

RAMON RIBEIRO

**Análise da expressão imuno-histoquímica de PTEN, mTOR e NFkB
em ameloblastomas**

São Paulo

2022

RAMON RIBEIRO

**Análise da expressão imuno-histoquímica de PTEN, mTOR e NFkB
em ameloblastomas**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Décio Santos Pinto Júnior

São Paulo

2022

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

Ribeiro, Ramon.

Análise da expressão imuno-histoquímica de PTEN, mTOR e NFkB em ameloblastomas / Ramon Ribeiro; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2022.
75 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. Ameloblastoma. 2. PTEN. 3. mTOR. 4. NFkB. 5. Imuno-histoquímica. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Ribeiro R. Análise da expressão imuno-histoquímica de PTEN, mTOR e NFkB em ameloblastomas. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 21/Março/2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Fernanda Mombriani

Instituição: Univ. Federal Juiz de Fora Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Stephanie Kenig Viveiros

Instituição: Externo Julgamento: Aprovado

Dedico este estudo aos meus pais Antônio e Maria Luiza que superaram diversos desafios em suas vidas para dar educação, caráter e dignidade aos filhos Ramon, Rogério e Roberta. Meu eterno agradecimento Papai e Mamãe.

A minha esposa Denise e minha filha Tammy por entender, participar e estar sempre presente nos momentos de dificuldades deste projeto de estudo e sempre me incentivando com carinho e companheirismo. Obrigado pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e mestre Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, meu eterno agradecimento pela paz de espírito transmitida em todos os momentos de ensinamento e demonstrando o caminho a seguir durante os problemas enfrentados na construção deste trabalho. Obrigado por tornar o mestrado uma fase alegre de novos conhecimentos na patologia permitindo expandir as oportunidades de carreira a todos nós alunos. É uma honra tê-lo como orientador e amigo.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes meu agradecimento pelos ensinamentos diários sempre transmitindo seus conhecimentos com um largo sorriso no rosto e uma paciência serena. Obrigado por me auxiliar e fazer parte deste trabalho.

Aos demais docentes do Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade de São Paulo, Prof.^a. Dra. Marília Trierveiler Martins, Prof.^a. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza, Prof.^a. Dra. Karem Lopez Ortega, Prof.^a. Dra. Marina Helena Cury Gallotini e ao Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva meu agradecimento pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti meu agradecimento por transmitir seus conhecimentos de estatística com muita paciência.

Aos funcionários do laboratório de patologia, Elisa meu eterno agradecimento pela paciência de me ensinar todas as etapas da rotina, Juvani e Adriana pelo apoio na hora de elucidar as minhas dúvidas.

*“De manhã quando você acorda você tem simplesmente duas opções: voltar a dormir e a sonhar ou levantar e correr atrás dos seus sonhos.
A escolha é sua”.*

Autor desconhecido

RESUMO

Ribeiro R. Análise da expressão imuno-histoquímica de PTEN, mTOR e NFkB em ameloblastomas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão corrigida.

Os tumores odontogênicos compreendem um grupo complexo de lesões de diversos tipos que podem criar dificuldades nos diagnósticos devido à sobreposição e diversidade de tipos histopatológicos e comportamentos clínicos. A compreensão do comportamento biológico dessas lesões é de fundamental importância para o diagnóstico final e planejamento do tratamento, pois influenciam o prognóstico. Dentre os tumores de origem epitelial odontogênica, o ameloblastoma é uma neoplasia benigna localmente invasiva, consistindo de epitélio odontogênico proliferativo, em meio a um estroma fibroso, não tendo potencial indutivo sobre o mesmo. É um tumor de crescimento lento, assimétrico, podendo provocar deformidade facial devido à distensão da cortical adjacente à lesão e nos casos mais avançados, romper o limite ósseo e aflorar na boca. Usualmente os ameloblastomas são diagnosticados na 4^o e 5^o décadas de vida, sendo que em 80 % dos casos, o tumor está na mandíbula e 20 % na maxila. O estudo da patogênese do ameloblastoma é dificultado devido as inúmeras vias de sinalização, diversidade de moléculas e as várias alterações genéticas que afetam o desenvolvimento e progressão do epitélio odontogênico presente no tumor. Este estudo tem como objetivo realização de análise imuno-histoquímica aos anticorpos das proteínas PTEN, mTOR, e NFkB a fim de identificar e correlacioná-las entre si nos casos de ameloblastomas. Foram selecionados 24 casos de ameloblastomas dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP para realização das análises imuno-histoquímicas. PTEN foi positivo em 29,2% das amostras, mTOR e NFkB foram positivos em 50% das amostras. Correlacionadas entre si, PTEN, mTOR e NFkB demonstraram positividade juntas em 8,3% das amostras e negativaram entre si juntas em 16,7% das amostras. Correlacionadas aos pares encontramos os seguintes valores de p no Teste do Qui Quadrado: PTEN x mTOR $p=0.653$; PTEN x NFkB $p=0,653$ e mTOR x NFkB $p=0,414$ concluindo que não existe associação significativa entre as proteínas.

Palavras-chave: Ameloblastoma. PTEN. mTOR. NFkB. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Ribeiro R. Analysis of imunohistochemical expression of PTEN, mTOR and NFkB in ameloblastomas [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Revised version.

Odontogenic tumors comprise a complex group of lesions of different types that can create diagnostic difficulties due to the overlap and diversity of histopathological types and clinical behaviors. Understanding the biological behavior of these lesions is of fundamental importance for the final diagnosis and treatment planning, as they influence the prognosis. Among the tumors of odontogenic epithelial origin, ameloblastoma is a benign neoplasm, but locally invasive, consisting of proliferative odontogenic epithelium, in the midst of a fibrous stroma, with no inductive potential over it. It is a slow-growing, asymmetrical tumor, which can cause facial deformity due to distention of the cortical bone adjacent to the lesion and, in more advanced cases, break the bone limit and emerge in the mouth. Ameloblastomas are usually diagnosed in the 4th and 5th decades of life, and in 80% of cases, the tumor is in the mandible and 20% in the maxilla. The study of the pathogenesis of ameloblastoma is difficult due to the numerous signaling pathways, diversity of molecules and the various genetic alterations that affect the development and progression of the odontogenic epithelium present in the tumor. The present study aims to perform immunohistochemical analysis of antibodies to PTEN, mTOR, and NFkB proteins in order to identify and correlate them with each other in cases of ameloblastomas. Twenty-four cases of ameloblastomas were selected from the files of the Laboratory of Surgical Pathology of the Discipline of Oral Pathology at FOUSP for immunohistochemical analyses. PTEN was positive in 29.2% of samples, mTOR and NFkB were positive in 50% of samples. Correlated with each other, PTEN, mTOR and NFkB showed positivity together in 8.3% of the samples and were negative together in 16.7% of the samples. In pairs, we found the following p-values in the Chi-Square Test: PTEN x mTOR $p=0.653$; PTEN x NFkB $p=0.653$ and mTOR x NFkB $p=0.414$, concluding that there is no significant association between the proteins.

Keywords: Ameloblastoma. PTEN. mTOR. NFkB. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Classificação dos ameloblastoma OMS 2022	29
Figura 2.2 – Fotomicrografia de ameloblastoma (100x)	30
Figura 2.3 – Sinalização da via AKT	31
Figura 2.4 – Via de sinalização AKT/mTOR e suas funções.....	34
Figura 2.5 – Via de sinalização PI3K/AKT e funções de PTEN.....	36
Figura 2.6 – As duas vias de sinalização de NFkB	39
Figura 2.7 – Funções de NFkB no câncer	41
Figura 5.1 – Fotomicrografia da imunexpressão de PTEN (100x).....	54
Figura 5.2 – Fotomicrografia da imunexpressão de mTOR (100x).....	56
Figura 5.3 – Fotomicrografia da imunexpressão de NFkB (100x)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Anticorpos, diluição e tempo de incubação	48
Tabela 5.1- Estatística descritiva da idade.....	51
Tabela 5.2- Estatística descritiva do sexo	52
Tabela 5.3- Estatística descritiva da raça.....	52
Tabela 5.4- Frequência de PTEN.....	53
Tabela 5.5- Frequência de mTOR.....	55
Tabela 5.6- Frequência de NFkB	57
Tabela 5.7- Frequência entre PTEN, mTOR e NFkB	58
Tabela 5.8- Frequência entre PTEN e NFkB.....	59
Tabela 5.9- Frequência entre PTEN e mTOR	59
Tabela 5.10- Frequência entre mTOR e NFkB.....	60
Tabela 5.11- Análise estatística entre PTEN e mTOR (Qui-Quadrado)	60
Tabela 5.12- Análise estatística entre mTOR e NFkB (Qui-Quadrado).....	61
Tabela 5.13- Análise estatística entre PTEN e NFkB (Qui-Quadrado).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC	Proteína quinase dependente de cAMP,cGMP proteína C
AKT	Proteína quinase B
BAD	Gene agonista da morte celular
BAFF	B cell activating factor
CD40L	Ligante da proteína Cluster de diferenciação 40
CENP-C	Centromere protein C
COX2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	Diamino benzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	Extracellular signal regulated Kinase
FKBP12	Proteína prolil isomerase cis-trans
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FOXO	Proteína da família forkhead de fatores de transcrição
FRB	Domínio de ligação FKBP-rapamicina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK3 β	Glicogênio síntase quinase 3 beta
IKK	Complexo I κ B quinases
IKK α	Proteína quinase inibidor do fator nuclear kappa B
IKK β	Proteína quinase inibidor do fator nuclear kappa B subunidade beta
IL 1	Interleucina 1 pró-inflamatória
LPS	Lipopolissacarídeos
MAP	Microtubule associated proteins
Mdm2	Murine double minute 2
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mTOR	Alvo mecânico da rapamicina
mTORC1	Alvo mecânico do complexo 1 da rapamicina
mTORC2	Alvo mecânico do complexo 2 da rapamicina
NF κ B	Fator nuclear kappa B

OMS	Organização Mundial da Saúde
p50	subunidade da família NFκB
p52	subunidade da família NFκB
p65	subunidade da família NFκB gene REL A
P53	Gene supressor de tumor
PDPK1	Proteína quinase 1 dependente da proteína 3 fosfoinositida
PDZ	Módulos (ou domínios) de interação proteína-proteína
PI3K	Fosfoinositídeo 3 quinase
Pip 2	Fosfatidilinositol 4,5 bi fosfato
Pip 3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
p-RPS6	Proteína ribossômica S6 fosforilada
PS6K	Proteína ribossômica S6 quinase
PTEN	Fosfatase homologa à tensina
RAD51	Proteína de reparação de quebras na cadeia dupla de DNA
RANK	Receptor do fator nuclear kappa B
RANKL	Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa B
REL A	Fator de transcrição Rel A
REL B	Fator de transcrição Rel B
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor tirosina quinase
S6K	Ribossomal protein S6 kinase
SER	Serina
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
μM	Micromol
μm	Micrômetro
ml	Mililitros
pH	Potencial hidrogênico
%	Por cento
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	AMELOBLASTOMA	27
2.2	AKT	31
2.3	mTOR	33
2.4	PTEN.....	35
2.5	NFkB	38
3	PROPOSIÇÃO	43
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	AMOSTRAGEM.....	45
4.2	CRITÉRIO DE INCLUSÃO	45
4.3	COLETA DE DADOS CLÍNICOS.....	46
4.4	MÉTODOS	46
4.4.1	Técnica de Imuno-Histoquímica	46
4.5	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	49
4.6	ATENDIMENTO ÀS NORMAS DE BIOÉTICA	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
5.2	RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	52
5.2.1	PTEN	53
5.2.2	mTOR	55
5.2.3	NFkB	56
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	69
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

Ameloblastomas são neoplasias que têm inspirado grande controvérsia e interesse clínico. A sua incidência, características radiográficas, tratamento e comportamento ainda são discutidos com bastante frequência na literatura. Em 2017, a classificação dessas lesões passou por modificações na terminologia com a introdução de visões baseadas em atualizações de estudos genéticos. Desde a primeira edição da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1971, os tumores odontogênicos têm sido intensamente estudados. Estas lesões atraem o interesse de patologistas devido à sua baixa frequência, representando apenas, de acordo com a literatura, de 2 a 3% de todas as lesões dos maxilares.

