IVAN JOSÉ CORREIA NETO

**Imunoexpressão do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 e do antígeno de
proliferação Ki67 em lesões odontogênicas**

São Paulo

2021

IVAN JOSÉ CORREIA NETO

**Imunoexpressão do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 e do antígeno de
proliferação Ki67 em lesões odontogênicas**

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 Ciências odontológicas.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo

2021

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

Correia Neto, Ivan José.

Imunoexpressão do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 e do antígeno de proliferação Ki67 em lesões odontogênicas / Ivan José Correia Neto ; orientadora Marília Trierveiler Martins -- São Paulo, 2021. 83 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Lesões odontogênicas. 2. Tumor odontogênico queratocístico. 3. Cisto dentígero. 4. Ameloblastoma. 5. Células-tronco. 6. Aldeído Desidrogenase. 7. Antígeno Ki-67. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Correia Neto IJ. Imunoexpressão do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 e do antígeno de proliferação Ki67 em lesões odontogênicas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 15 / 07 /2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cibele Pelissari dos Santos

Instituição: Pós-doutoranda da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Fabrício Passador Santos

Instituição: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Thalita Santana da Conceição

Instituição: Universidade CEUMA

Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho a Deus, autor da minha vida e o dono dos meus sonhos.

Quero dedicar especialmente à minha mãe, Ivana, minha irmã, Victória e a minha sobrinha Maria Luiza pelo apoio incondicional e que fizeram de tudo para que este sonho se tornasse possível. Vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Um agradecimento especial a minha querida orientadora Prof^a. Dra. Marília Trierveiler Martins. Obrigado por ter me acolhido, por ter investido o seu tempo para que eu pudesse me desenvolver como homem e profissional, e pela grande oportunidade de fazer o mestrado sob sua orientação. Agradeço pela confiança e por compartilhar o seu enorme conhecimento comigo. A senhora é um exemplo de professora e fonte de inspiração para todos que têm a oportunidade de apreciar sua convivência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

As minhas “irmãs” de orientação, Aline Queiroz e Cibele Pelissari. Obrigado pela amizade e por me ajudarem tanto. Desejo muito sucesso a vocês. Não existem palavras que expressem o tamanho da minha gratidão.

A todas as pessoas maravilhosas que conheci na FOU SP em especial, Thalita Santana, Gabriela Reganin e Jaqueline Alonso. Obrigado pela paciência, ajuda e carinho comigo.

Ao prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, que pra mim é um grande exemplo professor, dedicação, liderança e competência. Obrigado por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de tantas outras pesquisas.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”.

Romanos 8:28

RESUMO

Correia Neto IJ. Imunoexpressão do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 e do antígeno de proliferação Ki67 em lesões odontogênicas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

As lesões odontogênicas são entidades heterogêneas de grande importância clínica que se desenvolvem nos ossos maxilares a partir dos tecidos epiteliais e/ou ectomesenquimais do órgão dentário. O cisto dentígero, o tumor odontogênico queratocístico (TOQ) e o ameloblastoma são três das lesões mais comuns em seus grupos, sendo todas de origem epitelial que apresentam comportamentos biológicos diversos e que suscitam grande interesse dos pesquisadores. As células-tronco tumorais (CTT) estão presentes em neoplasias benignas e malignas e estão relacionada com o desenvolvimento dessas lesões. Entre os marcadores das CTT, ALDH1 vem sendo estudado em diversas neoplasias, devido à alta expressão que está associado com a progressão e prognóstico. O objetivo deste estudo foi analisar a presença e distribuição de células positivas para o marcador de CTT ALDH1 em cortes histológicos de cistos dentígeros, TOQ e ameloblastoma. Além disso, avaliar também o índice de proliferação de Ki67 por meio da imunomarcação. Os resultados para o ALDH1 foram avaliados de maneira semiquantitativa e os cortes receberam os escores: (-): ausência de células positivas, (+): <10% de células positivas, (++) : 10-50% de células positivas e (+++) : >50% de células positivas. Para o Ki67 a avaliação foi feita de forma quantitativa através da contagem de células positivas de três campos microscópicos mais expressos e a média calculada. Com relação ao ALDH1, a expressão no componente epitelial demonstrou ser significamente maior no TOQ em comparação ao ameloblastoma ($P > 0,0001$). Foi observado maior expressão do ALDH1 em cisto dentígero em comparação ao ameloblastoma ($P < 0,0108$). Para a expressão de Ki67 houve diferença estatística significativa entre as médias de comparação do TOQ com o cisto dentígero ($P = 0,0003$) e com o ameloblastoma ($P = 0,0006$). Com base nos resultados apresentados sugere-se que a expressão do ALDH1 e do Ki67 apresenta variações de marcação nas diferentes lesões odontogênicas estudadas. Para ambos os anticorpos, os casos do TOQ demonstraram expressões epiteliais muito maiores em comparação aos casos de cisto dentígero e ameloblastoma.

Palavras-chave: Lesões odontogênicas. Tumor odontogênico queratocístico. Cisto dentígero. Ameloblastoma. Célula-tronco. ALDH1. Ki67.

ABSTRACT

Correia Neto IJ. Immunoexpression of the cancer stem cell marker ALDH1 and the proliferating antigen Ki67 in odontogenic lesions [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2021. Versão Corrigida.

Odontogenic lesions are heterogeneous entities of great clinical importance that develop in the maxillary bones from the epithelial and/or ectomesenchymal tissues of the dental organ. Dentigerous cyst, keratocystic odontogenic tumor (KOT), and ameloblastoma are three of the most common lesions in their groups, all being of epithelial origin that presents diverse biological behaviors and arouses great interest among researchers. Tumor stem cells (TSCs) are present in benign and malignant neoplasms and are related to the development of these lesions. Among the markers of TSCs, ALDH1 has been studied in several neoplasms due to its high expression, which is associated with progression and prognosis. This study aimed to analyze the presence and distribution of cells positive for the TSCs marker ALDH1 in histological sections of dentigerous cysts, KOT, and ameloblastoma. In addition, to also evaluate the Ki67 proliferation index by immunolabeling. The results for ALDH1 were evaluated in a semiquantitative manner and the sections received the scores: (-): no positive cells, (+): <10% positive cells, (++) : 10-50% positive cells and (+++) : >50% positive cells. For Ki67 the evaluation was done quantitatively by counting positive cells from the three most expressed microscopic fields, and the mean was calculated. Regarding ALDH1, the expression in the epithelial component proved to be significantly higher in KOT compared to ameloblastoma ($P>0.0001$). Higher expression of ALDH1 was observed in dentigerous cyst compared to ameloblastoma ($P<0.0108$). For Ki67 expression, there was a statistically significant difference between the means of KOT comparison with dentigerous cyst ($P=0.0003$) and with ameloblastoma ($P=0.0006$). Based on the results presented, it is suggested that the expression of ALDH1 and Ki67 present labeling variations in the different odontogenic lesions studied. For both antibodies, the KOT cases showed much higher epithelial expressions compared to the dentigerous cyst and ameloblastoma cases.

Keywords: Odontogenic lesion. Odontogenic keratocyst tumor. Dentigerous cyst. Ameloblastoma. Stem Cells. ALDH1. Ki67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 5.1 – Médias dos resultados para Ki67, escores para ADLH1 e padrão de marcação para ALDH1	50
Figura 5.1 – Fotomicrografias mostrando o padrão de marcação para o ALDH1. A: cisto dentífero; B: tumor odontogênico queratocístico, C: ameloblastoma. Aumento de 400x	52
Gráfico 5.1 – Médias $\pm$ desvio padrão das contagens de células positivas para Ki67 nos casos de cisto dentífero	53
Figura 5.2 – Fotomicrografias que exemplificam a imunoexpressão de Ki67 em casos de cisto dentífero (400x)	54
Gráfico 5.2 – Médias $\pm$ desvio padrão das contagens de células positivas para Ki67 nos casos de tumor odontogênico queratocístico	55
Figura 5.3 – Fotomicrografias que exemplificam a imunoexpressão de Ki67 em casos de tumor odontogênico queratocístico (400x)	55
Gráfico 5.3 – Médias $\pm$ desvio padrão das contagens de células positivas para Ki67 nos casos de ameloblastoma	56
Figura 5.4 – Fotomicrografias que exemplificam a imunoexpressão de Ki67 em casos de ameloblastoma (400x)	56
Gráfico 5.4 – Comparação entre as médias $\pm$ desvio padrão de células positivas para Ki67 nas três lesões	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Características clínicas e demográficas dos casos deste estudo	48
Tabela 5.2 – Resultados da avaliação semiquantitativa do ALDH1 para cada uma das lesões do estudo	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB5	Do inglês <i>ATP-binding cassette sub-family B member 5</i>
AGR2	Do inglês <i>anterior gradient protein 2 homolog</i>
ALDH	Aldeído desidrogenase
BRAF	Do inglês <i>proto-oncogene B-Raf</i>
BML1	Do inglês <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD34	Do inglês <i>cluster of differentiation 34</i>
CD38	Do inglês <i>cluster of differentiation 38</i>
CD44	Receptor de superfície que regula a adesão
CD133	Glicoproteína expressa em células-tronco hematopoiéticas
CD166	Marcador de superfície celular
CTT	Células-tronco tumorais
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e eosina
Ki67	Proteína de proliferação celular Kiel-67
NANOG	Fator de transcrição humano
NESTIN	Do inglês <i>neuroectodermal stem cell marker</i>)
OCT4	Do inglês <i>octamer-binding transcription fator 4</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PTCH	Do inglês <i>patched</i>
p75NTR	Receptor neurotrófico p75
SOX2	Região Y-box 2 determinantes de sexo
TAZ	Co-ativador transcricional regulador de tamanho e tecido de órgãos
TOQ	Tumor odontogênico queratocístico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
>	Maior
<	Menor
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	812

1 INTRODUÇÃO

A odontogênese corresponde ao processo complexo de formação do dente, sendo que o desenvolvimento do dente é controlado pela interação molecular recíproca entre tecidos epiteliais e mesenquimais. Esse processo possui diversas etapas importantes relacionadas a morfo e histodiferenciação e tem sido utilizado há bastante tempo como modelo para o entendimento das interações de sinalização célula a célula (1). Ao final da odontogênese ilhotas de epitélio residual como os remanescentes da lâmina dentária, os remanescentes epiteliais de Malassez e o epitélio reduzido do órgão do esmalte permanecem na intimidade dos tecidos, em especial do tecido ósseo e pode, no futuro, acarretar o surgimento de lesões odontogênicas (1,2).

As lesões odontogênicas têm um amplo espectro de características clínicas, histopatológicas e radiográficas, o que pode repercutir nos variados comportamentos biológicos delas, os quais requerem diferentes abordagens e condutas clínicas. Entender as características clínico-patológicas das lesões odontogênicas tem um papel fundamental no diagnóstico precoce e no manejo correto do paciente (3).

O cisto dentígero, o tumor odontogênico queratocístico e o ameloblastoma são algumas das principais lesões odontogênicas benignas. De acordo com a recente classificação de tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2017, estas lesões pertencem a dois grupos, dos cistos odontogênicos e tumores odontogênicos. Sendo o ameloblastoma classificado como uma neoplasia benigna e os outros dois como cistos de desenvolvimento. Porém, uma das mudanças mais controversas e significativas nessa última classificação da OMS foi a renomeação do tumor odontogênico queratocístico como queratocisto odontogênico (4,5).

As células-tronco são células imaturas, não especializadas, que têm o potencial de se renovar pela sua capacidade de autorrenovação e formar novas linhagens celulares por meio da diferenciação (6). De acordo com Harada et al. (2002), as células dos ameloblastomas originam-se de células-tronco odontogênicas ou células amplificadas transitórias, que estão localizadas nos remanescentes da lâmina dentária dos molares. Com isso, durante o desenvolvimento desse tumor, as células-tronco da lâmina dental podem ser alvo para agentes carcinogênicos ou vírus que impossibilitem a sua diferenciação normal (7).

Há já importante evidência de que as células-tronco têm a capacidade de influenciar no desenvolvimento das neoplasias benignas e malignas. Essas células, quando transformadas, são denominadas de células-tronco tumorais e representam uma pequena subpopulação de

células-tronco, com a capacidade exclusiva de iniciar e sustentar o crescimento de uma neoplasia, além do potencial ilimitado de autorrenovação e replicação (7-9-11). As células-tronco são identificadas por meio de marcadores de superfície e diversos trabalhos caracterizam as células-tronco tumorais, demonstrando, por exemplo nas neoplasias malignas, que esses marcadores variam de acordo com o tecido adulto que originou aquela neoplasia (12-16).

