expressão reduzida de Axina inicia ou favorece a progressão tumoral (Nakajima et al., 2003).

Porém em nosso estudo, obtivemos marcação positiva em 23 (57,5%) casos, sendo observado essa a marcação nas células da região central, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte em 21 (91,3%) casos e no citoplasma das células da região periférica em 13 (56,5%) casos.

Seria esperado uma menor marcação da proteína Axina1, pois as células que recebem os sinais do ligante Wnt têm baixas concentrações de axina1, o que não foi observado em nosso estudo, sugerindo que Axina1 está parcialmente relacionada com a ocorrência dos ameloblastomas (Wei et al., 2013).

Assim como as outras proteínas analisadas em nossa pesquisa, os estudos relacionados á elas com os ameloblastomas são escassos ou inexistentes, dificultando a nossa comparação e interpretação dos resultados obtidos.

7 Conclusões

De acordo com o propósito deste trabalho, com a análise das reações imuno-histoquímicas realizadas nos 40 casos de ameloblastomas, observamos a marcação positiva para a proteína Wnt1 em 62,5%, APC 65,0%, GSK3 β 85% e Axina1 57,5 % dos casos analisados, o que nos leva a sugerir que as proteínas Wnt1, GSK3 β , Axina1 e APC estão parcialmente relacionadas com o crescimento nos ameloblastomas e que a marcação mais expressiva para todas as proteínas analisadas nesse estudo, na região central, semelhante ao retículo estrelário do órgão do esmalte, sugere que esta região pode ser a principal responsável pelo crescimento nos ameloblastomas.

Referências¹

Barnes I, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. (World Health Organization classification of tumours, 9).

Clevers H, Nusse R. Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. Cell. 2012 Jun 8;149(6):1192-205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

Harris ES, Nelson WJ. Adenomatous polyposis coli regulates endothelial cell migration independent of roles in B catenin signaling and cell-cell adhesion. Mol Biol Cell. 2010 Aug 1;21(15):2611-23. doi: 10.1091/mbc.E10-03-0235. Epub 2010 Jun 2.

Kleis C, Costa CP. Ameloblastoma unicístico: revisão de literatura e relato de um caso clínico [especialização]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Odontologia; 2012.

Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of b-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. J Oral Pathol Med. 2005 Aug;34(7):401-6.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Patologia Básica. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Lammi L, Arti S, Somer M, Jarvenen H, Lahermo P, Thersleff I, et al. Mutations in Axin2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Human Genet. 2004 May;74(5):1043-50.

Martins MD, Rosa Jr AO, Martins MAT, Bussadori SK, Fernandes KPS. Ameloblastoma: revisão de literatura. ConScientiae. 2007;6(2):269-78.

McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. Oncotarget. 2014 May 30;5(10):2881-911.

Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase. Trends Pharmacol Sci. 2004 Sept;25(9):471-80.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waiti PD. Princípios de cirurgia bucomaxilofacial de Peterson. São Paulo: Editora Santos; 2008.

More C, Tailor M, Patel HJ, Asrani M, Thakkar K, Adalja C. Radiographic analysis of ameloblastoma: A retrospective study. Indian J Dent Res. 2012 Sep-Oct;23(5):698. doi: 10.4103/0970-9290.107436.

Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cellcarcinoma. Br J Cancer. 2003 Jun 2;88(11):1734-9.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia oral & maxilofacial. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

Parveen N, Hussain MU, Pandith AA, Mudassar S. Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. Med Oncol. 2011 Dec;28 Suppl 1:S259-67. doi: 10.1007/s12032-010-9722-x. Epub 2010 Oct 30.

Pinto Jr DS. Expressão e participação da β -catenina em carcinomas epidermóides bucais: análise tecidual e em cultivo celular [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2003.

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.

Salahshor S, Woodgett JR. The links between axin and carcinogenesis. J Clin Pathol. 2005 Mar;58(3):225-36.

Sathi GA, Tsuijigiwa H, Ito S, Siar CH, Katase N, Tamamura R, et al. Osteogenic genes related to the canonic Wnt patway are down regulated in ameloblastoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012 Dec;114(6):771-7. doi: 10.1016/j.oooo.2012.08.453.

Schussel JL. Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermópide de lábio [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.

Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, et al. Catenin Mutations Are Frequent in Calcifying Odontogenic Cysts, but Rare in Ameloblastomas. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):1707-12.

Senda T, Shimomura A, Iizuka-Kogo A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int*. 2005 Sept;80(3):121-31.

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. 2012 Apr;41(4):332-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01104.x. Epub 2011 Nov 14.

Siriwardena BSMS, Kudo Y, Ogawa I, Tilakaratne WM, Takata T. Aberrant b-catenin expression and adenomatous polyposis coli gene mutation in ameloblastoma and odontogenic carcinoma. *Oral Oncol*. 2009 Feb;45(2):103-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.03.008. Epub 2008 May 16.

Sukarawan W, Simmons D, Suggs C, Longo K, Wright JT. WNT5A Expression in Ameloblastoma and Its Roles in Regulating Enamel Epithelium Tumorigenic Behaviors. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):461-71. doi: 10.2353/ajpath.2010.090478.

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. *J Oral Pathol Med*. 2008 Oct;37(9):565-70.

Wei Z, Zhong M, Guo Y, Wang Y, Ren M, Wang Z. Expression of β -catenin and AXIN2 in ameloblastomas. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(3):250-6.

Zeng J, Liu D, Qiu Z, Huang Y, Chen B, Wang L, et al. GSK3 β overexpression indicates poor prognosis and its inhibition reduces cell proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. 2014 Mar 11;9(3):e91231. doi: 10.1371.

8 ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Vias de sinalização WNT, GSK3, APC E Axin nos ameloblastomas.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18929213.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 350.863

Data da Relatoria: 02/08/2013

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto que pretende avaliar 40 casos de ameloblastomas em blocos parafinados do arquivo de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Serão realizados nos 40 casos reações imunohistoquímicas com os anticorpos anti Wnt, anti GSK3B, anti APC e anti Axin. analisada e descrita a marcação imuno-histoquímica desses anticorpos .

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores pretendem analisar a expressão da via Wnt e do complexo GSK3B, Axin e APC na degradação da beta catenina nos ameloblastomas. Esperam obter a marcação nuclear de beta catenina nos ameloblastomas , além da marcação citoplasmática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos pois o material já encontra-se em blocos de parafina. Serão analisadas possíveis alterações na vias de sinalização nos ameloblastomas, possibilitando intervenções que favoreçam um melhor prognóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizados 40 casos de ameloblastomas em blocos parafinados do arquivo de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Campus da Capital. Serão realizados nos 40 casos, reações imunohistoquímicas com os anticorpos anti Wnt, anti

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 350.863

GSK3B, anti APC e anti Axin.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não haverá participantes diretamente envolvidos uma vez que será utilizado material proveniente dos arquivos do serviço de anatomia patológica da FOU SP.

Recomendações:

Serão utilizadas amostras de ameloblastomas em blocos parafinados do arquivo de Patologia Bucal da FOU SP e a única recomendação é a que a identidade dos pacientes seja preservada.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOU SP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 06 de Agosto de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazovic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br