Na literatura existem muitos estudos detalhando a expressão de proteínas na sinalização celular que promovem aspectos cruciais do desenvolvimento tumoral do ameloblastoma, principalmente na área de proliferação, motilidade e diferenciação celular. O estudo da patogênese do ameloblastoma é dificultado devido as inúmeras vias de sinalização, diversidade de moléculas e as várias alterações genéticas que afetam o desenvolvimento e progressão do epitélio odontogênico presente no tumor.

O controle da proliferação celular é um importante processo para a manutenção da homeostase tecidual. Os patologistas usam a avaliação da proliferação celular para fornecer informações na tomada de decisões direcionadas ao diagnóstico, comportamento clínico e futuro tratamento das neoplasias sendo elas benignas ou malignas.

A Proteína quinase B (AKT) e Fosfatase homologa à tensina (PTEN) medeia vias de sinalização a jusante de receptores tirosina quinases promovendo a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo de fosfato de adenosina trifosfato. As quinases AKT regulam diversos processos celulares, incluindo proliferação e sobrevivência celular, tamanho da célula, invasão de tecido e angiogênese. Muitas oncoproteínas e supressores de tumor implicados na sinalização celular e regulação metabólica estão dentro da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR em um equilíbrio que é alterado em muitos cânceres humanos pela

ativação e inativação de proteínas, mecanismo que é essencial para a tumorigênese.

Nesse contexto, a via PI3K/AKT/PTEN junto com o Alvo mecanístico da Rapamicina (mTOR) e Fator nuclear kappa B (NFkB) tem sido analisada em algumas lesões odontogênicas, buscando compreender mecanismos envolvidos e identificando as vias na formação e progressão destas lesões. Sendo que a perda de uma proteína ou uma proteína não funcional permitirá que células se dividam de forma descontrolada e evitem que células danificadas sofram apoptose resultando no crescimento de tumores.

Neste estudo analisamos as proteínas PTEN, mTOR e NFkB nas células epiteliais do ameloblastoma visando identificar e correlacioná-las no crescimento, na progressão e na diferenciação celular dentro das vias de sinalização participantes na progressão tumoral do ameloblastoma.

A compreensão do mecanismo de patogênese dos ameloblastomas e o estudo de como acontece a sua tumorigênese irá ajudar no desenvolvimento de novas terapias e tratamentos cirúrgicos com menor morbidade aos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Descrevemos a seguir uma revisão da literatura referente as proteínas pesquisadas correlacionando-as a tumorigênese do ameloblastoma.

2.1 AMELOBLASTOMA

O ameloblastoma é uma neoplasia benigna, localmente invasiva, constituído por epitélio odontogênico proliferativo, em meio a um estroma fibroso, sendo este epitélio sem potencial indutivo sobre o estroma. Usualmente os ameloblastomas são diagnosticados na 4ª e 5ª décadas de vida, sendo a incidência global estimada em 0,5% casos novos por milhão de pessoas/ano. Em 80% dos casos, o tumor está na mandíbula e 20% na maxila, sendo que na mandíbula, 70% localizado na região de molares e no ramo ascendente, 20% na região pré-molares e 10% na região anterior.

Diversas são as hipóteses quanto à origem dos ameloblastomas. A mais aceita é aquela que aponta a lâmina dentária como provável tecido de origem dos ameloblastomas. As outras possibilidades são representadas por estruturas epiteliais originárias do epitélio de revestimento bucal do órgão do esmalte, restos de Malassez e lesões císticas. Ao epitélio de revestimento bucal, tem sido atribuída à origem do ameloblastoma extra ósseo, que se desenvolve no rebordo alveolar. O ameloblastoma é um tumor de crescimento lento, assimétrico, podendo provocar deformidade facial devido à distensão da cortical adjacente à lesão e, nos casos mais avançados, romper o limite ósseo e aflorar na boca (Neville et al., 2009).

Os ameloblastomas são tratados por remoção cirúrgica, porém ainda existe certa controvérsia quanto ao tipo de cirurgia. A curetagem é o procedimento menos recomendado porque restringe apenas à área lesada, não sendo possível agir com margem de segurança diante de uma possível (e comum) infiltração, além da parte curetada, devido ao poder invasivo local do tumor sendo o índice de recidiva tendente a ser maior neste grupo de pacientes.

Dependendo do tamanho e da localização do ameloblastoma, recomenda-se ressecção em bloco ou a ressecção radical. Nos casos em que a lesão já envolveu grande parte da mandíbula, a conduta cirúrgica seria a hemi-mandibulectomia. Assim sendo, quando o tumor ainda não atingiu uma grande proporção, a ressecção em bloco com margem de segurança é a opção recomendada. Scheper et al. (2008) relatam que o ameloblastoma mais comum e agressivo é o tipo sólido/multicístico e que os ameloblastomas unicístico e periféricos são menos comuns e menos agressivos.

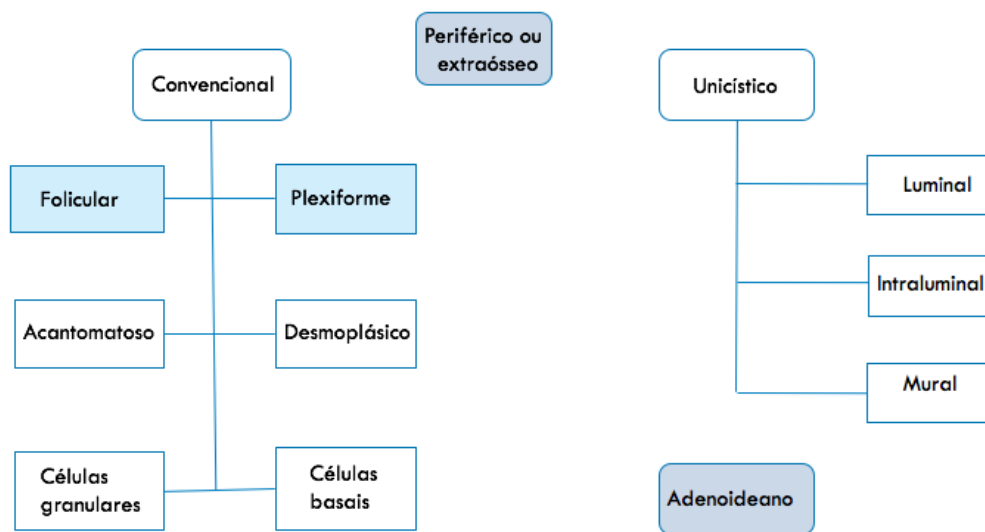
As recidivas podem acontecer depois de muitos anos de tratamento sendo que períodos de 5 anos com ausência da patologia não indicam cura da mesma. No caso dos ameloblastomas, mesmo na ressecção marginal ou em bloco a literatura relata uma taxa de até 15 % de recorrência (Neville et al., 2009).

O crescimento invasivo e focal dos ameloblastomas é uma das principais causas de recorrência pós-operatória. Nos últimos anos, estudos sobre o crescimento invasivo concentram-se nos níveis de proteínas e genes, e a atenção foi dada a proliferação celular, apoptose, degradação da matriz, expressão de oncogenes e genes supressores de tumores (Bologna-Molina et al., 2013; Pulino, 2013).

Dentre os tumores odontogênicos epiteliais, o ameloblastoma sofreu alterações em sua terminologia, baseando-se especialmente em estudos genéticos recentes. Apesar de sua agressividade e da tendência à recorrência, ele permanece como uma entidade benigna, apesar de sua variante extremamente rara, conhecida como ameloblastoma maligno ou metastatizante. A classificação para essa lesão também foi simplificada. Na reunião da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2005, ele foi subdividido em: ameloblastoma sólido ou multicístico, ameloblastoma unicístico, ameloblastoma periférico ou extra ósseo e ameloblastoma desmoplásico. Em 2017, a classificação foi restrita a “ameloblastoma”, “ameloblastoma unicístico” e “ameloblastoma periférico ou extra ósseo” (Wright; Vered, 2017). Os termos “sólido/multicístico” foram abolidos por não demonstrarem uma significância biológica. Da mesma maneira, o ameloblastoma desmoplásico foi reclassificado como um subtipo histológico, e não como uma entidade clínica, uma vez que se comporta como um ameloblastoma convencional (Tolentino, 2018).

Na última edição da OMS, agora em 2022, não houve alterações nas classificações dos ameloblastomas (Figura 2.1), porém foi reconhecida uma nova entidade denominada ameloblastoma adenoideano caracterizado por apresentar estruturas semelhantes a ductos com uma arquitetura cribriforme e condensações celulares espiraladas lembrando mórulas e a presença de material dentinóide (Vered; Wright, 2022).