Baseado no exposto, o presente estudo teve como objetivo identificar a presença e a distribuição do marcador de células tronco-tumorais ALDH1 nas lesões odontogênicas cisto dentígeros, tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma. Além disso, nos propusemos a avaliar o índice de proliferação celular nessas lesões por meio do marcador Ki67.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões odontogênicas

Os cistos e os tumores odontogênicos fazem parte das lesões que podem se desenvolver nos ossos maxilares e se originam a partir dos tecidos que dão origem aos dentes, sendo lesões frequentes e de grande importância clínica (17-19). Os cistos odontogênicos são encontrados na rotina odontológica de forma mais comum e em relação ao perfil de prevalência, a literatura aponta que esses cistos representam aproximadamente 11% das lesões diagnosticadas na região oral e maxilofacial (20). Os tumores odontogênicos, em contraste, são lesões incomuns encontradas nos maxilares e tecidos adjacentes. Constituindo um grupo heterogêneo de lesões que apresentam uma variedade de naturezas, tipos histológicos e comportamentos biológicos. A prevalência é variável de acordo com a localização geográfica, mas a distribuição é bastante semelhante em vários estudos (21-23).

Devido à diversidade dessas lesões, que surgem dos tecidos odontogênicos, vários tipos de classificação têm sido propostos para tentar elucidar seus critérios de diagnósticos e otimizar o tratamento dos pacientes afetados (17-19,24). O primeiro sistema de classificação internacionalmente aceito para as lesões odontogênicas foi publicado em 1971 pela OMS, que foi revisada e atualizada apenas em 1992 (17). Diante dos avanços em imuno-histoquímica e biologia molecular durante os anos, novas classificações foram propostas em 1992, publicada em 2005 (17,24,25) e, mais recentemente, em 2017 (4), que aborda tumores odontogênicos benignos e malignos, assim como os cistos odontogênicos e outras lesões ósseas relacionadas ao aparato odontogênico. Contudo, existem controvérsias nessas classificações e não são unanimemente aceitas dentro da comunidade científica, logo, não são uniformemente utilizadas.

A seguir vamos abordar as características mais importantes das lesões que serão estudadas.

2.1.1 Cisto dentígero

O cisto dentígero é o cisto odontogênico de desenvolvimento mais comum. Origina-se a partir do acúmulo de fluido no espaço localizado entre o folículo pericoronário e um dente impactado (19). A origem deve-se, provavelmente, à proliferação epitelial em torno da cavidade que é preenchida por um líquido ocasionando o crescimento da lesão pelo o aumento da pressão osmótica e hidrostática durante um extenso período de tempo, enquanto o dente não irromper (19). Ocorre mais em pacientes jovens ou adultos jovens, envolvendo mais a região de terceiros molares inferiores (19,26,27). Essa lesão também pode ocorrer em associação com odontomas e ao redor dos dentes supranumerários (19,28).

As lesões são pequenas, mas o estímulo de crescimento contínuo pode levar a um importante aumento de volume, atingindo grandes proporções e resultando em uma expansão da cortical óssea e assimetrias faciais (19,27,28). Ao exame radiográfico, o cisto dentígero mostra área radiolúcida com limites geralmente bem definidos e com bordas escleróticas, associada à coroa de um dente impactado. Também pode ser visto deslocamento de dentes e reabsorção radicular dos dentes adjacentes (19,26,27).

Microscopicamente suas características são variáveis. De modo geral, apresenta uma cápsula conjuntiva revestida por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, de espessura variável, contendo algumas áreas de hiperplasia. A cápsula exibe um tecido conjuntivo frouxo e delgado com infiltrado inflamatório crônico. Alguns cistos dentígeros podem apresentar células sebáceas, células mucosas e células claras, no revestimento epitelial (19,28).

O tratamento indicado é a enucleação da lesão junto com a extração do dente associado não irrompido, pois apresenta menor taxa de recidiva (19,26,27,29). Lesões maiores geralmente são submetidas a prévia descompressão a fim de reduzir seu tamanho e realizar a enucleação, conforme a evolução (29).

2.1.2 Tumor odontogênico queratocístico

O tumor odontogênico queratocístico é uma lesão de aspecto cístico e natureza incerta e que merece uma atenção especial devido às suas características histopatológicas específicas,

comportamento localmente infiltrativo, tendência a recidivas e potencial de crescimento (19,30). Acredita-se que essa lesão, assim como o ameloblastoma, tenha origem nos remanescentes da lâmina dentária (19,25). O tumor odontogênico queratocístico, também chamado de odontogênico, tem, ao longo dos anos, sofrido alterações de nomenclatura e de classificação, sempre acompanhadas de controvérsia (31).

O tumor odontogênico queratocístico foi reclassificado em 2017 pela OMS como um cisto de origem odontogênica. Há um amplo debate entre os pesquisadores sobre a suposta natureza neoplásica dessa lesão. Na maior parte, isso tem sido centrado em publicações que confirmam alterações moleculares da lesão (4,32). Mutações no gene *patched* (*PTCH1*), entre outras variações genéticas e epigenéticas, é encontrada no tumor odontogênico queratocístico. Aspectos relevantes que diferenciam essa lesão de outros cistos odontogênicos são seu comportamento clínico mais agressivo, com tendência a recidivas e também altamente recidivante e sua associação com a síndrome do carcinoma basocelular nevoide (4,19,32).

Embora possa ocorrer em qualquer segmento dos ossos maxilares, a região posterior de mandíbula é a mais afetada pelo tumor odontogênico queratocístico. A maioria dos pacientes diagnosticados encontram-se entre a segunda e quarta década de vida (19). Como o tumor odontogênico queratocístico tende a destruir o osso medular, crescendo em uma direção anteroposterior, com pouco envolvimento das corticais, alguns indivíduos não apresentam tumefação com a expansão do processo. Apesar da ausência de expansão óssea clínica sugerida para esse diagnóstico, a sua presença não deve descartar a possibilidade do tumor odontogênico queratocístico (4,19,30).

Frequentemente é uma lesão assintomática, mas quando atinge grandes proporções, manifesta uma sintomatologia dolorosa (4,19). Radiograficamente, apresenta-se como imagem radiolúcida uni ou multilocular, bem delimitada, por vezes associada a um dente incluso, mais comumente terceiros molares. Nesse caso, o diagnóstico diferencial deve ser feito com o cisto dentígero e o ameloblastoma. Na verdade, o exame radiográfico do tumor odontogênico queratocístico pode lembrar diversos outros cistos e tumores odontogênicos (4,19,30).

O diagnóstico desta lesão é alicerçado principalmente pelo histopatológico. Nele observa-se revestimento de epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado exibindo superfície corrugada, com espessura delgada e de poucas camadas celulares e interface plana com o tecido conjuntivo. Na camada basal do epitélio, notam-se células cuboidais ou colunares dispostas em paliçada, que frequentemente apresentam núcleos hipercromáticos. O estroma de tecido conjuntivo, no formato de uma cápsula, apresenta-se fino e friável, fato que explica a dificuldade do cirurgião em obter a enucleação completa da lesão sem a sua fragmentação.

Cistos satélites também podem ser encontrados na cápsula do tumor odontogênico queratocístico (19,30).

O tratamento mais frequentemente realizado é a enucleação, com ou sem prévia descompressão e seguido de tratamento das margens ósseas. Por vezes a ressecção cirúrgica é realizada (19,25,30,33).

2.1.3 Ameloblastoma

O ameloblastoma é o tumor odontogênico epitelial benigno mais comum (4,34). Origina-se do epitélio odontogênico e, apesar de ainda não estar totalmente esclarecida, a sua patogênese envolve alterações genéticas, como mutação do BRAF (35). Apresenta crescimento lento, localmente agressivo, de comportamento biológico invasivo e, se não removido de forma adequada, tem alta taxa de recorrência (4,19). Embora seja um evento raro, o ameloblastoma tem o potencial de sofrer transformação maligna (36).

Embora o ameloblastoma possa ocorrer em qualquer região dos ossos gnáticos, sua localização mais frequente é a região posterior e o ângulo da mandíbula de pacientes em uma ampla faixa etária, com pico de incidência entre a quarta e quinta década de vida e não há predileção por sexo (19). O tumor geralmente é assintomático e apresenta-se como uma tumefação facial de crescimento lento, que ao exame radiográfico revela uma imagem radiolúcida multiloculada ou uniloculada (4,35,36).

Apresenta três subtipos clínico-patológicos com características e comportamentos diversos: o sólido ou convencional, foco deste estudo; o unicístico; e o periférico (4,32). Microscopicamente é formado por ilhas e cordões de células epiteliais sendo que na periferia destas estruturas as células neoplásicas apresentam-se colunares e dispostas em paliçada, exibindo polarização invertida do seu núcleo, assemelhando-se a pré-ameloblastos, enquanto a região central das ilhas neoplásicas exibe células estreladas dispostas frouxamente, semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte. Focos de degeneração cística são comumente observados ao longo dos diferentes casos (19,25). Diversos subtipos histopatológicos são reconhecidos, mas os padrões histológicos não apresentam relação com o comportamento do tumor. Essas variantes microscópicas incluem os padrões folicular, plexiforme, acantomatoso, granular, basoloide e desmoplásico. O padrão folicular é o mais frequente, seguido pela variante plexiforme (32).

O diagnóstico do ameloblastoma depende da história clínica do paciente, dos exames físicos e radiográficos, associados aos detalhes preciosos histopatológicos concedidos através da biópsia incisional. O tratamento é normalmente realizado por meio da ressecção cirúrgica, incluindo margens segurança, uma vez que a lesão apresenta comportamento localmente infiltrativo e alta tendência a recidiva (25,31,32, 34-36). O conhecimento do papel biológico do tumor é importante para a escolha da abordagem terapêutica mais apropriada e o estabelecimento de um prognóstico mais preciso (19).

2.2 Células-tronco

As células-tronco são células clonogênicas, imaturas, não especializadas, que podem formar novas linhagens celulares por meio da diferenciação. Por definição, essas células têm o potencial de se renovar indefinidamente pela sua capacidade de autorrenovação. Os tipos celulares diferenciam em termos de localização no corpo e no tipo de células que podem dar origem (37). Embora não seja um consenso, as características gerais das células-tronco são de autorrenovação, persistência por muito tempo, geração de progênie destinada a se diferenciar em tipos celulares funcionais e de comportamento regulado pelo ambiente imediato (38,39).

De acordo com sua plasticidade, as células-tronco podem ser classificadas em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes tem a capacidade de formar qualquer célula do corpo mais o trofoblasto, incluindo os anexos embrionários. Por sua vez, as pluripotentes podem gerar qualquer célula do corpo, mas não pode originar tecidos extraembrionários e possui a capacidade apenas de se diferenciar em células dos folhetos embrionários, ou seja, ectoderma, endoderma e mesoderma, já as multipotentes são capazes de se diferenciar em mais de um tipo celular. É sabido que o único tipo de célula verdadeiramente totipotente é o ovócito secundário fertilizado (zigoto ou ovo) e seus produtos de clivagem precoce. As células-tronco pluripotentes compreendem as células-tronco embrionárias e as células pluripotentes induzidas. Enquanto as células-tronco distribuídas pelo corpo humano adulto que perpetua a renovação tecidual geralmente são multipotentes (38,39).

Por terem a capacidade de originar tipos celulares especializados, as células-tronco passaram a ser vistas como potenciais terapêuticos para a regeneração, substituição de tecidos danificados, e até na manipulação celular de órgãos *in vitro* (37).

2.2.1 Células-tronco tumorais (CTT)

No ano de 1994 foi publicada a primeira evidência da existência de uma CTT. Nesse estudo pioneiro, células de leucemia mieloide aguda foram separadas com base na expressão de marcadores de superfície e descobriu-se que células com o fenótipo CD34⁺ CD38⁻ eram capazes de iniciar um quadro de leucemia mieloide aguda quando transplantadas em modelo animal, enquanto células com outros perfis de marcadores de superfície não tinham essa capacidade (40).

As CTTs em uma neoplasia sólida, mais precisamente no carcinoma mamário, foram descritas pela primeira vez por Al-Hajj et al. Nesse estudo, os autores observaram que apenas uma pequena população de células, cujo fenótipo era CD44⁺/CD24⁻, tinha a capacidade de formar novos tumores quando implantadas em modelo animal. Assim foi possível distinguir, com base apenas na expressão de marcadores de superfície celular, as células iniciadoras da neoplasia das células não tumorigênicas que compunham a população de células do carcinoma mamário (41).