Figura 2.1 – Classificação dos ameloblastoma OMS 2022

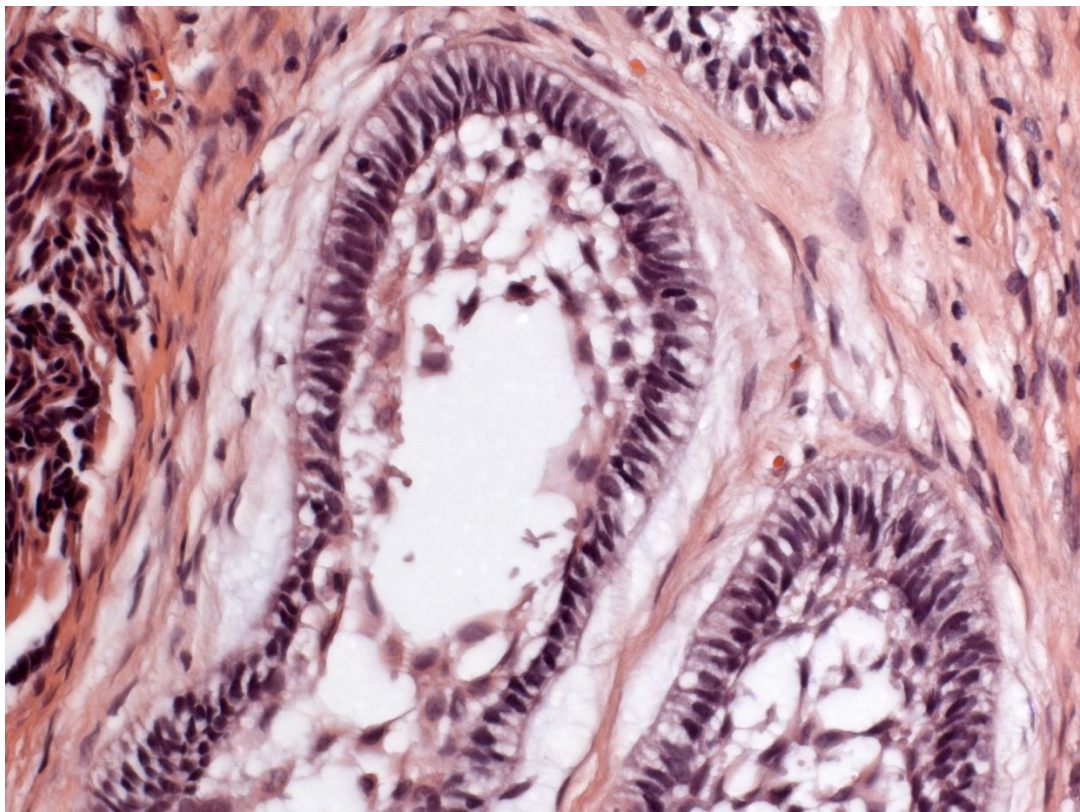


Fonte: O autor.

Na análise histopatológica do ameloblastoma, se observa na maioria dos casos ilhas ou cordões de epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso, o qual não tem capacidade de formação de tecidos duros, como esmalte e dentina. O epitélio odontogênico é formado por células colunares dispostas em paliçada semelhantes aos ameloblastos, com núcleos localizados na posição oposta à basal (polarização reversa) (Figura 2.2). Na parte central das ilhas, no caso do ameloblastoma tipo padrão folicular são observadas células estreladas, arranjadas frouxamente, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte. No caso de formação de cordões do ameloblastoma tipo padrão plexiforme, o retículo estrelado será quase inexistente.

A atipia celular e atividade mitótica raramente estão presentes em qualquer subtipo histopatológico do ameloblastoma e alterações destes devem ser analisadas minuciosamente suspeitando de um processo maligno como carcinoma ameloblástico.

Figura 2.2 – Fotomicrografia de ameloblastoma (100x)



Células colunares dispostas em paliçada semelhantes aos ameloblastos, com núcleos localizados na posição oposta à basal e presença de vacúolos perinucleares. Na parte central das ilhas, no caso do ameloblastoma tipo padrão folicular são observadas células estreladas, arranjadas frouxamente, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte.

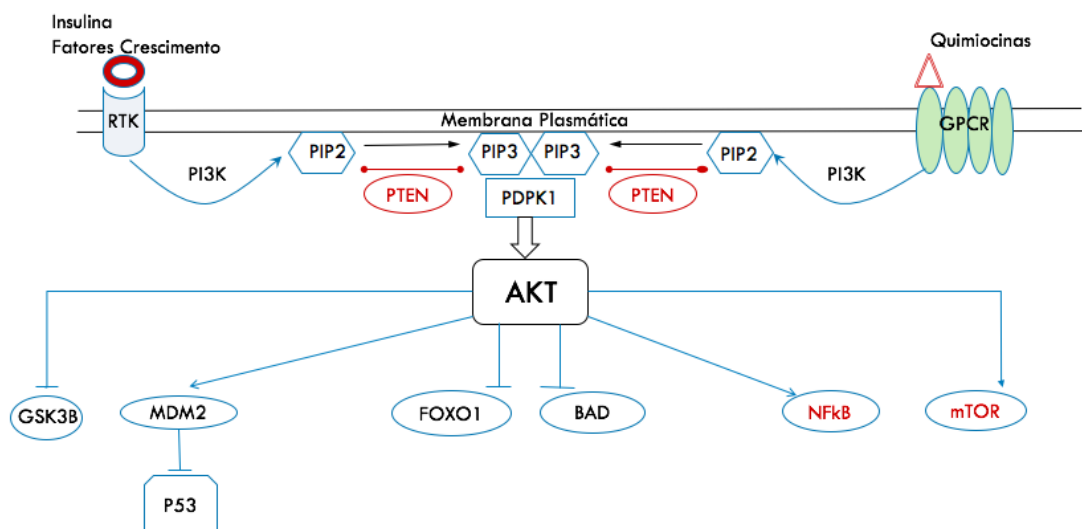
Fonte: O autor.

2.2 AKT

Sendo AKT a proteína central da via de sinalização de nossa pesquisa devemos discorrer um pouco sobre suas funções e suas atividades relacionadas às proteínas PTEN, mTOR e NFκB.

A proteína AKT faz parte da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (Figura 2.3) na qual a sua ativação é dependente da disponibilidade do mesmo no citoplasma. Através da sinalização via membrana celular, em receptores tipo RTK (receptor tirosina quinases) induzida por fatores de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos ou interleucinas, ativando a proteína AKT, que irá promover uma cascata de eventos no citoplasma e no núcleo. Vários processos celulares são regulados pela ativação de AKT como a proliferação celular, a apoptose, a diferenciação celular, o metabolismo, estabilidade do genoma e angiogênese. Estando AKT ativada desordenadamente, ela irá desencadear uma proliferação descontrolada com um aumento de sobrevivência celular contribuindo para o desenvolvimento ou progressão de neoplasias (Pulino, 2013).

Figura 2.3 – Sinalização da via AKT



Fonte: O autor.

AKT ativado é um fator de sobrevivência bem estabelecido, promovendo atividades antiapoptóticas como:

- impede a liberação de citocromo c da mitocôndria;
- fosforila e inativa os fatores pró-apoptóticos Gene agonista da morte celular (BAD) e procaspase-9;
- fosforila e inativa os fatores de transcrição da proteína da família forkhead de fatores de transcrição (FOXO) (genes da apoptose);
- ativa a quinase o complexo I κ B quinase (IKK) que é um regulador positivo de NF κ B (transcrição de genes anti apoptóticos);
- fosforila e transloca o Murine double minute 2 (Mdm2) para o núcleo (regula negativamente p53);
- fosforila e inibe a glicogênio síntase 3 β (GSK3 β) evitando a degradação da ciclina D1 (progressão do ciclo celular);
- ativa a quinase mTOR (promove o crescimento e proliferação celular).

Uma vez que AKT é frequentemente ativado em uma ampla variedade de neoplasias humanas, Kumamoto e Ooya (2007), em suas pesquisas, sugeriram que AKT contribui para a sobrevivência de células neoplásicas em tumores odontogênicos epiteliais. No entanto, devido ao seu envolvimento em diversos processos fisiológicos, um deles o metabolismo da glicose, será necessário abordar os problemas potenciais de toxicidade associados ao direcionamento de tratamentos realizados na via AKT (Altomare; Testa, 2005).

2.3 mTOR

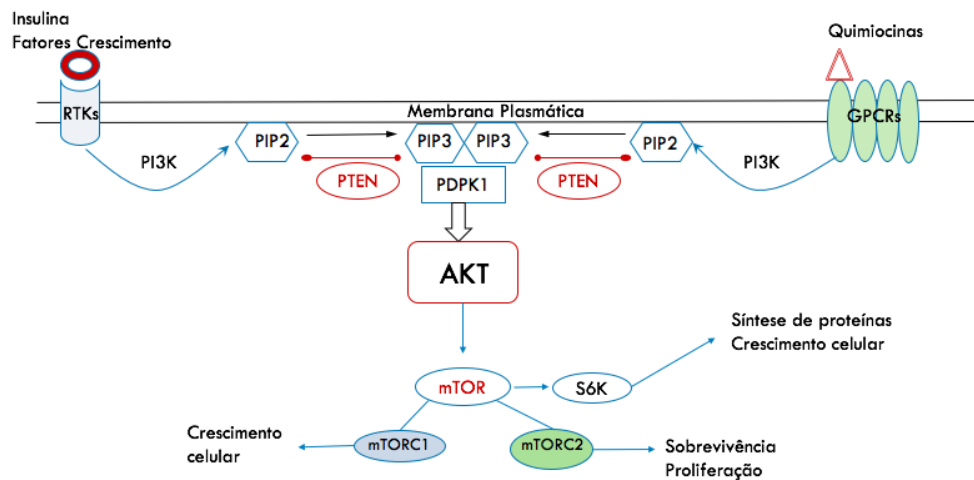
O alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), anteriormente referido como o alvo da rapamicina em mamíferos, é uma quinase que em humanos é codificada pelo gene *MTOR*. mTOR é um membro da família de proteínas quinases relacionadas à fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K).

O mTOR se liga a outras proteínas e serve como um componente central de dois complexos protéicos distintos:

- mTORC1 – Alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina (sensível a rapamicina) que atua principalmente nas funções metabólicas celulares, ativa a síntese de proteínas, biogênese de ribossomos, transporte de nutrientes, síntese de lipídios, fatores de crescimento, energia celular e outros processos em resposta a nutrientes. mTORC1 aberrante nas células provocam aumento de crescimento da mesma (maiores em tamanho e um aumento na massa celular), também regula negativamente a autofagia (Benjamin et al., 2011);
- mTORC2 - Alvo mecanístico do complexo 2 da rapamicina (insensível a rapamicina) participa na organização do citoesqueleto da actina onde influencia na motilidade, invasividade e metástase das células tumorais. mTORC2 também é a quinase de ativação a montante para membros da família Proteína quinase dependente de cAMP,cGMP proteína c (AGC) quinase, incluindo AKT (Rosner et al., 2010; Benjamin et al., 2011; Martins, 2013).

A via mTOR (Figura 2.4) é um regulador central do metabolismo e fisiologia dos mamíferos, coordenando o crescimento celular com as condições ambientais, com papéis importantes na função dos tecidos, incluindo fígado, músculo, tecido adiposo e o cérebro, e é desregulado em doenças humanas, como diabetes, obesidade, depressão e câncer (renal e mama) (Tian et al., 2019).

Figura 2.4 – Via de sinalização AKT/mTOR e suas funções



Fonte: O autor.

A rapamicina inibe mTOR por meio da associação com seu receptor intracelular da proteína prolil isomerase cis-trans (FKBP12). O complexo FKBP12-rapamicina liga-se diretamente ao domínio de ligação FKBP12-Rapamicina (FRB) do mTOR, inibindo sua atividade.

O mTOR ativado e desregulado pode promover a proliferação de células cancerígenas aumentando a secreção de oncoproteínas, facilitando o ciclo celular encurtando a fase G1 e promovendo a rápida progressão das neoplasias. Através desta via há a alteração da organização do citoesqueleto celular que desempenha um papel importante na invasão e metástase na carcinogênese afetando o prognóstico da doença. Desta forma, mTOR é uma das proteínas mais importantes da via AKT, sendo a proteína crítica para o crescimento celular e a formação de tumores. Onde mTORC1 é ativado em muitas vias oncogênicas frequentemente mutadas como a PI3K/AKT ou MAPKs e também mTORC2 que está implicado na ativação de AKT (Saxton; Sabatini, 2017).

Scheper et al. (2008) demonstraram que a expressão imuno-histoquímica de mTOR foi encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo, sendo mais presente no citoplasma (55,3%) do que no núcleo (32 %) em 65 casos examinados. Estudos de Li et al. (2012) revelam, por análise multivariada, que a presença da expressão de

mTOR no núcleo pode aumentar o risco de recorrência do ameloblastoma em 6,417 vezes. Concluindo, o mTOR pode servir como um fator independente para prever o prognóstico de pacientes diagnosticados com ameloblastoma.

A via PI3K/AKT/mTOR está relacionada com a expressão de Metaloproteinases de matriz (MMPs) que são essenciais para a degradação da matriz extracelular promovendo a invasão local e metástases em neoplasias. Em ameloblastomas os estudos mostram que mTOR e seus fatores a jusante podem aumentar a expressão de MMP-2 que causam erosão óssea e degrada o colágeno tipo IV, principal componente estrutural das membranas basais.

Li et al. (2015) investigaram a expressão de mTOR, em ameloblastomas primários e recorrentes e relatam positividade em 88% dos casos primários. Chaisuparat et al. (2013) também relata valores similares investigando a expressão de Proteína ribossômica S6 quinase fosforilada (p-RPS6), um marcador da ativação do mTOR, onde foi expressa em 76% dos casos e outro estudo onde utilizaram p-S6K (um marcador localizado a montante de p-RPS6) expresso em 86% dos casos.

2.4 PTEN

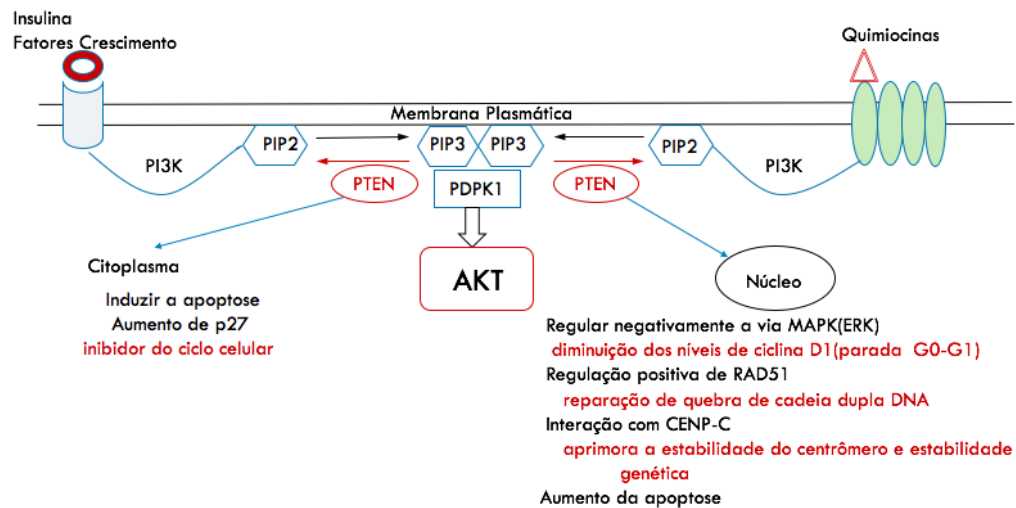
PTEN é uma fosfatase lipídica e proteica sendo o principal regulador negativo da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e que desempenha um papel fundamental no controle de uma ampla gama de processos celulares essenciais, incluindo proliferação celular, crescimento, sobrevivência e metabolismo.

Normalmente PTEN se encontra na forma fosforilada que é inativa e totalmente estável, estando presente no citoplasma em condições fisiológicas

A ativação é efetuada por diversos receptores de membrana celular, como os receptores tirosina quinases (RTK), integrinas, receptores acoplados a proteína G e receptores de quimiocinas. Estes receptores ativados direta ou indiretamente recrutam e ativam PI3K, que irá fosforilar PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) gerando PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) desencadeando a ativação da via AKT. Uma vez ativado, PTEN atua como antagonista para desfosforilando PIP3 e

convertendo em PIP2, resultando em uma diminuição da atividade de AKT (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Via de sinalização PI3K/AKT e funções de PTEN



Fonte: O autor.

A perda de PTEN resulta na falta de regulação dos níveis de PIP3 que irão promover a hiperativação da via PI3K/AKT, levando a perda de controle do crescimento celular e a redução da apoptose iniciando a carcinogênese, conforme estudos em linhas de células tumorais nulas de PTEN (Alvarez-Garcia et al., 2019).

A função PTEN clássica é a citoplasmática e inclui a regulação negativa de AKT, aumentando os níveis de p27 (proteína p27) induzindo a apoptose. O PTEN nuclear possui outras funções: regulação negativa de Mitogen-activated protein kinase -MAPK (ERK), com diminuição dos níveis de ciclina D1 e parada em G0-G1; regulação positiva dos níveis da proteína de reparação de quebras na cadeias dupla de DNA (RAD51) e reparação de quebra de cadeia dupla; uma interação no Centromere protein C (CENP-C), que aprimora a estabilidade do centrômero e a estabilidade genômica; e aumento da apoptose (Planchon et al., 2008).

A inatividade ou mesmo perda das várias funções de PTEN é um fator crucial na progressão e desenvolvimento das neoplasias humanas. No ameloblastoma ele está diretamente ligado nas duas vias relacionadas a proliferação e sobrevivência, a via PI3K/AKT/mTOR e a via do NFkB. A sinalização aberrante na via PI3K/AKT/mTOR pode ser a causa da agressividade do ameloblastoma e o PTEN foi relatado como completamente ausente em 33% dos casos (Scheper et al., 2008).

Estudos relatam que deleções ou mutações somáticas de PTEN são detectadas em muitos tipos de câncer (próstata, mama e cérebro) e sua regulação via metilação pode contribuir para sua inativação. No ameloblastoma, a metilação foi detectada em 58,3% das amostras, porém não contribuiu significativamente para a diminuição da expressão de PTEN (Lapthanasupkul et al., 2020).

PTEN pode ficar indisponível em suas regiões básicas devido a interação direta com seu próprio C-terminal altamente ácido após a sua fosforilação. Isto acontece devido ao dobramento da proteína inibindo sua interação com proteínas contendo o domínio de interação proteína-proteína (PDZ). Sendo assim, a desfosforilação de PIP3 não acontece devido a indisponibilidade de regiões básicas no PTEN para se ligar a membrana plasmática ácida. Porém, a sinalização pode ocorrer através da via PI3K/AKT/mTOR levando a carcinogênese apesar da expressão normal de PTEN (Tamguney; Stokoe, 2007; Narayan et al., 2020).

A correlação entre a perda de PTEN e a sinalização de mTOR esta bem documentado em vários estudos (Scheper et al., 2008; Matsumoto et al., 2016), onde nota-se que a regulação negativa de PTEN resulta na ativação da sinalização de mTOR pelo aumento da proteína pS6, que é um marcador confiável da atividade de mTOR.

Nos estudos de Kumamoto e Ooya (2007) foi detectado imunorreatividade para PTEN em células de ameloblastomas e tumores ameloblásticos malignos. Porém, o nível de PTEN em ameloblastomas foi significativamente menor do que em germes dentários e esta característica sugere que a expressão diminuída de PTEN pode participar da carcinogênese do epitélio odontogênico ativando a via de sinalização do AKT.

2.5 NFkB

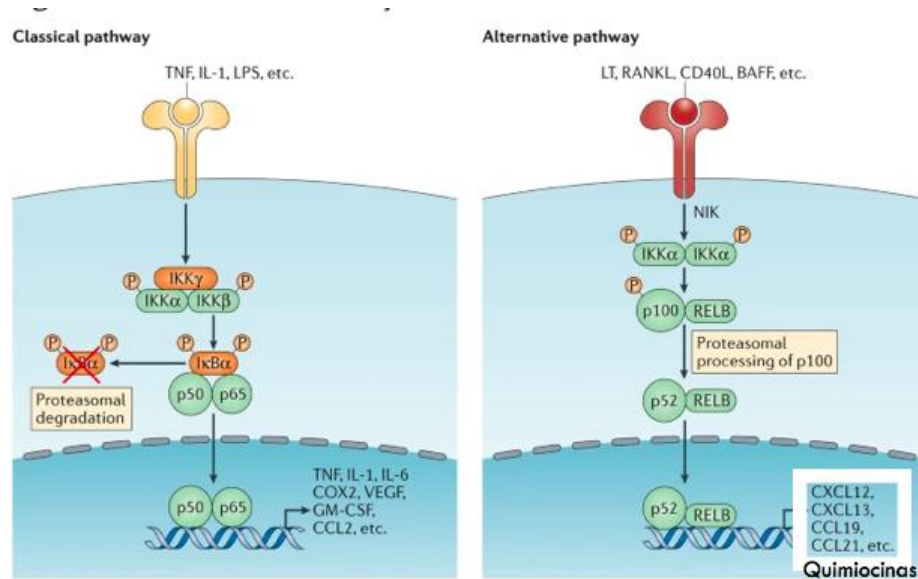
NFkB (fator nuclear kappa B) é um conjunto proteico vital que desempenha funções como fator de transcrição, promovendo a transcrição de mais de 150 genes, formando complexos de proteínas distintos, que se liga a sequências do Ácido desoxirribonucleico (DNA) específicas regulando diversos processos celulares e pode ser encontrado em quase todos os tipos de células. NFkB desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. A regulação incorreta de NFkB tem sido ligada ao câncer, doenças inflamatórias e autoimunes, choque séptico e infecção viral, também está associado em processos de plasticidade sináptica e memória (Giudice, 2009).

A ativação do NFkB é feita por vários estímulos, como citocinas, fatores de crescimento, produtos bacterianos e virais, radiação ionizante e UV, espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos ao DNA (XIA et al., 2014; Sivakumar et al., 2020).

A ativação do NFkB (Figura 2.6) depende da degradação de seus inibidores específicos (IKK α e IKK β), após sua fosforilação pelo complexo IKK quinase. Existem dois tipos de vias de sinalização: a via clássica (canônica) que tem como alvo principal os dímeros p50-p65 e a via alternativa (não canônica) que resulta na ativação dos dímeros p52-REL B (subunidade da família NFkB ligado ao fator de transcrição REL B), as quais após sinalizadas entram no núcleo e ativem as transcrições gênicas específicas (Nottingham et al., 2014).

A via clássica desempenha um papel importante na indução de genes envolvidos na inflamação, proliferação e sobrevivência celular, transição e invasão epitélio-mesenquimal, angiogênese e metástase. A via alternativa desempenha um papel essencial na indução de genes associados ao desenvolvimento e manutenção de órgãos linfoides secundários e estruturas relacionadas ao microambiente tumoral.