Desde então há muitas evidências de que uma massa tumoral é composta por conteúdo celular heterogêneo, abrangendo células-tronco que podem influenciar na progressão da neoplasia. Essas células são denominadas de CTT e expressam alta capacidade proliferativa, potencial de autorrenovação e diferenciação, invasão tecidual e resistência a terapias antineoplásicas. Essas características merecem atenção especiais, pois são responsáveis por favorecer o desenvolvimento e evolução de diversas neoplasias malignas humanas (42,43).

A transformação maligna de células-tronco normais, células tumorais pluripotentes induzidas e a desdiferenciação de células tumorais maduras a partir da transformação epitélio-mesênquima, são as três hipóteses que explicam a origem das CTT (44).

As CTTs já foram encontradas numa variedade de tumores malignos, incluindo cânceres de cabeça e pescoço, cérebro, mama, ovário e próstata. Também foi evidenciado que o tratamento com drogas ou radiação das células tumorais pode enriquecer e manter uma subpopulação de CTT *in vitro* e *in vivo*, propondo um compromisso dessas células na regeneração tumoral (43,45). Além disso, as CTTs podem ser localizadas em uma neoplasia por biomarcadores específicos de proteínas, de acordo com o tipo e com a localização, com o objetivo de ajudar o estadiamento e o prognóstico. Através dos métodos de imunolocalização, o padrão de expressão do biomarcador pode ser avaliado (43).

2.2.2 Marcadores de CTT

Atualmente, não há um marcador específico capaz de distinguir as células com fenótipo tronco tumoral das demais, no entanto, diversos marcadores vêm sendo correlacionados com o processo de carcinogênese e com populações de CTT em diferentes neoplasias (46,47) revisão sistemática realizada por Curtarelli et al. demonstrou que o biomarcador mais comumente utilizado na seleção de CTT em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foi o CD44. Outros marcadores como SOX2, OCT4, NESTIN, NANOG, BMI1, ALDH1, CD133, CD166, ABCB5, AGR2 E TAZ também foram citados nos estudos avaliados (43).

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana que desempenha diversas funções fisiológicas, e que vem se destacando na literatura pelo fato da sua expressão estar associada a um maior potencial de iniciação e progressão tumoral (48,49). Além de ser considerado um biomarcador prognóstico e um alvo terapêutico em diversas neoplasias, incluindo os cânceres de cabeça e pescoço (49,50), o CD44 é também um dos marcadores de CTT mais bem descritos. O CD44 é correlacionado principalmente com a autorrenovação e diferenciação das CTTs, e nesse sentido, populações de células CD44-positivas em cânceres de mama, gástricos e de cabeça e pescoço demonstram um maior potencial tumorigênico *in vitro* e *in vivo* (41,51,52).

A expressão do marcador CD133 também vem sendo amplamente estudada em neoplasias de cabeça e pescoço, com destaque para as neoplasias de glândulas salivares (53). Em carcinomas epidermóides orais, Zhang et al. demonstraram que as células CD133+ possuem maior clonogenicidade, capacidade de invasão e aumento da tumorigenicidade *in vitro* e *in vivo* (54). Além disso, o seu potencial como biomarcador prognóstico nessas lesões também foi relatado (55).

Os fatores de transcrição SOX2, OCT4 e NANOG são essenciais para a autorrenovação, diferenciação e pluripotência das células-tronco, em especial as embrionárias (56). Eles também atuam na transição epitélio-mesênquima e nos processos de iniciação, invasão e metástase tumoral (47,57). Esses fatores são considerados importantes biomarcadores de CTT e a sua expressão está associada a um pior prognóstico, assim como a resistência a quimioterapias em neoplasias orais, como o carcinoma epidermoide oral (57-60).

Outro marcador importante de CTT é o ALDH1, uma família de aldeído desidrogenase humana responsável pela oxidação do retinol e do ácido retinoico. O ALDH1 atua também na proliferação, autorrenovação e diferenciação de células-tronco presentes nos tecidos e de

células-tronco com fenótipo tumoral. Além disso, ele pode ser utilizado como um marcador preditivo para metástases (61,62), e a sua expressão é correlacionada com piores prognósticos em tumores sólidos (63,64). Atualmente, populações ALDH-positivas/CD44-positivas vem sendo estudadas visando o isolamento das CTT, uma vez que essa combinação parece selecionar células com maiores propriedades tronco tumorais (65). Abordaremos o antígeno ALDH1 com mais profundidade abaixo.

Atualmente há um maior foco nos estudos das CTT em carcinomas epidermóides orais e de cabeça e pescoço, no entanto, é importante ressaltar que a busca por marcadores de CTT em outras lesões que abrangem a cavidade oral, como em desordens potencialmente malignas (66,67), neoplasias de glândulas salivares (15,68,69), doenças dermatológicas orais (70-72), sarcomas orais de tecidos moles (73) e lesões odontogênicas (74-76) vem ganhando notoriedade.

Em lesões odontogênicas, foco desse trabalho, poucos estudos foram realizados. Dois recentes estudos avaliaram tanto imunoexpressão de marcadores de CTT no estroma quanto no componente epitelial de cistos e tumores odontogênicos benignos. Chacham et al. investigaram a imunoexpressão de NANOG, SOX2 e OCT4 no estroma das lesões odontogênicas. Eles observaram que cistos e tumores odontogênicos expressaram NANOG e SOX2, enquanto para o OCT4, poucas células positivas foram observadas apenas no tumor odontogênico queratocístico. Além disso, a imunoexpressão de SOX2 foi estatisticamente significante menor em todos os tipos de cistos em comparação aos tumores, o que indica o possível papel do SOX2 na distinção entre cistos e tumores odontogênicos (75).

O estudo de Monroy et al. (2018) propôs avaliar a presença de células-tronco no componente epitelial de tumores odontogênicos queratocísticos, ameloblastomas e tumores odontogênicos adenomatoides por meio da imunoexpressão de CD44 e OCT-4. Eles observaram células positivas par o CD44 em todos os casos, com uma maior expressão nos tumores odontogênicos queratocísticos, enquanto para o OCT4, a imunomarcção foi similar nas três lesões estudadas (74).

Desse modo, estudos vem relacionando as CTT com a capacidade de iniciação e desenvolvimento de diversas neoplasias, e a expressão aumentada dos diferentes biomarcadores nos indica um possível papel das células com fenótipo tumoral no comportamento biológico dessas lesões (7,77). No entanto, pouco se sabe sobre a contribuição das CTT nos cistos e tumores odontogênicos.

2.2.3 Proteína aldeído desidrogenase 1 (ALDH1)

Dos vários marcadores disponíveis na literatura, vamos focar esta abordagem no ALDH1, escopo do presente trabalho.

Aldeído desidrogenase (ALDH) é um grupo de enzimas que catalisam a oxidação dos aldeídos de fontes endógenas ou exógenas. Esse grupo é formado por 11 famílias e 4 subfamílias de enzimas codificadas por diferentes genes (16,78). Dentro da superfamília da ALDH, está a ALDH1, que significa aldeído desidrogenase isoforma 1 e tem localização celular citoplasmática e é ubiquamente distribuída em órgãos como o cérebro, pâncreas, rins, olhos, fígado, pulmão, mama, ovário, testículos, próstata, músculo esquelético e outros. A ALDH1 participa da via de sinalização do ácido retinoico e já se sabe que alterações nessa via têm o potencial de favorecer a expressão de genes que estimulam não apenas a proliferação celular como também a sobrevivência. Essas características fazem com que o ALDH1 seja relacionado às células-tronco, tanto as normais quanto as CTTs e em diversos tecidos (16,79,80).

A presença da proteína nas células que compõem neoplasias já foi relacionada com recorrência e metástase em diferentes neoplasias malignas, como o carcinoma mamário (16,81) e neoplasias de anexos cutâneos (82). Portanto, esse marcador tem recebido atenção como um possível marcador de prognóstico nesses tipos histológicos. Há também demonstrações de que a presença dessa enzima pode diminuir a eficácia de drogas usadas nas terapias antineoplásicas (79-82).

Já existem estudos sobre ALDH1 em neoplasias e lesões potencialmente malignas de boca (65-67), mas, até o momento, não há dados sobre a expressão desse marcador de CTT em tecidos e lesões odontogênicas.

2.3 Proteína Ki67

O Ki67 é uma proteína nuclear que está envolvida em todos os estágios ativos do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M), mas não está presente nos núcleos das células na fase G0 de repouso. O nível de expressão aumenta na fase G1 para a mitose e, em seguida, diminui ou desaparece logo após a mitose. Tais características o tornam um excelente marcador para

determinar a chamada fração de crescimento e status de proliferação de uma determinada população (83-89).

Esse antígeno está localizado principalmente no córtex nucleolar durante a interfase e, assim, é recrutado para condensar cromossomos durante a mitose. O gene dessa proteína está localizado no cromossomo 10q25-ter e codifica, respectivamente, duas isoformas Ki67 de 345 e 395 kDa (83,84).

Clinicamente, a expressão de Ki67 está correlacionada ao estágio clínico, metástase e prognóstico de neoplasias, especialmente, o câncer (83-85). A expressão aumentada desse antígeno é particularmente elevada em tecidos cancerígenos pouco diferenciados. Vários estudos indicam que a estratégia de inibir o Ki67 é promissora para a terapia do câncer renal, por exemplo. Sendo assim, um biomarcador atraente não apenas para o diagnóstico e prognóstico de tumores sólidos, como também na terapêutica (83).

O padrão mais comum para avaliar a expressão de Ki67 de uma lesão é calcular a porcentagem de coloração nuclear positiva com um anticorpo anti-Ki67, que é descrito como o índice de marcação Ki67. A expressão de Ki67 tem sido usada no diagnóstico de inúmeros tumores humanos distintos (84,85).

Dwivedi et al., avaliaram a expressão nuclear de Ki67, contada de acordo com as camadas basal, e suprabasal, na displasia epitelial. Assim, os resultados do estudo mostraram que a expressão de Ki67 na camada suprabasal aumentou de acordo com a gravidade da displasia epitelial. Concluindo que o uso do marcador proliferativo Ki67 pode ser usado na avaliação da gravidade da displasia epitelial, assim como, a superexpressão na camada suprabasal (86). Outros estudos também revelaram que a proliferação celular está altamente correlacionada com a agressividade entre as lesões odontogênicas (89).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica do marcador de células-tronco tumorais ALDH1 em lesões odontogênicas de diferentes naturezas: cisto dentígero, tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma. Além disso, nos propusemos, também, a avaliar o índice de proliferação dessas lesões por meio da imunomarcção por Ki67.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Antes do seu início, o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob protocolo CEP-FOUSP 4.568.638 (Anexo A).

4.2 Desenho do estudo e amostra

Esta pesquisa consistiu em um estudo descritivo e retrospectivo, de corte transversal, em uma série de casos de lesões odontogênicas. A partir dos arquivos que pertencem ao Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, foram levantados casos diagnosticados como ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico e cisto dentígero. A seleção da amostra foi feita de forma intencional e não probabilística compreendendo um total de 43 casos conforme segue:

- 13 casos de cisto dentígero;
- 13 casos de tumor odontogênico queratocístico;
- 17 casos de ameloblastoma, todos do tipo clínico-radiográfico sólido ou convencional.

A partir da seleção de casos pelo diagnóstico final, foram recuperados nos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica as lâminas histológicas para confirmação diagnóstica e os blocos de parafina para realizar o estudo imuno-histoquímico.

4.3 Estudo epidemiológico

Para caracterização demográfica dos casos da amostra foram coletados, a partir das fichas de encaminhamento de exame, os dados clínicos: sexo, idade, cor da pele e localização da lesão.

4.4 Estudo morfológico

Para a realização do estudo morfológico foram utilizadas lâminas com cortes de 5 µm de espessura do material incluído em parafina, corados em hematoxilina e eosina que posteriormente foram examinados à microscopia de luz. Os casos selecionados apresentavam características típicas das lesões em estudo. Os critérios foram embasados naqueles propostos pela Organização Mundial da Saúde (90) e pela maior parte dos autores na área. A seguir, uma breve descrição dos aspectos considerados para o diagnóstico de cada uma das três lesões deste estudo.

Os casos de cisto dentígero selecionados exibiam cápsula de tecido conjuntivo com quantidade variável de fibras colágenas e podendo conter infiltrado inflamatório escasso ou moderado e, preferencialmente localizado. Casos exibindo intenso infiltrado inflamatório foram descartados. A cápsula conjuntiva não queratinizada poderia exibir, ainda, zonas hemorrágicas e ilhas e cordões de epitélio odontogênico. O limitante epitelial que caracteriza o cisto é do tipo estratificado e pavimentoso, podendo exibir áreas cuboidais. Esse epitélio é de poucas camadas e a interface com o tecido conjuntivo da cápsula devia ser predominantemente plana.