Figura 2.6 – As duas vias de sinalização de NFκB



Fonte: Adaptado Taniguchi e Karin (2018).

Vários estudos demonstram que as vias de sinalização AKT e NFκB podem convergir, onde o aumento da expressão de p65/RELA leva a fosforilação de AKT na ausência de fatores estimuladores extracelulares, enquanto a superexpressão de IκBα reduz a fosforilação de AKT abaixo dos níveis basais (Meng et al., 2002).

No ameloblastoma o NFκB controla inúmeros processos celulares e participa na remodelação óssea, sendo ele um dos mais importantes fatores de transcrição para a osteoclastogênese. O RANKL um ativador do NFκB através do receptor RANK, presente na superfície dos osteoclastos, juntamente com a osteoprognerina, que também medeia a remodelação óssea, o qual se liga a RANKL interrompendo a interação RANKL-RANK, consequentemente inibindo a formação e atividade dos osteoclastos. Assim, a maturação e a atividade dos osteoclastos são reguladas por interações entre essas proteínas. O equilíbrio entre a sinalização RANK-RANKL e o nível de osteoprognerina tem implicações importantes para o crescimento e progressão do ameloblastoma, consequentemente a expressão destas proteínas pode prever o comportamento de algumas neoplasias odontogênicas (Tekkesin et al., 2011; Jhamb; Kramer, 2014; Capella, 2018).

Estudos mostram um maior número de células RANK e RANKL positivas no estroma de ameloblastomas sólidos/multicístico mostrando uma maior atividade de reabsorção óssea e dentária neste tipo de ameloblastoma quando comparado aos ameloblastomas unicísticos (Canto et al., 2016).

Outra proteína ativada pela via do NFkB é Ciclo-oxigenase 2 (COX2), presente nas células estromais do ameloblastoma (Hadi et al., 2022), sendo sua expressão correlacionada a expressão de β -catenina que também regula positivamente a secreção de MMPs que influenciam na proliferação e invasividade dos ameloblastomas (Cecim et al., 2014).

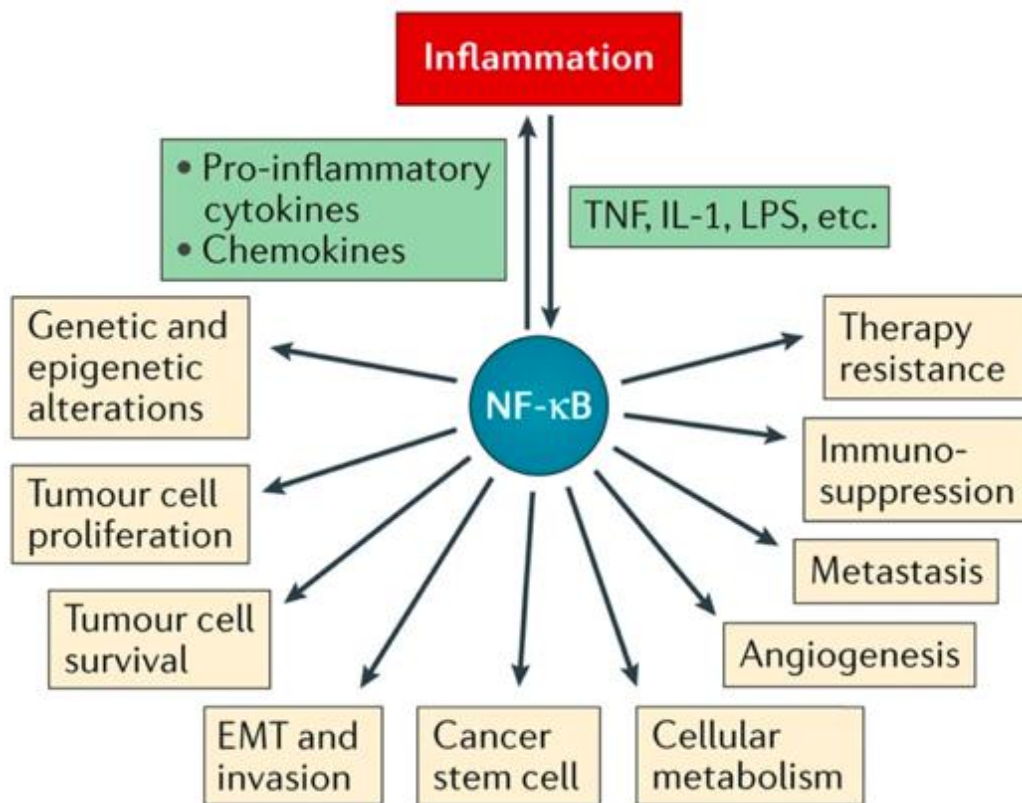
Sivakumar et al. (2020) relata em seu trabalho que a expressão de NFkB p65 foi encontrada mais predominantemente na camada externa do que na camada interna e que a imuno-expressão fica restrita a membrana celular do tipo cuboide ou de células colunares periféricas de ilhas ou cordões dos ameloblastomas. Não houve marcação nas células centrais (semelhantes ao retículo estrelado) e nem nas células do estroma. Este trabalho foi comparando ameloblastomas plexiforme e foliculares onde houve diferença significativa entre os mesmos quanto a imuno-expressão de anti-NFkB p65, sendo a marcação positiva em 90% dos ameloblastomas plexiforme em relação a positividade de 30% dos ameloblastomas foliculares.

A ativação de NFkB está sempre presente no câncer (Figura 2.7), aumentando a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas, promovendo alterações genéticas e epigenéticas, alterações metabólicas celulares, transição epitélio-mesenquimal, invasão, angiogênese, metástase, resistência a terapia e a supressão da imunidade antitumoral (Taniguchi; Karin, 2018).

A principal contribuição do NFkB no desenvolvimento do câncer é através da indução e manutenção de um microambiente inflamatório crônico, porem outros efeitos são de igual importância. A atividade constante do NFkB nas células cancerosas promove a iniciação e o desenvolvimento do tumor, talvez por meio dos quatro mecanismos a seguir (Xia et al., 2014):

- estimula a proliferação celular e previne a apoptose;
- regula a angiogênese tumoral;
- promove metástase tumoral em diferentes níveis;
- remodela diretamente o metabolismo do tumor.

Figura 2.7 – Funções de NFκB no câncer



Fonte: Taniguchi e Karin (2018).

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo selecionou casos de ameloblastomas, pertencentes ao Serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP para realização de análise imuno-histoquímicas aos anticorpos das proteínas PTEN, mTOR e NFkB.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar histologicamente a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos das proteínas PTEN, mTOR e NFkB
- Correlacionar a expressão destes anticorpos entre si nos ameloblastomas.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Coletar as informações clínicas e demográficas dos casos incluídos para estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas determinadas pelo Comitê de Ética da FOU SP.

4.1 AMOSTRAGEM

Foram coletados blocos de parafina entre os anos de 2012 a 2020 com fragmentos de biópsias de ameloblastomas dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOU SP para realização das reações imuno-histoquímicas dos anticorpos das proteínas PTEN, mTOR e NFkB. Os blocos de parafina foram cortados e montados em lâminas de vidro para imunomarcagem com os anticorpos.

4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Biópsias cuja análise anatomopatológica confirmou o diagnóstico de ameloblastoma com presença de epitélio odontogênico suficiente para análise da expressão imuno-histoquímica dos anticorpos e possuíam informações clínicas básicas em suas fichas anatomopatológicas.

4.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas fornecidas na ocasião do envio da peça cirúrgica para análise relativas ao sexo, raça, idade e localização serão compiladas para efeitos estatísticos dos resultados e caracterização das amostras.

4.4 MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas determinadas pelo Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

4.4.1 Técnica de Imuno-Histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pela técnica da estreptavidina-biotina sendo os cortes submetidos aos anticorpos de anti-PTEN, anti-mTOR e anti-NFkB. Utilizando esta metodologia, os blocos de parafina contendo as biopsias foram efetuados cortes de 3 μm de espessura utilizando um micrótomo e os fragmentos fixados em lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano. A seguir os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, um a 60°C por 30 minutos e o outro a temperatura ambiente por 15 minutos. Dando sequência, os cortes são reidratados em álcool etílico com banhos de 3 minutos em cada concentração a seguir: álcool etílico absoluto, álcool etílico a 95%, 90%, 85%, e 80%.

Posteriormente a reidratação foi realizado a remoção do pigmento formólico através do banho em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (álcool etílico 95%) durante 5 minutos. A seguir os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos. Após a reidratação os cortes passaram para a recuperação antigênica.

Para a recuperação antigênica dos anticorpos PTEN e mTOR os cortes foram mergulhados em uma solução de ácido cítrico monoidratado 10 μ M pH 6,0 no banho Maria por 30 minutos a 95°C. Enquanto que para o anticorpo NFkB foi usado a solução de Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 9,0 em banho Maria por 30 minutos a 95°C.

Finalizado a recuperação antigênica os cortes foram imediatamente lavados em água corrente durante 10 minutos. A seguir realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena dos cortes efetuando dois banhos em uma solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol, na proporção de 1:1 (100 ml de cada) com duração de 15 minutos cada. Sequencialmente efetua-se a lavagem em água corrente por 5 minutos e a passagem em água destilada.

Para a etapa seguinte, a incubação do anticorpo primário, em câmara úmida, seguimos os padrões de diluição e tempo de incubação descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Anticorpos, diluição e tempo de incubação

<u>Anticorpo Cell Signaling Tec®</u>	<u>Diluição BSA</u>	<u>Tempo de Incubação</u>
PTEN(4.3)XP® Rabbit mAb #9188 Lote 6	1:100	18 horas a 4°C
PHOSPHO-mTOR (Ser2448)(49F9) Rabbit-mAb (IHC Specific) #2976 Lote 8	1:100	18 horas a 4°C
PHOSPHO-IKKα/β (Ser176)(16 A6) Rabbit mAb #2697 Lote 9	1:100	18 horas a 4°C

Fonte: O autor.

Após a incubação do anticorpo primário os cortes foram lavados em água destilada e submetidos a incubação do anticorpo secundário Dako EnVision+Dual Link-HR (DAKO, Carpinteria, CA, USA) durante 30 minutos, também em câmara úmida a temperatura ambiente. A seguir os cortes foram lavados em água destilada e revelados utilizando o sistema Dako liquid DAB + Substrate chromogen system (DAKO, Carpinteria, CA, USA) incubados em temperatura ambiente durante 10 minutos. Sequencialmente os cortes foram lavados em água destilada e realizado a contra-coloração com hematoxilina de Mayer (SIGMA-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil) durante 5 minutos.

Na sequência os cortes foram lavados em água corrente durante 5 minutos prosseguindo com a desidratação. Dando sequência os cortes foram levados a banhos em álcool etílico durante 3 minutos de duração em um gradiente de concentração crescente iniciando a 70% e sequencialmente 80%, 90%, 95%, álcool etílico absoluto e a seguir diafanizados em dois banhos em xilol durante 5 minutos cada.