Os casos de tumor odontogênico queratocístico selecionados eram caracterizados por cavidade única ou múltiplas cavidades revestidas por epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado de espessura fina ou intermediária, exibindo camada basal com núcleos hipercromáticos e em paliçada. A camada córnea era corrugada e, por vezes, lâminas de queratina estavam presentes no interior da cavidade. A cápsula cística de sustentação era composta por tecido conjuntivo denso ou frouxo mas, caracteristicamente fino. A interface epitélio/conjuntivo era plana na maior parte do fragmento.

Os casos de ameloblastoma selecionados para este estudo deveriam ter como característica histopatológica a proliferação de ilhas e cordões de células epiteliais sendo que

na periferia destas estruturas as células apresentavam-se colunares e dispostas em paliçada, exibindo polarização invertida do seu núcleo, enquanto a região central das ilhas exibia células de formato estrelário dispostas mais frouxamente. Degeneração cística do centro das ilhas neoplásicas e metaplasia escamosa também poderia estar presente nos casos selecionados. O estroma era de tecido conjuntivo com graus variados de deposição colágena e, por vezes, bastante celularizado.

4.5 Estudo imuno-histoquímico

Para cada caso selecionado foi realizada a reação de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-ALDH1 (clone 44/ALDHQ1, BD Transduction Laboratories, San Jose, Califórnia, EUA) e anti-Ki67 (clone MIB-1, Dako DAKO, Glostrup, Dinamarca).

A partir dos blocos de parafina foram feitos novos cortes histológicos de 3 µm de espessura que foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma St. Louis, MO, USA), para o aumento da adesividade dos cortes.

A reação teve início com a desparafinização dos cortes em dois banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos e o segundo por 15 minutos, ambos em temperatura ambiente. Seguiu-se a reidratação dos cortes, por meio de banhos, consecutivos de 3 minutos cada, em cadeia descendente de etanóis (de absoluto a 85%), passando imediatamente para a remoção do pigmento formólico (de cor castanha) pela incubação em hidróxido de amônio a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos.

As lâminas foram então lavadas com água destilada por 5 minutos e após, seguiram para os tratamentos de recuperação dos sítios antigênicos, que ocorreu por imersão em banho aquecido a 95 °C por 30 minutos. Para o anticorpo anti-ALDH1 o tratamento utilizou solução de ácido cítrico 10 mM, pH 6,0 e para o anticorpo anti-Ki67 a solução utilizada foi o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, pH 8,0. Após o final desse tratamento, os cortes foram novamente lavados em água destilada, e seguiram para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, em solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio a 6 % e metanol, pela incubação em dois banhos, de 15 minutos cada, sem lavagens entre eles. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes, foram imersos em solução salina de Tris (TBS) (Tris 50 mM, NaCl

150 mM), pH 7,6, solução tampão da reação, em três banhos de cinco minutos cada. Todas as etapas na sequência foram precedidas por lavagens em TBS pH 7,6.

A etapa seguinte foi a incubação do anticorpo primário, diluído em TBS acrescido de albumina bovina sérica e azida sódica nas diluições de 1:300 para o ALDH1 e 1:75 para o Ki67. Ambos os anticorpos primários foram incubados por um período de 15 horas a 4 °C em câmara úmida. Procedeu-se, então, à incubação do sistema de amplificação, tendo sido utilizado o método do polímero marcado, em passo único, por meio do kit Envision (DAKO, Carpinteria, CA, USA). A incubação foi de 30 minutos e ocorreu em temperatura ambiente. Após esta etapa, o cromógeno selecionado para a revelação da reação foi a diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468), de cor castanha, que foi incubado por 10 minutos, também em temperatura ambiente. Após a lavagem em Tris e em água destilada, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer. Em seguida, após nova lavagem com água destilada, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanol, diafanizados em xilol, montados em lâminulas de vidro e examinados em microscópio de luz.

Como controle positivo das reações, foram utilizados cortes de carcinoma epidermoide oral sabidamente positivos para os dois anticorpos. O controle negativo da reação se deu por incubação com supressão do anticorpo primário.

4.6 Análise dos resultados de imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímicas foram avaliadas em microscopia de luz, de forma qualitativa, para ambos os anticorpos, quantitativa para o Ki67 e semiquantitativa para o ALDH1.

Para avaliação qualitativa foi observado os padrões de marcação celular, nos sítios de positividade em cada lesão. Para avaliação quantitativa foram contados o total de células positivas em três campos microscópicos nas regiões de maior expressão (hotspots) em um aumento de 400x. Para isso, foram obtidas imagens digitais com auxílio de microscópio de luz (Axio Imager A2, Zeiss, Oberkochen, Germany) com uma câmera digital acoplada (Axio Cam HRc-Zeiss®) e software de aquisição de imagens Axio Vision (Zeiss). As células positivas foram contadas com o auxílio do software ImageJ (ImageJ para Windows, versão 1.6.0., 64 bits Java). A seguir, foi feita uma média aritmética para cada um dos casos. Para o anticorpo Ki67 foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada do núcleo.

Para o anticorpo ALDH1 foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no citoplasma ou núcleo e citoplasma, independente da intensidade de marcação. A análise, realizada em microscópio de luz, foi feita de maneira semiquantitativa considerando as áreas epiteliais de cada lesão odontogênica: escore (-): ausência de células positivas; escore (+): menos de 10% de células positivas; escore (++) : entre 10 e 50% de células positivas e escore (+++): mais de 50% de células positivas.

4.7 Análise estatística

Os dados clínicos relacionados a idade, sexo e sítio de localização foram descritos através de suas respectivas frequências relativas e absolutas. A idade foi apresentada na forma de média.

Os resultados obtidos nas avaliações microscópicas para os diferentes marcadores foram analisados em dados absolutos e de frequência (%). Os resultados numéricos foram tabulados no programa Microsoft®Excel® para avaliação quantitativa. Todos os dados foram avaliados quanto à aderência a distribuição normal, pelo teste de Lilliefors. Para análise de variância foi utilizado o teste o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn, já que os dados foram não-paramétricos. Os dados de escore foram analisados utilizado o teste qui-quadrado (χ^2) de Pearson para dados categóricos. Os níveis de significância foram considerados em 5% ($p \leq 0.05$). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa © GraphPad Prism 8.0 (San Diego, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A amostra deste estudo consistiu em 13 casos de cisto dentígero, 13 casos de tumor odontogênico queratocístico e 17 casos de ameloblastoma, totalizando 43 espécimes analisados. Nos casos diagnosticados como cisto dentígero, 61,54% acometeram o sexo feminino e 38,46% o sexo masculino. Com relação à cor da pele, 84,62% dos pacientes eram brancos e 15,38% negros, com uma média de idade no momento do diagnóstico de $30,4 \pm 23,01$ (média $\pm$ desvio padrão), variando entre 6 e 83 anos. No que diz respeito à localização, 76,92% dos casos de cisto dentígero estavam localizados na mandíbula e 23,08% na maxila.

No grupo de casos de tumor odontogênico queratocístico, 69,23% eram do sexo masculino e 30,77% do sexo feminino, com uma média de idade de $33,9 \pm 18,3$ (média $\pm$ desvio padrão) no momento do diagnóstico, variando entre 3 e 67 anos. Além disso, 76,92% dos pacientes eram brancos, 7,69% negros e em 15,38% dos casos (n=2) a cor da pele não foi informada. As lesões estavam localizadas na mandíbula em 69,23% dos casos, na maxila em 15,38% e, em outros 15,38% não havia informação sobre a localização da lesão nas fichas de encaminhamento de exame. Em nenhum dos casos havia informação sobre síndrome.

Já para casos diagnosticados como ameloblastoma, 58,82% acometeram o sexo feminino e 41,18% o sexo masculino. Desses pacientes, 52,94% eram brancos, 35,29% negros e em 11,76% (n=2) dos casos a cor da pele não foi informada. A média de idade no momento do diagnóstico foi de $28,8 \pm 15,6$ (média $\pm$ desvio padrão), variando entre 15 e 68 anos. Em relação a localização da lesão, 88,24% dos casos foram localizados na mandíbula. Em 11,76% dos casos a localização não foi informada.

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para todos os casos do estudo estão tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características clínicas e demográficas dos casos deste estudo

		Cisto dentígero (n = 13)	Tumor odontogênico queratocístico (n = 13)	Ameloblastoma (n = 17)
Sexo - n (%)	Masculino	5 (38.46%)	9 (69.23%)	7 (41.18%)
	Feminino	8 (61.54%)	4 (30.77%)	10 (58.82%)
Cor da pele - n (%)	Branca	11 (84.62%)	10 (76.92%)	9 (52.94%)
	Negra	2 (15.38%)	1 (7.69%)	6 (35.29%)
	Não Informado	0 (0%)	2 (15.38%)	2 (11.76%)
Idade - n (%)	0-10 anos	1 (7.69%)	1 (7.69%)	0 (0%)
	11-20 anos	2 (15.38%)	2 (15.38%)	6 (29.41%)
	21-30 anos	3 (23.08%)	3 (23.08%)	5 (23.53%)
	31-40 anos	1 (7.69%)	1 (7.69%)	0 (0%)
	41-50 anos	1 (7.69%)	4 (23.08%)	3 (17.65%)
	51-60 anos	0 (0%)	1 (7.69%)	0 (0%)
	61-70 anos	0 (0%)	1 (7.69%)	1 (5.88%)
	71-80 anos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	81-90 anos	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
	>90 anos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Não Informado	4 (30.77%)	0 (0%)	2 (11.76%)
Localização anatômica - n (%)	Mandíbula	10 (76.92%)	9 (69.23%)	15 (88.24%)
	Maxila	3 (23.08%)	2 (15.38%)	0 (0%)
	Não Informado	0 (0%)	2 (15.38%)	2 (11.76%)

Fonte: O autor, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP.

5.2 Imuno-histoquímica para ALDH1

A expressão da proteína ALDH1 no componente epitelial das lesões odontogênicas estudadas nesta pesquisa foi principalmente citoplasmática, com alguns casos apresentando imunomarcção em núcleo. A imunoexpressão desse marcador foi avaliada em áreas significativas por três avaliadores independentes, cegos para toda as demais informações dos casos. Pode-se observar variações na intensidade de marcação das células entre as lesões estudadas.

Nos cistos dentígeros a imunoexpressão do ALDH1 foi evidenciada em 12 dos 13 casos do estudo, tendo sido a expressão apenas citoplasmática. As células positivas estavam presentes em todas as camadas do epitélio em 8 casos. Nos outros 4 casos que se mostraram positivos, a imunomarcção estava presente nas camadas suprabasais, mas não era vista na camada basal do epitélio que compunha a lesão. Com relação aos escores recebidos na avaliação semiquantitativa: 1 caso foi escore (-) (7,7%), 3 casos receberam escore (+) (23,1%), 6 casos foram escore (++) (46,1%) e 3 casos escore (+++) (23,1%).

A imunomarcagem de ALDH1 foi observada em 100% dos casos (13 casos) de tumor odontogênico queratocístico. A distribuição da coloração nas diferentes camadas do epitélio que compõe esta lesão, variou entre os casos do estudo. O padrão de marcação predominante para os tumores odontogênicos queratocístico foi todas as camadas suprabasais positivas e eventuais células positivas na basal, padrão esse visto em 9/13 casos (69,2%). Outros 2 casos (15,4%) mostraram positividade de todas as camadas suprabasal e camada basal negativa e os 2 casos restantes (15,4%) mostram positividade em todas as células de todas as camadas. Quanto à avaliação semiquantitativa, 5 casos (38,5%) receberam escore (++) e os outros 8 casos (61,5%) receberam escore (+++).

A imunoexpressão do ALDH1 foi irregular nos casos de ameloblastoma deste estudo. Um total de 7 casos (41,2%) foram positivos e 10 foram totalmente negativos para o marcador. A coloração foi citoplasmática e na maioria das vezes fraca nas regiões centrais das ilhas com células epiteliais, e por vezes, nas células colunares periféricas. Destaca-se que todos os casos imunopositivos apresentavam extensas áreas negativas. Na avaliação semiquantitativa os casos ficaram divididos nos escores como segue: 10 casos receberam escore (-) (58,8%), 4 casos receberam escore (+) (23,5%), 3 casos receberam escore (++) (17,6%) e nenhum caso recebeu escore (+++).

Todos da imuno-histoquímica para ALDH1 para cada um dos casos estão no quadro 5.1. A tabela 5.2 sumariza os resultados da avaliação semiquantitativa para cada grupo e apresenta os resultados da comparação estatística. Houve diferença significativa na expressão do marcador ALDH1 entre os grupos cisto dentífero x tumor odontogênico queratocístico ($P=0,0108$) e tumor odontogênico queratocístico x ameloblastoma ($P<0,0001$).