Posteriormente as lâminas foram levadas ao aplicador de fita de polietileno Tissue-Tek® Automated Film Coverslipper (Sakura®, EUA) onde receberam a proteção sobre os cortes e a seguir foram colocadas para secar a temperatura ambiente. Finalizando as lâminas foram armazenadas em caixas porta-lâminas para futuras análises microscópicas.

4.5 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

O microscópio óptico (Axio Lab.A1® – Carl Zeiss Microscopy GmbH – Germany) foi usado para detectar e localizar a imunexpressão citoplasmática e nuclear positiva dos quatro anticorpos por um único observador na magnitude original de 100x. As reações imuno-histoquímicas foram analisadas qualitativamente, sendo cada uma das camadas do epitélio odontogênico avaliadas separadamente e posteriormente o epitélio como um todo, recebendo cada lâmina uma classificação final. As células foram consideradas positivas ou negativas para a imunexpressão. Todas as imunexpressões foram confirmadas com lâminas controle de carcinoma epidermóide (Apêndice B).

4.6 ATENDIMENTO ÀS NORMAS DE BIOÉTICA

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas determinadas pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, publicada em 12 de dezembro de 2012. O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo e aprovado sob parecer número 5.019.185 (Anexo A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 24 casos de ameloblastomas que seguiram os critérios de inclusão, cujas biopsias foram realizadas entre os anos de 2012 e 2020 dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP (Apêndice A).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A idade dos pacientes variou de 18 a 62 anos, com uma média de 32,6 anos e um desvio padrão de 12,7 anos, sendo 3 fichas (omisso) sem dados de data de nascimento. Em relação ao sexo, 15 (62,5%) eram do sexo feminino e 9 (37,5%) do sexo masculino. Com referência a raça, 15 (71,4%) eram brancos e 6 (28,6%) eram negros, sendo 3 fichas sem dados da raça (Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3).

Tabela 5.1 – Estatística descritiva da idade

Idade	
Média	32,6
Mediana	30
Desvio-padrão	12,7
Mínimo	18
Máximo	62

Fonte: O autor.

Tabela 5.2 – Estatística descritiva do sexo

Sexo	N	% do Total
Feminino	15	62,5%
Masculino	9	37,5%

Fonte: O autor.

Tabela 5.3 – Estatística descritiva da raça

Raça	N	% do Total
Branços	15	71,4%
Negros	6	28,6%

Fonte: O autor.

Nossos dados encontrados discordam com os dados da literatura referindo ao sexo e com tendência a igualdade na incidência de idade. Hendra et al. (2020) relata em uma meta análise uma discreta preferência masculina (53%) e o pico de incidência da idade na terceira década de vida. E também relata a necessidade de mais estudos epidemiológicos sobre a taxa de incidência de ameloblastoma, especialmente na Ásia e América, para determinar a incidência global de ameloblastoma com mais precisão.

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Descrevemos a seguir nossos resultados individuais e na sequência os resultados pareados.

5.2.1 PTEN

A expressão da proteína anti PTEN, a qual detecta níveis endógenos de PTEN total (PTEN longo, PTEN α e PTEN β) foram negativas na maioria dos casos. Sendo 17 (70,8%) casos negativos e 7 (29,2%) casos positivos observados (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Frequência de PTEN

PTEN	N	% do Total
+	7	29,2%
-	17	70,8%

Fonte: O autor.

Kukamoto e Ooya (2007) encontraram positividade para PTEN em células colunares ou cuboidais periféricas e algumas células poliédricas centrais. Células queratinizadas em ameloblastomas acantomatosos e células granulares em ameloblastomas de células granulares não exibiram expressão de PTEN. Os ameloblastomas de células basais mostraram reatividade em muitas células neoplásicas e nos casos dos ameloblastomas desmoplásicos algumas células neoplásicas vizinhas à membrana basal mostraram reação a expressão de PTEM.

Narayan et al. (2020) relatou que a expressão de PTEN estava diminuída em 17(85%) casos dos 20 examinados na parte epitelial dos ameloblastomas e comparando com o epitélio do germe dentário o resultado foi estatisticamente diferente.

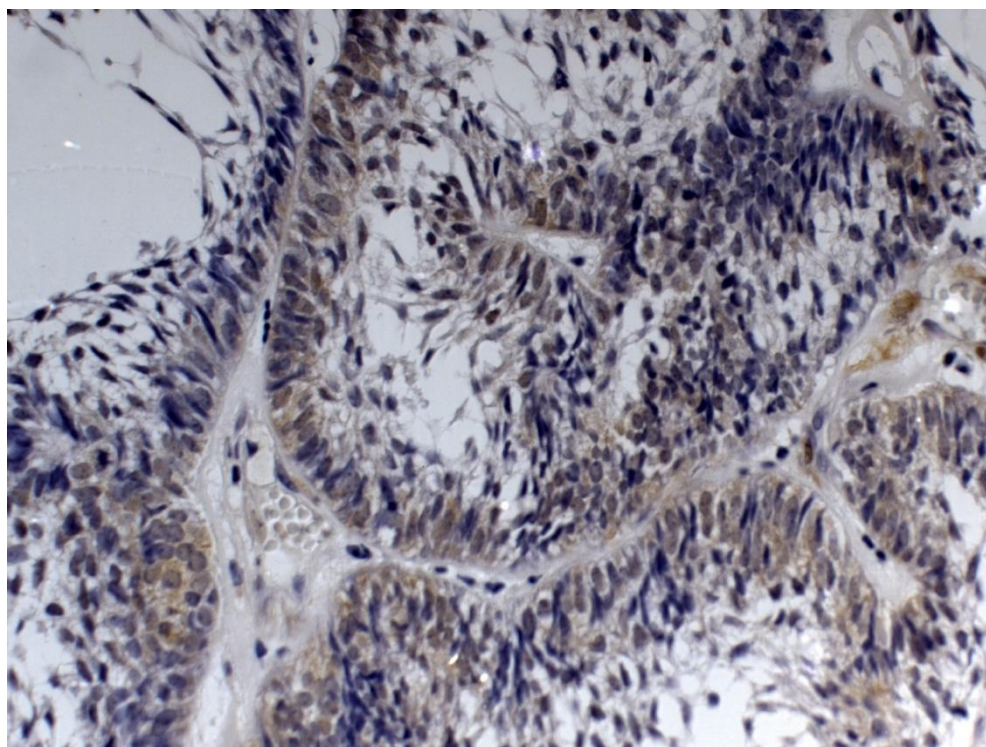
Lapthanasupkul (2020) em seu estudo imuno-histoquímico encontrou ausência de expressão de PTEN em 60% dos casos onde o promotor de PTEN estava metilado.

Em nossos casos as marcações ocorreram tanto nas células periféricas quanto nas células centrais (Figura 5.1) como nos achados de Kukamoto e Ooya (2007). E comparativamente a Laphthanasupkul (2020) e Narayan et al. (2020), cujas amostras demonstraram 85% e 65% respectivamente, em baixa expressão de PTEN, encontramos uma amostra intermediária de 70,8% de ausência de PTEN total nos casos examinados.

Scheper et al. (2008) relata em seus trabalhos que PTEN em sua forma estabilizada e fosforilada estava ausente em 83,3% dos 30 ameloblastomas estudados.

Nossos estudos corroboram com a literatura, onde a baixa expressão da proteína PTEN (em nossos casos PTEN longo, PTEN α e PTEN β) pode estar relacionada com a gênese do ameloblastoma, embora estudos mais aprofundados sejam necessários para demonstrar a exata participação de PTEN no ameloblastoma.

Figura 5.1 – Fotomicrografia da imunoexpressão de PTEN (100x)



Células coradas em marrom refletem a atividade de PTEN

Fonte: O autor.

5.2.2 mTOR

A expressão da proteína anti mTOR (Figura 5.2) a qual detecta níveis endógenos apenas quando fosforilado em Ser 2448 foram positivas em 50% (12) dos casos e negativa nos outros 50%(12) dos casos observados (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Frequência de mTOR

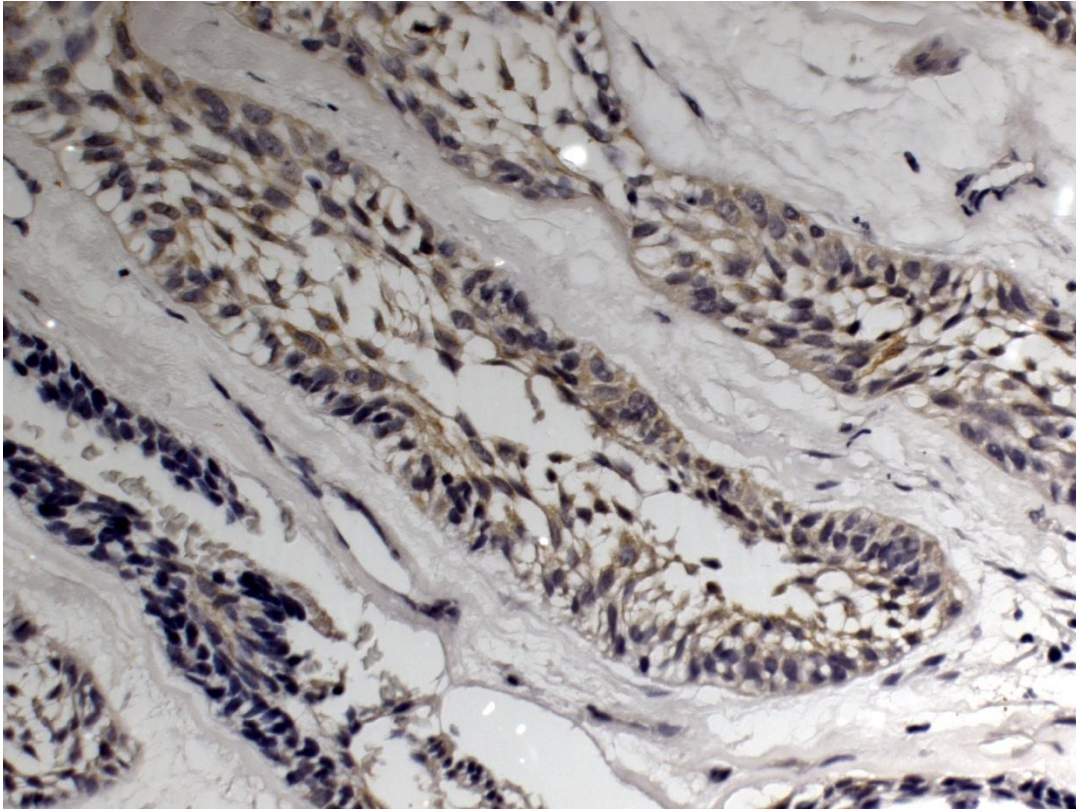
mTORN	% do Total
+	12	50%
-	12	50%

Fonte: O autor.