Quadro 5.1 – Médias dos resultados para Ki67, escores para ADLH1 e padrão de marcação para ALDH1

	CASO	Ki67 ^s	ALDH1	PADRÃO DE MARCACÃO ALDH1
CISTO DENTÍGERO	1	1	++	todas as camadas
	2	4	+	todas as camadas
	3	12	+	camadas suprabasais
	4	12	+	camadas suprabasais
	5	0	++	todas as camadas
	6	8	+++	todas as camadas
	7	0	+++	todas as camadas
	8	3	-	-
	9	17	++	todas as camadas
	10	2	+++	todas as camadas
	11	0	++	camadas suprabasais
	12	37	++	camadas suprabasais
	13	58	++	todas as camadas
TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	14	25	++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	15	153	+++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	16	69	+++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	17	8	++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	18	71	+++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	19	86	+++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	20	73	+++	todas as camadas
	21	87	+++	todas as camadas
	22	30	++	camadas suprabasais
	23	65	+++	camadas suprabasais
	24	23	++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	25	25	+++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
	26	57	++	camadas suprabasais e eventuais células na basal
AMELOBLASTOMA	27	9	++	células isoladas com metaplasia escamosa
	28	4	+	células isoladas
	29	5	-	-
	30	3	-	-
	31	0	+	células isoladas no centro das ilhotas
	32	10	-	-
	33	9	-	-
	34	4	-	-
	35	1	-	-
	36	49	++	células isoladas no centro das ilhotas
	37	4	-	-
	38	11	+	células isoladas no centro das ilhotas
	39	41	+	células isoladas
	40	0	-	-
	41	11	-	-
	42	16	-	-
	43	18	++	células isoladas com metaplasia escamosa

^aMédia para cada caso do estudo; (-) negativo, (+) menos de 10% das células positivas, (++) entre 10 e 50% das células positivas, (+++) mais de 50% das células positivas.

Fonte: O autor.

Tabela 5.2 – Resultados da avaliação semiquantitativa do ALDH1 para cada uma das lesões do estudo

Escore		Cisto dentífero (n=13)	Tumor odontogênico queratocístico (n=13)	Ameloblastoma (n=17)
Negativo	-	7,67% (n=1)	0 % (n=0)	58,8 % (n=10)
< 10%	+	23,1 % (n=3)	0 % (n=0)	23,5 % (n=4)
10 - 50%	++	46,1 % (n=6)	38,5 % (n=5)	17,6 % (n=3)
>50%	+++	23,1 % (n=3)	61,5 % (n=8)	0 % (n=0)

Teste qui-quadrado de Pearson					
Cisto dentífero	P= 0,1328	Cisto dentífero	P= 0,0108 *	TOQ	P <0,0001 *
X		X		X	
TOQ		Ameloblastoma		Ameloblastoma	

n= número de casos; (-) negativo, (+) menos de 10% das células positivas, (++) entre 10 e 50% das células positivas, (+++) mais de 50% das células positivas; TOQ: tumor odontogênico queratocístico; *Estatisticamente significante para $P < 0,05$.

Fonte: O autor.

A figura 5.1 mostra fotomicrografias de cada uma das lesões deste estudo exemplificando os principais padrões de marcação encontrados para o ALDH1.

Figura 5.1 – Fotomicrografias representativas mostrando o padrão de marcação para o ALDH1. A: cisto dentífero; B: tumor odontogênico queratocístico, C: ameloblastoma. Aumento de 400x

Fonte: O autor.

5.3 Imuno-histoquímica para Ki67

Dos 43 casos deste estudo apenas 5 foram totalmente negativos para o marcador Ki67, sendo 3 casos de cisto dentígero e 2 de ameloblastoma. Todos os casos de tumor odontogênico queratocístico apresentaram alguma proporção de células positivas para o marcador. Este é um marcador nuclear. A análise das médias das contagens de células positivas em 3 campos de 400x estão apresentadas no quadro 5.1.

Dez dos casos de cisto dentígero (76,9%) foram positivos para Ki67 as células positivas estavam distribuídas principalmente na camada basal. O gráfico 5.1 mostra a comparação das médias das contagens de células positivas para o Ki67 nos casos de cisto dentígero, além do desvio padrão. A figura 5.2 apresenta fotomicrografias de cistos dentígeros exibindo células positivas para o Ki67.

Gráfico 5.1 – Mediana, maior e menor valor das contagens de células positivas para Ki67 nos casos de cisto dentígero

Fonte: O autor

Figura 5.2 – Fotomicrografias representativas que exemplificam a imunoeexpressão de Ki67 em casos de cisto dentígero (400x)

Fonte: O autor

O padrão de marcação para o tumor odontogênico queratocístico mostrou células positivas predominantemente nas camadas suprabasais do epitélio que compunha a lesão (Figura 5.3). Núcleos positivos na camada basal estavam ocasionalmente presentes. O gráfico 5.2 mostra a comparação das maior e menor valor e mediana das contagens de células positivas para o Ki67 nos casos de tumor odontogênico queratocístico. A figura 5.3 apresenta fotomicrografias de tumor odontogênico queratocístico exibindo células positivas para o Ki67.

Gráfico 5.2 – Mediana, maior e menor valor das contagens de células positivas para Ki67 nos casos de tumor odontogênico queratocístico

Fonte: O autor.

Figura 5.3 – Fotomicrografias representativas que exemplificam a imunoexpressão de Ki67 em casos de tumor odontogênico queratocístico (400x)

Fonte: O autor

Nos casos de ameloblastoma, um total de 15 (88,2%) mostrou positividade para o marcador. Os núcleos positivos eram predominantes nas camadas de células colunares periféricas das ilhas, e apenas em alguns casos foram observadas células coradas nas áreas centrais das ilhas epiteliais. A maioria dos cortes de tecido que continha células positivas apresentavam marcação nas células periféricas, talvez porque são conhecidas por refletirem

na atividade de crescimento do ameloblastoma. O gráfico 5.3 mostra a comparação das Mediana, maior e menor valor das contagens de células positivas para o Ki67 nos casos de ameloblastoma e a figura 5.4 apresenta fotomicrografias de ameloblastomas com células positivas para o Ki67.

Gráfico 5.3 – Mediana, maior e menor valor das contagens de células positivas para

Casos de ameloblastoma

*Diferença estatisticamente significativa ($P=0,0385$) e $**P=0,0385$.

Fonte: O autor.

Figura 5.4 – Fotomicrografias que exemplificam a imunoexpressão de Ki67 em casos de ameloblastoma (400x)

Fonte: O autor.

O gráfico 5.4 mostra a comparação entre as médias de células positivas para Ki67 nas três lesões deste estudo e revela que houve diferença estatística entre essas médias na comparação do tumor odontogênico queratocístico com o cisto dentígero ($P=0,0003$) e com o ameloblastoma ($P=0,0006$).

Gráfico 5.4 – Comparação entre as médias. Mediana, maior e menor valor de células positivas para Ki67 nas três lesões

*Estatisticamente significativa ($P=0,0003$) e ** $P=0,0006$. TOQ: tumor odontogênico queratocístico.

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o marcador de CTT ALDH1 foi utilizado com o intuito de detectar a presença dessas células em diferentes lesões de origem odontogênica. Nosso estudo foi composto por uma série de 43 casos de lesões odontogênicas, sendo 13 casos de cisto dentígero, 13 casos de tumor odontogênico queratocístico e 17 casos ameloblastoma. Pouco ainda se sabe sobre a presença de células-tronco tumorais nessas lesões, e apesar de alguns trabalhos explorarem a presença de células-tronco, não há ainda estudos utilizando o ALDH1 como marcador. Ainda, utilizamos na amostra o marcador de proliferação Ki67 para avaliar o índice de proliferação dessas lesões.

No geral, a expressão do ALDH1 se mostrou variável nas diferentes lesões, sendo positivo para a maioria dos casos dentro dos grupos estudados. Não foi possível estabelecer uma associação entre a marcação o ALDH1 e a agressividade das lesões estudadas. Nos grupos de estudo, o tumor odontogênico queratocístico e o cisto dentígero demonstraram forte expressão para o ALDH1, enquanto a maioria dos casos de ameloblastoma mostraram mínima ou nenhuma expressão deste marcador. Na avaliação da capacidade proliferativa das lesões, avaliadas pela expressão de Ki67, apesar da presença na maioria das lesões dentro dos grupos, notou-se variabilidade da expressão de marcação entre as diferentes lesões, além da expressão variável e pouco homogênea entre os casos estudados. O Ki67 foi expresso em quase todos os casos, exceto em 3 casos de cisto dentígero e 2 casos de ameloblastoma.

Neste estudo, observamos no cisto dentígero uma imunoexpressão citoplasmática do ALDH1, o que pode indicar que o epitélio do cisto abriga muitas células com características de células-tronco. Estudos anteriores mostraram que o cisto dentígero expressou consistentemente SOX2 positivo de forma semelhante as lesões ameloblásticas, incluindo o carcinoma ameloblástico, indicando o seu papel na manutenção da renovação fisiológica da mucosa (91). Assim, observou-se a expressão do SOX2 fortemente positivo na camada basal do epitélio do cisto dentígero e nesse contexto, a coloração desse anticorpo não foi indicativo de células-troncos neoplásicas.

O cisto dentígero se desenvolve a partir dos remanescentes epiteliais da odontogênese, que são estimulados a proliferar. Esses epitélios são imaturos e pouco diferenciados, e contém células-tronco. De acordo com alguns autores, as células do epitélio do órgão do esmalte e do epitélio juncional da gengiva demonstram o potencial de células-troncos epiteliais e por sua vez podem atuar na formação de cistos odontogênicos (92,93).

Dada a natureza não neoplásica do cisto dentígero, a marcação do ALDH1 pode indicar a presença de células-tronco indiferenciadas, com de manutenção da homeostase tecidual e com e potencial de ajudar na formação do cisto.

Para o tumor odontogênico queratocístico o ALDH1 se apresentou significativamente expresso nas diferentes camadas do revestimento epitelial. Esta é uma lesão odontogênica conhecida por sua agressividade e taxa de recorrência após o tratamento (2-5,31,90). Em 2017, a OMS reclassificou o tumor queratocístico odontogênico de volta para a categoria dos cistos odontogênicos de desenvolvimento, porém ainda não há uma concordância na literatura quanto a real natureza desta lesão. (17). Quanto a proliferação, já foi visto que o tumor odontogênico queratocístico apresenta alta expressão para marcadores de proliferação celular, sendo essa expressão comparativamente mais elevadas do que outros cistos dos maxilares. (94,95). As células em proliferação são observadas em todas as camadas do revestimento epitelial e não se limita apenas a camada basal como no cisto dentígero e radicular (96-98).

No presente estudo, a expressão de imunomarcação do ALDH1 no tumor odontogênico queratocístico foi equivalentemente forte nas diferentes camadas do epitélio que compõe esta lesão e a imunopositividade variou entre as amostras. A principal localização do ALDH1 foi citoplasmática nas camadas de células suprabasais, e em alguns casos observamos a marcação nuclear em raras células na camada basal. Nos casos estudados, nove apresentaram positividade para ALDH1 nas células da camada suprabasal com eventuais células positivas na camada basal. Comparativamente, em um estudo que avaliou a presença de células-tronco no epitélio do tumor odontogênico queratocístico, viu-se que a expressão dos marcadores de CTT OCT4 e CD44 foi vista tanto nas células das camadas basais quanto nas células das camadas suprabasais, semelhante aos nossos resultados (74).

A camada basal do epitélio no tumor odontogênico queratocístico se apresenta microscopicamente com células colunares e com polaridade invertida que se assemelham aos pré-ameloblastos no órgão do esmalte em desenvolvimento, sugerindo que essas células possam, apresentar diferenciação ameloblástica (99-102). Essa característica pode indicar que a ausência ou pouca marcação do ALDH1 tenha relação com a diferenciação celular dessa camada que induz a perda do fenótipo que caracteriza as células-tronco.

O epitélio de revestimento da mucosa oral é do tipo pavimentoso estratificado, tendo como principais constituintes celulares do tecido os queratinócitos. Além dos queratinócitos, esses epitélios também contêm uma minoria de células, como melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e células inflamatórias transitórias (103). O epitélio da mucosa é organizado em estratos celulares, sendo geralmente na camada basal que ocorre a

proliferação celular para fornecer novas células que sofrem diferenciação à medida que se movem para os demais estratos (103,104). Esses epitélios são caracterizados pela rápida renovação celular, relacionado à presença e à dinâmica das células-tronco epiteliais, conferindo notável potencial regenerativo ao tecido. Essas células-tronco dos queratinócitos orais estão localizadas na camada de células basais (103-105).

Na camada basal dos epitélios, a célula-tronco que vai formar os queratinócitos inicia o processo por meio de divisão celular assimétrica, que resultará em uma outra célula-tronco, idêntica à célula-tronco inicial, e uma célula progenitora, também chamada de "célula transiente amplificadora", sendo essa dotada de grande potencial proliferativo. (106,107). Embora no epitélio essas células progenitoras estejam localizadas na camada basal, elas podem se estender para as regiões suprabasais da mucosa oral (105-107).

O epitélio de revestimento do tumor odontogênico queratocístico, histologicamente apresenta semelhanças estruturais ao epitélio de revestimento da mucosa oral, já sendo relacionada sua origem com a do epitélio primordial que forma a mucosa. O epitélio desta lesão odontogênica contém muitas células diferenciadas com alta taxa proliferativa, com formação de paraqueratina, característica essa não vista nos demais tumores odontogênicos de origem epitelial (102). Visto a semelhança estrutural entre o epitélio da mucosa e o epitélio do tumor odontogênico queratocístico, alta expressão do ALDH1 na camada de células suprabasais esteja relacionado com as células progenitoras, enquanto a positividade nuclear em algumas células esporádicas na camada basal corresponda às efetivamente às células-tronco, cujo fenótipo ainda não está totalmente esclarecido.

Em contraste com o tumor odontogênico queratocístico, nossos dados mostraram que no amelolastoma no ALDH1 é minimamente expresso em uma minoria dos casos. O padrão de marcação na maioria das vezes foi nas células isoladas no centro das ilhotas e nas células colunares periféricas. No ameloblastoma, diferentes estudos confirmaram a expressão de células-tronco em diferentes locais (74,75,108). Enquanto as células-tronco são sugeridas para estarem localizadas nas camadas periféricas (7), outro estudo demonstra a imunoexpressão de marcador de células-tronco p75NTR principalmente nas áreas das ilhas com células arranjadas frouxamente (109). Outros estudos também observaram os indicadores de células-tronco tanto nas células colunares periféricas quanto nas regiões que se assemelham ao retículo estrelado (74,75,109). Kumamoto et al. (110) evidenciaram que a imunoexpressão de telomerase em ameloblastoma foi positiva em todos os casos, sendo a expressão desse anticorpo detectada na maioria das células colunares periféricas, enquanto apenas algumas células esporádicas foram expressas nas áreas centrais das ilhas.

Segundo autores, o ameloblastoma tem um perfil de expressão gênica que reflete a diferenciação da lâmina dentária em direção aos estágios do desenvolvimento do dente (capuz/campânula), isso com base nos fatores de transição específicos do epitélio dentário (111). De acordo com esse contexto e juntamente com nossos achados, a expressão limitada do ALDH1 em ameloblastomas, pode estar relacionada com as características morfológicas e moleculares que se assemelham aos tecidos da odontogênese.

Devido às suas características histológicas e localizações mandibulares, acreditam-se que a maioria dos ameloblastomas derivam dos remanescentes epiteliais dentais (8). Alguns autores, já identificaram células-tronco e células progenitoras em diversos tecidos e órgãos epiteliais, incluindo nos dentes. Juuri et al. (8) mostraram que o marcador de célula-tronco SOX2 é altamente expresso tanto nos ameloblastomas quanto na lâmina dentária. Além disso, também foi detectado no epitélio em brotamento na região distal dos terceiros molares. Assim, acredita-se que o epitélio indiferenciado do ameloblastoma tem uma grande quantidade de células-tronco. Com isso, a marcação do ALDH1 pode refletir na diferenciação da lâmina dentária em direção ao estágio de capuz e campânula do desenvolvimento do dente. A imunomarcação escassa nas células isoladas no centro das ilhotas e nas células colunares periféricas pode indicar que essas células são células-tronco neoplásicas diferenciadas.

Nossos dados mostram que o ALDH1 é significativamente mais expresso no tumor odontogênico queratocístico, em comparação com o cisto dentígero e ameloblastoma. Esses achados são semelhantes ao que foi observado por Heikinheimo et al. (111) observaram que a expressão do marcador de CTT SOX2 é diferente entre o tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma porque em conjunto, o perfil de expressão do ameloblastoma expressa genes ligados a identidade do epitélio dentário, enquanto o tumor odontogênico queratocístico expressa aqueles mais em linhas com os queratinócitos em diferenciação. Monroy et al. (74), encontraram positividade para os marcadores de CTT (CD44 e OCT4) em todos os casos de tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma. A análise da expressão do OCT4 não relevou diferenças estatisticamente significativas entre as duas lesões. No entanto, a expressão do CD44 houve diferença significativa, demonstrando que o tumor odontogênico queratocístico apresentou maior imunoexpressão em relação ao ameloblastoma.

Baseado nesse contexto, Silva et al. (108) compararam a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de célula-tronco em espécimes de tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma. A expressão dos anticorpos foi mais intensa no tumor odontogênico queratocístico. Assim, sugeriram que a expressão fraca ou ausente dos marcadores de células-tronco em espécimes de ameloblastoma, pode implicar que este tumor

odontogênico em particular apresente outra via molecular responsável por conservar o seu comportamento neoplásico.

A expressão aberrante de marcadores de células-tronco tem sido observada em diversos tipos de neoplasias. Recentemente em uma análise comparativa viu-se uma expressão significativa tanto para SOX2, quanto para OCT4, em vários tipos de cistos e tumores odontogênicos (112). A maioria dos casos do tumor odontogênico queratocísticos expressaram fortemente para SOX2, principalmente nas células da camada suprabasal. Em contraste, a expressão deste anticorpo foi limitada apenas em células isoladas das ilhotas centrais do ameloblastoma, e quase todos os casos de cisto dentígero mostrou-se coloração positiva em grande parte do epitélio cístico que compõe esta lesão. Esses dados indicam similaridade com os achados do presente estudo.

Diante dos nossos dados, não conseguimos achar uma relação direta entre a marcação e o padrão biológico dessas lesões. Não há como dizer que a expressão do ALDH1 nessas lesões odontogênicas demonstre ser indicativo de agressividade. Tendo em vista que o cisto dentígero teve uma marcação similar ao tumor odontogênico queratocístico e maior do que o ameloblastoma. Porém, é interessante notar que nenhum estudo estudou o enfoque desses marcadores de células-tronco com a interação da biologia dessas células.

Quanto ao Ki67, os núcleos foram positivos significativamente maiores no revestimento epitelial do tumor odontogênico queratocístico do que no cisto dentígero e no ameloblastoma. No cisto dentígero, a maioria das células positivas estavam localizadas principalmente na camada de células basais. Todos os casos do tumor odontogênico queratocístico apresentaram núcleos positivos especialmente distribuídos na camada de células suprabasais com alguns núcleos Ki67 positivos na camada de células basais. Esses resultados indicam que o tumor odontogênico queratocístico tem uma atividade proliferativa intrínseca mais significativamente maior do que a do cisto dentígero.

Outros estudos são consistentes com esses achados, e mostraram que as camadas de células suprabasais no revestimento epitelial do tumor odontogênico queratocístico têm uma maior atividade proliferativa quando comparadas com a camada de células basais e quando comparadas com os outros revestimentos epiteliais de outros cistos odontogênicos (96-98). Esse fenômeno pode ocorrer devido aos diferentes padrões de proliferação e manutenção do tumor odontogênico queratocístico (113). Além disso, um processo único de proliferação e/ou de diferenciação celular no epitélio pode existir no tumor odontogênico queratocístico, onde as células basais parecem assumir algumas características de pré-ameloblastos (99,100).

A expressão para o Ki67 já foi analisada em lesões odontogênicas, e, assim como nos nossos achados o tumor odontogênico queratocístico apresentou marcação mais expressiva do que em relação ao cisto dentígero (94). No entanto, em discordância com nossos achados, Živković e colaboradores (114) relataram que a nível de expressão do marcador de proliferação Ki67 no tumor odontogênico queratocístico era menor do que no cisto dentígero, esse achado foi explicado por ter sido avaliado apenas na camada suprabasal. Em uma outra análise viu-se que, semelhante aos nossos achados, ao ser avaliado na camada basal e suprabasal o nível de proliferação celular foi utilizando Ki67 foi no tumor odontogênico queratocístico em comparação com outros cistos odontogênicos (95).

Nos casos de ameloblastoma, um achado interessante deste e de estudos anteriores (115-117) é que se observou que os núcleos positivos estavam predominantes nas camadas de células colunares periféricas, consideradas zonas de proliferação, e apenas alguns casos foram observados núcleos Ki67 positivos nas áreas de células centrais das ilhas epiteliais. Isso sugere que o crescimento dos ameloblastomas é produzido pela expansão periférica dos folículos e que esse padrão de proliferação possivelmente indica algum grau de atividade maturacional central, como também foi apontado por Sandra et al. (118). Curiosamente, em uma série de 14 casos de ameloblastomas, Florescu et al. (119) demonstraram uma diferença significativa na expressão do antígeno Ki67 nas células colunares periféricas quando comparadas as células centrais das ilhas.

Alguns estudos também compararam a expressão do Ki67 no tumor odontogênico queratocístico e no ameloblastoma, demonstraram um índice de proliferação significativamente maior no tumor odontogênico queratocístico (120-123), enquanto um estudo relatou o contrário, uma proliferação significativamente de maior índice no ameloblastoma (124). Estudos comparando o índice de proliferação entre cistos dentígeros e ameloblastoma têm gerado resultados conflitantes. Gadbail e colaboradores (124) encontraram um índice de marcação do Ki67 significativamente maior em ameloblastomas do que em cistos dentígeros. No entanto, em um outro estudo por de Vicente et al. (120) demonstraram que a expressão do antígeno Ki67 foi maior nos cistos dentígeros do que nos ameloblastomas (109). Resultados conflitantes podem refletir em diferenças nos marcadores e critérios utilizados para avaliação do índice de proliferação celular.

ALDH1 e Ki67 exibiram escores mais altos e correlações mais fortes em seus níveis de expressão em amostras do tumor odontogênico queratocístico do que as amostras de cisto dentígero e ameloblastoma no presente. No entanto, os resultados não refletem em uma semelhança nos níveis de expressão, padrão de marcação e correlação do ALDH1 e KI67 no

epitélio odontogênico das lesões odontogênicas estudadas. Acreditamos que a expressão de ambos os marcadores possa estar relacionada particularmente com as diferenças clínicas e comportamentos, como também na capacidade proliferativa e antiapoptótica do epitélio das lesões odontogênicas

Por fim, diante a carência de estudos, ainda há muito a ser explorado sobre o papel do ALDH1 e Ki67 na natureza biológica dos mais variados cistos e tumores odontogênicos.

7 CONCLUSÕES

As evidências encontradas no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- Observou-se a imunoexpressão do ALDH1 nas células epiteliais das três lesões estudadas, este achado sugere a presença de células com perfil de células-tronco nestas lesões odontogênicas epiteliais benignas.
- A imunoexpressão do ALDH1 no tumor odontogênico queratocístico apresentou características de marcação diferentes das outras lesões. Em alguns casos a imunopositividade foi nuclear em células esporádicas da camada basal, sugestivas de possíveis células-tronco com fenótipo tumoral.
- O marcador de células-tronco tumorais ALDH1 não indica agressividade entre as lesões odontogênicas estudadas, tendo em vista a similaridade na expressão entre o tumor odontogênico queratocístico e cisto dentígero e a mínima ou nenhuma expressão de imunopositividade nas amostras dos ameloblastomas.
- As altas expressões do KI67 no epitélio de revestimento do tumor odontogênico queratocístico estão de acordo com o seu comportamento clínico agressivo e a alta taxa de recorrência.
- Foi evidenciada diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão do Ki67 entre o tumor odontogênico queratocístico quando comparados ao cisto dentígero e ameloblastoma.
- A expressão do ALDH1 e do Ki67 no tumor odontogênico queratocístico pode ter relação com as características clínicas e histopatológicas específicas. Embora a expressão imuno-histoquímica de apenas dois marcadores seja insuficiente para comprovar que o tumor odontogênico queratocístico é um tumor cístico.

REFERÊNCIAS¹

1. Kwon HE, Jia S, Lan Y, Liu H, Jiang R. Activin and Bmp4 Signaling Converge on Wnt Activation during Odontogenesis. *J Dent Res*. 2017 Sep;96(10):1145-52. doi: 10.1177/0022034517713710.

2. Bilodeau EA, Collins BM. Odontogenic Cysts and Neoplasms. *Surg Pathol Clin*. 2017 Mar;10(1):177-222. doi: 10.1016/j.path.2016.10.006.