Em nossos casos as marcações ocorreram tanto nas células periféricas quanto nas células centrais e foram inferiores aos relatos da literatura, onde Scheper et al. (2008) encontraram 86,7% de marcação de p-S6K em 30 casos examinados. Li et al. (2012) relataram positividade da proteína mTOR em 88% das amostras de casos primários de ameloblastomas. Enquanto, Chaisuparat et al. (2013) relatam em um estudo 76% de marcação positiva para p-RPS6 e em outro trabalho uma marcação de 86% positiva para a expressão de p-S6K, que são proteínas a jusante da sinalização de mTOR.

A fosforilação de mTOR Ser 2448 é um marcador comum usado na literatura sobre câncer como um índice de atividade de mTOR quinase e sua via de sinalização, porém sua ativação esta associada somente ao mTORC1 sob certas condições e que a fosforilação em Ser 2448 não implica em um aumento de atividade de mTOR. Portanto as marcações a jusante de mTORC1 e mTORC2 relatam melhor a atividade de mTOR

Figura 5.2 – Fotomicrografia da imunexpressão de mTOR (100x)



Células coradas em marrom refletem a atividade de mTOR

Fonte: O autor.

5.2.3 NFkB

A expressão da proteína anti Phospho IKK α/β (Figura 5.3) a qual detecta níveis endógenos apenas quando fosforilado em IKK α na Ser 176/180 e IKK β na Ser 177/181 foram positivas em 50%(12) dos casos e negativa nos outros 50%(12) dos casos observados (Tabela 5.6).

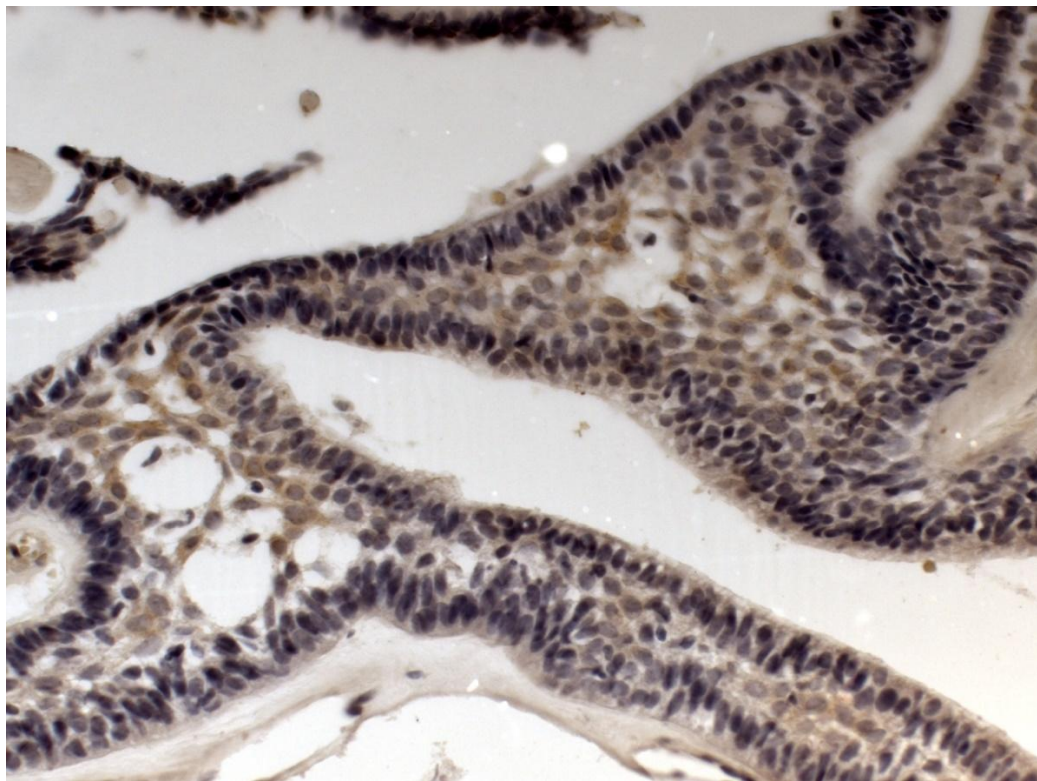
Tabela 5.6 – Frequência de NFkB

NFkB	N	% do Total
+	12	50%
-	12	50%

Fonte: O autor.

Em nossos casos as marcações ocorreram tanto nas células periféricas quanto nas células centrais e foram inferiores aos relatos da literatura, onde Sivakumar et al. (2020) relatam expressão positiva para NFkB p65 em 90% dos ameloblastomas tipo plexiforme e 30% dos ameloblastomas foliculares nos 20 casos examinados. Laifa et al. (2008) relata positividade para anti NFkB p65 em 83,3% (20 casos) em uma amostra de 24 casos, onde houve coloração positiva no citoplasma e núcleos das células. Relatando também que a expressão foi mais forte na camada externa do que nas células semelhantes ao retículo estrelado nos ameloblastomas tipo folicular e basaloides.

Figura 5.3 – Fotomicrografia da imunexpressão de NFkB (100x)



Células coradas em marrom refletem a atividade de NFkB

Fonte: O autor.

Nossos resultados não apresentaram correlação estatisticamente significativa entre as expressões positivas e negativas correlacionando as proteínas entre si. Os resultados de maior expressão foram encontrados quando PTEN estava com imunoexpressão negativa, quando correlacionando as três proteínas entre si, onde obtemos valores iguais a 20,8% das amostras, equivalente a 5 casos, tanto para mTOR e NFkB positivos, quanto para mTOR positivo e NFkB negativo (Tabela 5.7). O resultado de menor valor equivale a 4,2% das amostras, referente a 1 caso, onde PTEN tem imunoexpressão positiva e mTOR e NFkB tem imunoexpressões negativas. A imunoexpressão positiva entre todas as proteínas quantificaram 2 casos, equivalente a 8,3% do total e a imunoexpressão negativa entre todas as proteínas apresentaram 4 casos, equivalente a 16,7% do total.

Tabela 5.7 – Frequência entre PTEN, mTOR e NFkB

PTEN	mTOR	NFkB	Contagem	% do Total
+	+	+	2	8,3%
+	+	-	2	8,3%
+	-	+	2	8,3%
+	-	-	1	4,2%
-	+	+	3	12,5%
-	+	-	5	20,8%
-	-	+	5	20,8%
-	-	-	4	16,7%

Fonte: O autor.

Correlacionando as proteínas aos pares os maiores valores para a imunoexpressão negativa encontrados foram de 37,5% das amostras, equivalente a 9 casos, demonstrados entre PTEN e NFkB negativos e também em PTEN e mTOR negativos (Tabelas 5.8 e 5.9).

Correlacionando as proteínas aos pares o maior valor para a imunopositividade encontrada foi de 20,8% das amostras, equivalente a 5 casos, demonstrado entre mTOR e NFkB positivos (Tabela 5.10).

No caso da correlação entre proteínas positivas e negativas entre si, o maior valor encontrado foi 33,3% das amostras, equivalente a 8 casos de cada correlação, demonstrados entre PTEN negativo e NFkB positivo e também PTEN negativo e mTOR positivo (Tabelas 5.8 e 5.9).

Tabela 5.8 – Frequência entre PTEN e NFkB

PTEN	NFkB	Contagens	% do Total
+	+	4	16,7%
+	-	3	12,5%
-	+	8	33,3%
-	-	9	37,5%

Fonte: O autor.

Tabela 5.9 – Frequência entre PTEN e mTOR

PTEN	mTOR	Contagens	% do Total
+	+	4	16,7%
+	-	3	12,5%
-	+	8	33,3%
-	-	9	37,5%

Fonte: O autor.

Tabela 5.10 – Frequência entre mTOR e NFkB

mTOR	NFkB	Contagens	% do Total
+	+	5	20,8%
+	-	7	29,2%
-	+	7	29,2%
-	-	5	20,8%

Fonte: O autor.

Usando o software Jamovi versão 2.3.16 (Jamovi.org-Brasil) para cálculo estatístico do Qui-Quadrado entre as imunoexpressões das proteínas obtivemos valores de p maiores que 0,05, portanto nossos resultados não são estatisticamente significativos, provavelmente devido ao tamanho da amostra de somente 24 casos (Tabelas 5.11, 5.12 e 5.13).

Tabela 5.11 – Análise estatística entre PTEN e mTOR (Qui-Quadrado)

		mTOR		Total
PTEN		+	-	
+	Observado	4	3	7
	% do total	16,7%	12,5%	29,2%
-	Observado	8	9	17
	% do total	33,3%	37,5%	70,8%
Total	Observado	12	12	24
	% do total	50 %	50%	100%

	Valor	gl	p
X²	0.202	1	0.653
N	24		

Fonte: O autor.

Tabela 5.12 – Análise estatística entre mTOR e NFkB (Qui-Quadrado)

		NFkB		Total
		+	-	
mTOR				
+	Observado	5	7	12
	% do total	20,8%	29,2%	50%
-	Observado	7	5	12
	% do total	29,2%	20,8%	50%
Total	Observado	12	12	24
	% do total	50 %	50%	100%

	Valor	gl	p
X^2	0.667	1	0.414
N	24		

Fonte: O autor.

Tabela 5.13 – Análise estatística entre PTEN e NFkB (Qui-Quadrado)

		NFkB		Total
		+	-	
PTEN				
+	Observado	4	3	7
	% do total	16,7%	12,5%	29,2%
-	Observado	8	9	17
	% do total	33,3%	37,5%	70,8%
Total	Observado	12	12	24
	% do total	50 %	50%	100%

	Valor	gl	p
X^2	0.202	1	0.653
N	24		

Fonte: O autor.

6 CONCLUSÃO

A imunexpressão da proteína anti PTEN está ausente em 70,8% das amostras examinadas conferindo com a tendência dos estudos da literatura global.

A imunexpressão da proteína anti mTOR (Ser 2448) presente em 50% das amostras não representa um valor total do mTOR ativo nas células, pois este não demonstra a atividade do mTORC2. Portanto os estudos da literatura demonstram taxas mais elevadas de mTOR, as quais foram pesquisadas com proteínas a jusante de mTOR.

A imunexpressão da proteína anti IKK $\alpha\beta$ presente em 50% das amostra demonstra a tendência dos estudos presentes na literatura apresentada.

Correlacionando as proteínas aos pares concluímos que não existe associação significativa entre as amostras estatisticamente.

Os dados de idade, raça e sexo coletados refletem somente a incidência das nossas amostras e tendem a igualdade apenas na incidência de idade na epidemiologia do ameloblastoma mundial.

REFERÊNCIAS¹

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7455-64. doi: 10.1038/sj.onc.1209085.

Álvarez-García V, Tawil Y, Wise HM, Leslie NR. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol*. 2019 Dec;59:66-79. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.

Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Oct 31;10(11):868-80. doi: 10.1038/nrd3531.

Bologna-Molina R, Bedoya-Borella AM, Soria-Moreira L, Soría-Suárez S. Molecular biomarkers of cell proliferation in ameloblastomas. *World J Stomatol*. 2013 Nov;2(4):79-85. doi: doi:10.5321/wjs.v2.i4.79.