3. Izgi E, Mollaoglu N, Simsek MB. Prevalence of odontogenic cysts and tumors on turkish sample according to latest classification of world health organization: A 10-year retrospective study. *Niger J Clin Pract*. 2021 Mar;24(3):355-61. doi: 10.4103/njcp.njcp_175_20.

4. Speight PM, Takata T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Arch*. 2018 Mar;472(3):331-9. doi: 10.1007/s00428-017-2182-3.

5. Soluk-Tekkeşin M, Wright JM. The World Health Organization Classification of Odontogenic Lesions: A Summary of the Changes of the 2017 (4th) Edition. *Turk Patoloji Derg*. 2018;34(1). doi: 10.5146/tjpath.2017.01410.

6. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012 Jul;56(3):151-65. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001.

7. Harada H, Mitsuyasu T, Toyono T, Toyoshima K. Epithelial stem cells in teeth. *Odontology*. 2002 Sep;90(1):1-6. doi: 10.1007/s102660200000.

8. Juuri E, Isaksson S, Jussila M, Heikinheimo K, Thesleff I. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur J Oral Sci*. 2013 Dec;121(6):509-16. doi: 10.1111/eos.12095.

9. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-84. doi: 10.1146/annurev.med.58.062105.204854.

10. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012 Nov;12(11):767-75. doi: 10.1038/nrc3368.

11. Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol.* 2010 Apr;20(2):85-92. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.04.002.
12. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10946-51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
13. Pellacani D, Packer RJ, Frame FM, Oldridge EE, Berry PA, Labarthe MC, et al. Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol Cancer.* 2011 Jul 29;10:94. doi: 10.1186/1476-4598-10-94.
14. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016 Mar 8;7(10):11018-32. doi: 10.18632/oncotarget.6920.
15. Sedassari BT, Rodrigues MFSD, Conceição TS, Mariano FV, Alves VAF, Nunes FD, et al. Increased SOX2 expression in salivary gland carcinoma ex pleomorphic adenoma progression: an association with adverse outcome. *Virchows Arch.* 2017 Dec;471(6):775-784. doi: 10.1007/s00428-017-2220-1.
16. Zhou C, Sun B. The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: a meta-analysis. *Oral Oncol.* 2014 Dec;50(12):1144-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.08.018.
17. Mosqueda-Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Sep 1;13(9):E555-8.
18. da Silva LP, Serpa MS, Santana T, do Nascimento GJ, de Souza Andrade ES, Sobral AP. Clinicopathological and cell proliferation evaluation of ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors: a 10 year retrospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017 Feb;274(2):1089-95. doi: 10.1007/s00405-016-4348-z.
19. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
20. de Souza LB, Gordón-Núñez MA, Nonaka CF, de Medeiros MC, Torres TF, Emiliano GB. Odontogenic cysts: demographic profile in a Brazilian population over a 38-year period. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jul 1;15(4):e583-90.

21. Chrysomali E, Leventis M, Titsinides S, Kyriakopoulos V, Sklavounou A. Odontogenic tumors. *J Craniofac Surg*. 2013 Sep;24(5):1521-5. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182997aaf.
22. Koivisto T, Bowles WR, Rohrer M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):729-32. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.028.
23. de Medeiros WK, da Silva LP, Santos PP, Pinto LP, de Souza LB. Clinicopathological analysis of odontogenic tumors over 22 years period: Experience of a single center in northeastern Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Nov 1;23(6):e664-e71. doi: 10.4317/medoral.22618.
24. Ahire MS, Tupkari JV, Chettiankandy TJ, Thakur A, Agrawal RR. Odontogenic tumors: A 35-year retrospective study of 250 cases in an Indian (Maharashtra) teaching institute. *Indian J Cancer*. 2018 Jul-Sep;55(3):265-72. doi: 10.4103/ijc.IJC_145_18.
25. Philipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med*. 2002 May;31(5):253-8. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.310501.x.
26. Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, Trenkle T, Jacobsen HC, Attila Benedek G, et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Investig*. 2011 Jun;15(3):321-8. doi: 10.1007/s00784-010-0388-8.
27. Kouhsoltani M, Mesgarzadeh AH, Moradzadeh Khiavi M. Mandibular Fracture Associated with a Dentigerous Cyst: Report of a Case and Literature Review. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015 Summer;9(3):193-8. doi: 10.15171/joddd.2015.035.
28. Thompson LD. Dentigerous cyst. *Ear Nose Throat J*. 2018 Mar;97(3):57. doi: 10.1177/014556131809700317.
29. Bassetti MA, Kuttenger J, Novak J, Bassetti RG. Die follikuläre Zyste: zwei unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten, präsentiert anhand zweier Fallbeispiele [The dentigerous cyst: two different treatment options illustrated by two cases]. *Swiss Dent J*. 2019 Mar 11;129(3):193-203.
30. Myoung H, Hong SP, Hong SD, Lee JI, Lim CY, Choung PH, et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Mar;91(3):328-33. doi: 10.1067/moe.2001.113109.

31. Peacock ZS. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2017 Nov;29(4):475-86. doi: 10.1016/j.coms.2017.06.005.
32. Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. *Head Neck Pathol.* 2017 Mar;11(1):68-77. doi: 10.1007/s12105-017-0794-1.
33. Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, Trenkle T, Jacobsen HC, Attila Benedek G, et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Investig.* 2011 Jun;15(3):321-8. doi: 10.1007/s00784-010-0388-8.
34. Johnson NR, Gannon OM, Savage NW, Batstone MD. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Invest Clin Dent.* 2014 Feb;5(1):9-14. doi: 10.1111/jicd.12044.
35. Adeel M, Rajput MSA, Arain AA, Baloch M, Khan M. Ameloblastoma: Management and Outcome. *Cureus.* 2018 Oct 10;10(10):e3437. doi: 10.7759/cureus.3437.
36. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, Castro WH, Lacerda JC, Cardoso SV, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015 Jul;36(7):5649-53. doi: 10.1007/s13277-015-3238-0.
37. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul;56(3):151-65. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001.
38. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature.* 2016 Jun;441(7097):1060. doi:10.1038/nature04954.
39. Slack JMW. What is a stem cell? *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018 May 15:e323. doi: 10.1002/wdev.323.
40. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994 Feb 17;367(6464):645-8. doi: 10.1038/367645a0.
41. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100.

42. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011 Mar;17(3):313-9. doi: 10.1038/nm.2304.
43. Curtarelli RB, Gonçalves JM, Dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Rep.* 2018 Dec;14(6):769-84. doi: 10.1007/s12015-018-9839-4.
44. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 2015 Jul 1;335(1):135-47. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.04.018.
45. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev.* 2012 Aug;38(5):515-39. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.007.
46. Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol.* 2020 Jan;235(1):65-73. doi: 10.1002/jcp.28963.
47. Tahmasebi E, Alikhani M, Yazdani A, Yazdani M, Tebyanian H, Seifalian A. The current markers of cancer stem cell in oral cancers. *Life Sci.* 2020 May 15;249:117483. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117483.
48. Mannelli G, Magnelli L, Deganello A, Busoni M, Meccariello G, Parrinello G, et al. Detection of putative stem cell markers, CD44/CD133, in primary and lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinomas. A preliminary immunohistochemical and in vitro study. *Clin Otolaryngol.* 2015 Aug;40(4):312-20. doi: 10.1111/coa.12368.
49. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Sep;4(9):1033-43. doi: 10.5966/sctm.2015-0048.
50. Emich H, Chapireau D, Hutchison I, Mackenzie I. The potential of CD44 as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2015 Jul;44(6):393-400. doi: 10.1111/jop.12308.
51. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells.* 2009 May;27(5):1006-20. doi: 10.1002/stem.30.

52. Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014 Mar 11;14:173. doi: 10.1186/1471-2407-14-173.
53. Karbanová J, Laco J, Marzesco AM, Janich P, Voborníková M, Mokřý J, et al. Human prominin-1 (CD133) is detected in both neoplastic and non-neoplastic salivary gland diseases and released into saliva in a ubiquitinated form. *PLoS One*. 2014 Jun 9;9(6):e98927. doi: 10.1371/journal.pone.0098927.
54. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010 Mar 28;289(2):151-60. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010.
55. Fujii, K. Kumagai, Y. Hamada, R. Suzuki. Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2015 27: 176-82.
56. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6;10(4):440-54. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.016.
57. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4085-95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4404.
58. Chou MY, Hu FW, Yu CH, Yu CC. Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2015 Jan;51(1):31-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.10.002.
59. Ren ZH, Zhang CP, Ji T. Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis. *Oncol Lett*. 2016 Mar;11(3):1973-79. doi: 10.3892/ol.2016.4207.
60. Gliagias V, Wotman M, Herman SW, Costantino P, Kraus D, Tham T. Investigating the role of octamer binding transcription Factor-4 (Oct-4) in oral cavity squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Am J Otolaryngol*. 2019 Mar-Apr;40(2):282-88. doi: 10.1016/j.amjoto.2018.12.011.

61. Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, et al. CD44(high) /ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β - dependent cancer stem cell properties. *J Oral Pathol Med.* 2016 Mar;45(3):180-8. doi: 10.1111/jop.12348.
62. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int.* 2012 Oct;62(10):684-9. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x.
63. Chen J, Xia Q, Jiang B, Chang W, Yuan W, Ma Z, Liu Z, Shu X. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015 Dec18;10(12):e0145164. doi: 10.1371/journal.pone.0145164.
64. Liu S, Liu C, Min X, Ji Y, Wang N, Liu D, Cai J, Li K. Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a meta- analysis. *PLoS One.* 2013 Nov 25;8(11):e81050. doi: 10.1371/journal.pone.0081050.
65. Ortiz RC, Lopes NM, Amôr NG, Ponce JB, Schmerling CK, Lara VS, et al. CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018 Sep;47(8):740-747. doi: 10.1111/jop.12734.
66. Custódio M, Pelissari C, Santana T, Trierveiler M. Expression of cancer stem cell markers CD44, ALDH1 and p75NTR in actinic cheilitis and lip cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018 Jul;275(7):1877-1883. doi: 10.1007/s00405-018-5002-8.
67. Mirhashemi M, Ghazi N, Saghravanian N, Taghipour A, Mohajertehran F. Evaluation of CD24 and CD44 as cancer stem cell markers in squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia of the oral cavity by q- RT-PCR. *Dent Res J (Isfahan).* 2020 May 23;17(3):208-212.
68. Sedassari BT, da Silva Lascane NA, Tobouti PL, Pigatti FM, Franco MIF, de Sousa SCOM. Carcinoma ex pleomorphic adenoma of the palate composed of invasive micropapillary salivary duct carcinoma and adenoid cystic carcinoma components: an unusual case with immunohistochemical approach. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(27):e146. doi: 10.1097/MD.000000000000146.
69. Pérez-Sayáns M, Chamorro-Petronacci CM, Baltazar F, Pires FR, Ínsua Á, Suárez-Quintanilla JA, et al. Nestin Expression Is Associated with Relapses in Head and Neck Lesions. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 24;11(4):583. doi: 10.3390/diagnostics11040583.

70. Xu Z, Shen Z, Shi L, Sun H, Liu W, Zhou Z. Aldehyde dehydrogenase 1 expression correlated with malignant potential of oral lichen planus. *Ann Diagn Pathol*. 2013 Oct;17(5):408-11. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2013.04.008.
71. Mansourian A, Shanbehzadeh N, Kia SJ, Moosavi MS. Increased salivary aldehyde dehydrogenase 1 in non-reticular oral lichen planus. *An Bras Dermatol*. 2017 Mar-Apr;92(2):168-71. doi: 10.1590/abd1806-4841.20174964.
72. Sun L, Feng J, Ma L, Liu W, Zhou Z. CD133 expression in oral lichen planus correlated with the risk for progression to oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2013 Dec;17(6):486-9. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2013.06.004. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23911820.
73. Zhou Y, Chen D, Qi Y, Liu R, Li S, Zou H, Lan J, Ju X, Jiang J, Liang W, Shen Y, Pang L, Li F. Evaluation of expression of cancer stem cell markers and fusion gene in synovial sarcoma: Insights into histogenesis and pathogenesis. *Oncol Rep*. 2017 Jun;37(6):3351-60. doi: 10.3892/or.2017.5617.
74. Monroy EAC, de Andrade Santos PP, de Sousa Lopes MLD, Mosqueda-Taylor A, Pinto LP, de Souza LB. Oct-4 and CD44 in epithelial stem cells like of benign odontogenic lesions. *Histochem Cell Biol*. 2018 Oct;150(4):371-77. doi: 10.1007/s00418-018-1692-7.
75. Chacham M, Almoznino G, Zlotogorski-Hurvitz A, Buchner A, Vered M. Expression of stem cell markers in stroma of odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med*. 2020 Nov;49(10):1068-77. doi: 10.1111/jop.13102.
76. de Moraes FP, Lourenço SV, Ianez RC, de Sousa EA, Silva MM, Damascena AS, et al. Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Jan;123(1):113-22. doi: 10.1016/j.oooo.2016.09.009.
77. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. 2016 Mar 8;7(10):11018-32. doi: 10.18632/oncotarget.6920.
78. Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, et al. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*. 2009 Jun;22(6):817-23. doi: 10.1038/modpathol.2009.35.
79. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jan-Feb;18(1):17-25. doi: 10.1089/scd.2008.0055.

80. Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Aug;43(7):492-8. doi: 10.1111/jop.12159.
81. DA Cruz Paula A, Marques O, Rosa AM, DE Fátima Faria M, Rêma A, Lopes C. Co-expression of stem cell markers ALDH1 and CD44 in non-malignant and neoplastic lesions of the breast. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1427-34.
82. Kim N, Choung HK, Lee MJ, Khwarg SI, Kim JE. Cancer Stem Cell Markers in Eyelid Sebaceous Gland Carcinoma: High Expression of ALDH1, CD133, and ABCG2 Correlates With Poor Prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Feb 24;56(3):1813-9. doi: 10.1167/iovs.14-15547.
83. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, Zheng J. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2018 May;20(5):570-5. doi: 10.1007/s12094-017-1774-3.
84. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018 Jun;127(2):175-86. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8.
85. Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, Vakili Saatloo M, Kouhsoltani M, Vahed N. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021 Winter;15(1):66-75. doi: 10.34172/joddd.2021.012.
86. Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jan;4(1):7-12. doi: 10.4103/0976-237X.111586.
87. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002 Nov;31(10):598-604. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.00042.x.
88. Hammad HM, Nagrash OM, Safadi RA. Maspin, Syndecan-1, and Ki-67 in the Odontogenic Keratocyst: An Immunohistochemical Analysis. *Int J Dent*. 2020 Jul 14;2020:7041520. doi: 10.1155/2020/7041520.
89. Jaafari-Ashkavandi Z, Mehranmehr F, Roosta E. MCM3 and Ki67 proliferation markers in odontogenic cysts and ameloblastoma. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019 Jan-Mar;9(1):47-50. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.09.003.

90. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Who Classification of Head and Neck Tumours. 4. ed. Lyon: IARC; 2017.
91. Lei Y, Jaradat JM, Owosho A, Adebisi KE, Lybrand KS, Neville BW, et al. Evaluation of SOX2 as a potential marker for ameloblastic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 May;117(5):608-616.e1. doi: 10.1016/j.oooo.2014.01.017.
92. Padma Priya S, Higuchi A, Abu Fanas S, Pooi Ling M, Kumari Neela V, Sunil PM, et al. Odontogenic epithelial stem cells: hidden sources. *Lab Invest*. 2015 Dec;95(12):1344-52. doi: 10.1038/labinvest.2015.108.
93. Yajima-Himuro S, Oshima M, Yamamoto G, Ogawa M, Furuya M, Tanaka J, et al. The junctional epithelium originates from the odontogenic epithelium of an erupted tooth. *Sci Rep*. 2014 May 2;4:4867. doi: 10.1038/srep04867.
92. Papagerakis S, Pannone G, Zheng L, About I, Taqi N, Nguyen NP, Matossian M, McAlpin B, Santoro A, McHugh J, Prince ME, Papagerakis P. Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*. 2014 Jul 15;325(2):111-29. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.021.
93. Jones KB, Furukawa S, Marangoni P, Ma H, Pinkard H, D'Urso R, Zilionis R, Klein AM, Klein OD. Quantitative Clonal Analysis and Single-Cell Transcriptomics Reveal Division Kinetics, Hierarchy, and Fate of Oral Epithelial Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan 3;24(1):183-192.e8. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.015. Epub 2018 Nov 21.
94. Tsuneki M, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Nakajima M, Saku T. Perlecan-rich epithelial linings as a background of proliferative potentials of keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med*. 2008 May;37(5):287-93. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00620.x.
95. Kuroyanagi N, Sakuma H, Miyabe S, Machida J, Kaetsu A, Yokoi M, et al. Prognostic factors for keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation. *J Oral Pathol Med*. 2009 Apr;38(4):386-92. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00729.x.
96. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2005 May;34(5):280-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00314.x.

97. Mateus GC, Lanza GH, de Moura PH, Marigo Hde A, Horta MC. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Nov 1;13(11):E697-702.
98. de Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'Ana Filho M. Odontogenic epithelium: immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Head Neck Pathol*. 2011 Mar;5(1):1-7. doi: 10.1007/s12105-010-0216-0.
99. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1994 Apr;23(4):184-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.1994.tb01110.x.
100. Browne RM. Per[cyst]ent growth: the odontogenic keratocyst 40 years on. *Ann R Coll Surg Engl*. 1996 Sep;78(5):426-33.
101. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Laiho A, Peltonen S, Berdal A, Bouattour A, et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J Dent Res*. 2015 Jan;94(1):101-11. doi: 10.1177/0022034514556815.
102. Vedtofte P, Holmstrup P, Dabelsteen E. Human odontogenic keratocyst transplants in nude mice. *Scand J Dent Res*. 1982 Aug;90(4):306-14. doi: 10.1111/j.1600-0722.1982.tb00742.x
103. Papagerakis S, Pannone G, Zheng L, About I, Taqi N, Nguyen NP, Matossian M, McAlpin B, Santoro A, McHugh J, Prince ME, Papagerakis P. Oral epithelial stem cells - implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*. 2014 Jul 15;325(2):111-29. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.021.
104. Calenic B, Greabu M, Caruntu C, Tanase C, Battino M. Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):68-82. doi: 10.1111/prd.12097.
105. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(29):7-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443.
106. Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Appl Oral Sci*. 2017 Nov-Dec;25(6):708-715. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0665.

107. Jones KB, Furukawa S, Marangoni P, Ma H, Pinkard H, D'Urso R, Zilionis R, Klein AM, Klein OD. Quantitative Clonal Analysis and Single-Cell Transcriptomics Reveal Division Kinetics, Hierarchy, and Fate of Oral Epithelial Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. 2019 Jan 3;24(1):183-192.e8. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.015.

108. Silva BS, Silva LR, Lima KL, Dos Santos AC, Oliveira AC, Dezzen-Gomide AC, et al. SOX2 and BCL-2 Expressions in Odontogenic Keratocyst and Ameloblastoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Mar 1;25(2):e283-90. doi: 10.4317/medoral.23348.

109. Silva FP, Dias A, Coelho CA, Guerra EN, Marques AE, Decurcio DA, et al. Expression of CD90 and P75NTR stem cell markers in ameloblastomas: a possible role in their biological behavior. *Braz Oral Res*. 2016 Oct 10;30(1):e109. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0109.

110. Kumamoto H, Kinouchi Y, Ooya K. Telomerase activity and telomerase reverse transcriptase (TERT) expression in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2001 Apr;30(4):231-6. doi: 10.1034/j.1600-0714.2001.300407.x.

111. Heikinheimo K, Kurppa KJ, Laiho A, Peltonen S, Berdal A, Bouattour A, et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J Dent Res*. 2015 Jan;94(1):101-11. doi: 10.1177/0022034514556815.

112. Phattarataratip E, Panitkul T, Khodkaew W, Anupuntanun P, Jaroonvechatam J, Pitarangsikul S. Expression of SOX2 and OCT4 in odontogenic cysts and tumors. *Head Face Med*. 2021 Jul 14;17(1):29. doi: 10.1186/s13005-021-00283-1

113. Gomes CC, Guimarães LM, Diniz MG, Gomez RS. Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets. *J Oral Pathol Med*. 2017 Nov;46(10):877-82. doi: 10.1111/jop.12591.

114. Živković ND, Mihailović DS, Kostić MS, Cvetanović AS, Mijović ŽŽ, Milentijević MV, et al. Markers of proliferation and cytokeratins in the differential diagnosis of jaw cysts. *Ear Nose Throat J*. 2017 Sep;96(9):376-83.

115. Ong'uti MN, Cruchley AT, Howells GL, Williams DM. Ki-67 antigen in ameloblastomas: correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Oct;26(5):376-9. doi: 10.1016/s0901-5027(97)80801-6.

116. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010 Sep;39(8):585-91. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00908.x.
117. Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012;28(1):49-55. doi: 10.5146/tjpath.2012.01097.
118. Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2001 Feb;37(2):193-8. doi: 10.1016/s1368-8375(00)00079-8.
119. Florescu A, Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):105-9.
120. de Vicente JC, Torre-Iturraspe A, Gutiérrez AM, Lequerica-Fernández P. Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Sep 1;15(5):e709-15. doi: 10.4317/medoral.15.e709.
121. Soluk Tekkeşin M, Mutlu S, Olgaç V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012;28(1):49-55. doi: 10.5146/tjpath.2012.01097.
122. Amaral FR, Mateus GC, Bonisson LA, de Andrade BA, Mesquita RA, Horta MC, et al. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J.* 2012;23(2):91-6. doi: 10.1590/s0103-64402012000200001.
123. Metgud R, Gupta K. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Ann Diagn Pathol.* 2013 Dec;17(6):518-21. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2013.06.006.
124. Gadbail AR, Patil R, Chaudhary M. Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontol Scand.* 2012 Dec;70(6):529-35. doi: 10.3109/00016357.2011.600714.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Imunoexpressão de marcadores de células-tronco tumorais em lesões odontogênicas

Pesquisador: Marília Trierveiler Martins

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43101321.9.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.568.638

Apresentação do Projeto:

As lesões odontogênicas epiteliais benignas são entidades heterogêneas de grande importância clínica que se desenvolvem nos ossos maxilares a partir dos tecidos epiteliais e/ou ectomesenquimais do órgão dentário. Dentre essas, o ameloblastoma, o tumor odontogênico queratocístico (TOQ) ou queratocisto odontogênico e o cisto dentígero são três das lesões mais comuns em seus grupos, sendo todas de origem epitelial e apresentando comportamentos biológicos diversos e que suscitam grande interesse dos pesquisadores. É importante ressaltar que as células-tronco tumorais (CTT) estão presentes em neoplasias benignas e malignas e estão relacionadas com a tumorigenicidade e progressão dessas lesões. Entre os marcadores das CTT, ALDH-1 e CD44 vem sendo utilizados em pesquisas em diversas neoplasias, devido à alta expressão que estão associados a certas características clínicas, diagnóstico e prognóstico das lesões. Diante do exposto, o objetivo deste estudo será analisar a presença, quantidade e distribuição de células positivas para os marcadores de CTT ALDH-1 e CD44 em cortes histológicos de ameloblastomas, TOQ e cistos dentígeros, além de cortes contendo germe dental para comparação.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é, por meio da técnica de imuno-histoquímica, identificar a presença e a distribuição dos marcadores de CTT em lesões odontogênicas de diferentes naturezas: o

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP

Continuação do Parecer: 4.568.638

ameloblastoma, o TOQ e o cisto dentígero. Além disso, iremos comparar os achados com as marcações encontradas no germe dentário, uma vez que se considera que as três lesões têm origem nos remanescentes da odontogênese.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há risco direto aos sujeitos da pesquisa, pois o material utilizado para a obtenção e análise dos resultados consta de fragmentos de biópsias emblocados em parafina e lâminas de histológico dos Arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP.

Benefícios: Não há benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- 1_ Estudo Nacional, unicêntrico, retrospectivo
- 2_ corte transversal
- 3_ Caráter acadêmico
- 4_ Patrocinador: próprio
- 5_ País de Origem: Brasil
- 6_ Número de participantes incluídos no Brasil 95 casos.
- 8_ Centros de Pesquisa no Brasil: FOU SP.
- 9_ Previsão de início e encerramento do estudo: 15/03/2021 término 14/08/2021

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Projeto detalhado, Folha de rosto, Autorização do Laboratório de Biologia de Células-Tronco em Odontologia LABITRON, Autorização do Biobanco: Arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d..

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "EMENDA", por meio da Plataforma Brasil, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação (Norma Operacional 001/2013 – letra H).

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 4.568.638

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1701101.pdf	10/02/2021 15:13:17		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autoriz_labitron.pdf	10/02/2021 15:12:44	Marília Trierweiler Martins	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Uso_acervo.pdf	10/02/2021 15:12:30	Marília Trierweiler Martins	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	10/02/2021 15:11:51	Marília Trierweiler Martins	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/02/2021 15:11:44	Marília Trierweiler Martins	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Março de 2021

Assinado por:

Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br