Canto AM, Rozatto JR, Schussel JL, de Freitas RR, Hasséus B, Braz-Silva PH. Immunohistochemical biomarkers in ameloblastomas. *Acta Odontol Scand*. 2016 Nov;74(8):585-90. doi: 10.1080/00016357.2016.1224918.

Capella DL. Estudo do RANK L, OPG, IL-6 e CTSK em cistos radiculares, ceratocistos odontogênicos e ameloblastomas [tese]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde; 2018.

Cecim RL, Carmo HA, Kataoka MS, Freitas VM, de Melo Alves Júnior S, Pedreira EN, et al. Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. *J Oral Pathol Med*. 2014 Feb;43(2):143-7. doi: 10.1111/jop.12103.

Chaisuparat R, Yodsanga S, Montaner S, Jham BC. Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Sep;116(3):336-42. doi: 10.1016/j.oooo.2013.06.013.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Giudice FS. Análise da expressão das proteínas Akt, NF- κ B & Ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009. doi:10.11606/D.23.2009.tde-29092009-081311.

Hadi S, Porjo LA, Sandra F. Mechanism and potential therapy in ameloblastoma: akt signaling pathway. *Indones Biomed J.* 2022;14(1):1-10. doi: 10.18585/inabj.v14i1.1824.

Hendra FN, Van Cann EM, Helder MN, Ruslin M, de Visscher JG, Forouzanfar T, et al. Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2020 Jan;26(1):12-21. doi: 10.1111/odi.13031.

Jhamb T, Kramer JM. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: implications for therapeutics. *Exp Mol Pathol.* 2014 Dec;97(3):345-53. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.001.

Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K, and PTEN in ameloblastic tumors. *Oral Dis.* 2007 Sep;13(5):461-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01321.x.

Laifa H, Shintaro K, Daigo Y, Ferry S, Takeshi M, Yu N, et al. An anti-apoptotic role of NF- κ B in TNF α -induced apoptosis in an ameloblastoma cell line. *Oral Sci Int.* 2008 Nov;5(2):96-103. doi: 10.1016/S1348-8643(08)80013-4.

Lapthanasupkul P, Klongnoi B, Mutirangura A, Kitkumthorn N. Investigation of PTEN promoter methylation in ameloblastoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020 Jul 1;25(4):e481-e487. doi: 10.4317/medoral.23498.

Li N, Sui J, Liu H, Zhong M, Zhang M, Wang Y, et al. Expression of phosphorylated Akt/mTOR and clinical significance in human ameloblastoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Apr 15;8(4):5236-44.

Li N, Zhong M, Song M. Expression of phosphorylated mTOR and its regulatory protein is related to biological behaviors of ameloblastoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(7):660-7.

Martins FM. Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da via PI3K-AKT-mTOR em displasias epiteliais, lesões irritativas e carcinomas espinocelulares [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2013. doi:10.11606/T.23.2013.tde-10092013-191441.

Matsumoto CS, Almeida LO, Guimarães DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42393-407. doi: 10.18632/oncotarget.9877.

Meng F, Liu L, Chin PC, D'Mello SR. Akt is a downstream target of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):29674-80. doi: 10.1074/jbc.M112464200.

Narayan B, Urs AB, Augustine J, Singh H. Role of phosphatase and tensin homolog in pathogenesis of ameloblastoma: An immunohistochemical study. *J Cancer Res Ther*. 2020 Apr-Jun;16(3):513-6. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_528_18.

Neville BW, Allen CM, Damm DD. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Nottingham LK, Yan CH, Yang X, Si H, Coupar J, Bian Y, et al. Aberrant IKK α and IKK β cooperatively activate NF- κ B and induce EGFR/AP1 signaling to promote survival and migration of head and neck cancer. *Oncogene*. 2014 Feb 27;33(9):1135-47. doi: 10.1038/onc.2013.49.

Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci*. 2008 Feb 1;121(Pt 3):249-53. doi: 10.1242/jcs.022459.

Pulino BFB. Expressão imuno-histoquímica da beta-catenina, p-Akt, CD44 e vimentina nos ameloblastomas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. doi:10.11606/D.23.2013.tde-17102013-200337.

Rosner M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids*. 2010 Jan;38(1):223-8. doi: 10.1007/s00726-008-0230-7.

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-76. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004. Erratum in: *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-71.

Scheper MA, Chaisuparat R, Nikitakis NG, Sauk JJ. Expression and alterations of the PTEN / AKT / mTOR pathway in ameloblastomas. *Oral Dis.* 2008 Sep;14(6):561-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01421.x.

Sivakumar M, Yoithapprabhunath TR, Nirmal RM, Veeravarmal V, Dineshshankar J, Amsaveni R. Immunohistochemical analysis of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) between follicular and plexiform ameloblastomas: a pilot study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020 Sep-Dec;24(3):466-71. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_150_20.

Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci.* 2007 Dec 1;120(Pt 23):4071-9. doi: 10.1242/jcs.015230.

Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018 May;18(5):309-24. doi: 10.1038/nri.2017.142.

Tekkesin MS, Mutlu S, Olgac V. The role of RANK/RANKL/OPG signalling pathways in osteoclastogenesis in odontogenic keratocysts, radicular cysts, and ameloblastomas. *Head Neck Pathol.* 2011 Sep;5(3):248-53. doi: 10.1007/s12105-011-0271-1.

Tian T, Li X, Zhang J. mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 11;20(3):755. doi: 10.3390/ijms20030755.

Tolentino ES. Nova classificação da OMS para tumores odontogênicos: o que mudou? *RFO UPF.* 2018;23(1):119-23.

Vered M, Wright JM. Update from the 5th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head Neck Pathol.* 2022 Mar;16(1):63-75. doi: 10.1007/s12105-021-01404-7.

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.

Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res.* 2014 Sep;2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.

APÊNDICE A – Tabela de dados das amostras

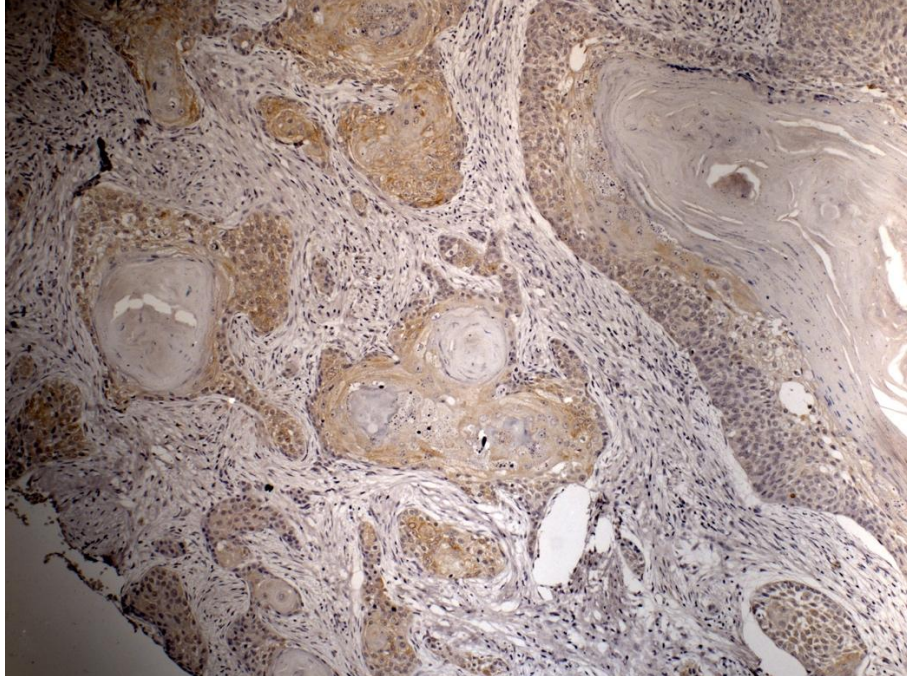
	PTEN	MTOR	NFkB	sexo	idade	raça	local
1	+	+	+	F	32	B	M
2	+	-	+	F	25	B	M
3	-	+	-	M	18	B	M
4	+	+	+	F	49	N	M
5	-	-	-	M	47	B	M
6	+	+	-	F	39	B	M
7	-	+	+	M	28	N	MX
8	-	-	+	M	27	B	M
9	-	-	+	F	31	B	M
10	-	-	-	F	27	B	M
11	-	+	+	M	18	N	M
12	-	-	-	F	23	B	M
13	-	-	+	F	20	N	M
14	-	+	-	M	30	N	M
15	+	+	-	M	31		M
16	+	-	-	F			M
17	+	-	+	F		B	M
18	-	+	-	F	61	N	M
19	-	-	+	F	24	B	M
20	-	+	-	M	38	B	M
21	-	-	+	F	30	B	M
22	-	-	-	M	24		M
23	-	+	+	F	62	B	M
24	-	+	-	F		B	M

Fonte: O autor. Utilizado o Software Jamovi 2.3.16.

Legenda - F - Feminino
M - Masculino
B – Branco
N – Negro
M - Mandíbula
MX - Maxila

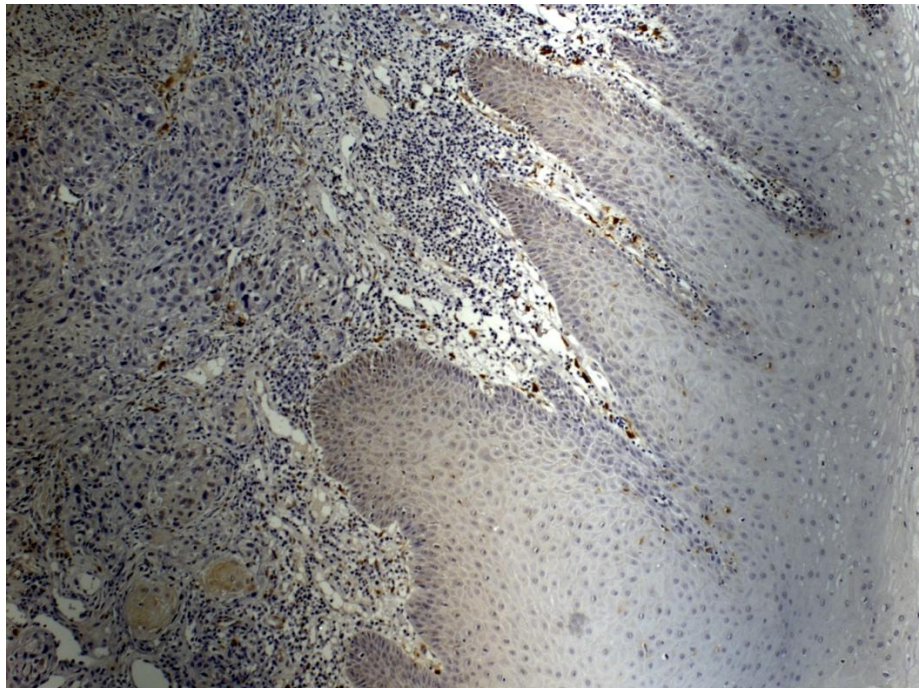
APÊNDICE B - Lâminas controle de imunexpressão

Fotomicrografia carcinoma epidermóide com imunexpressão de mTOR



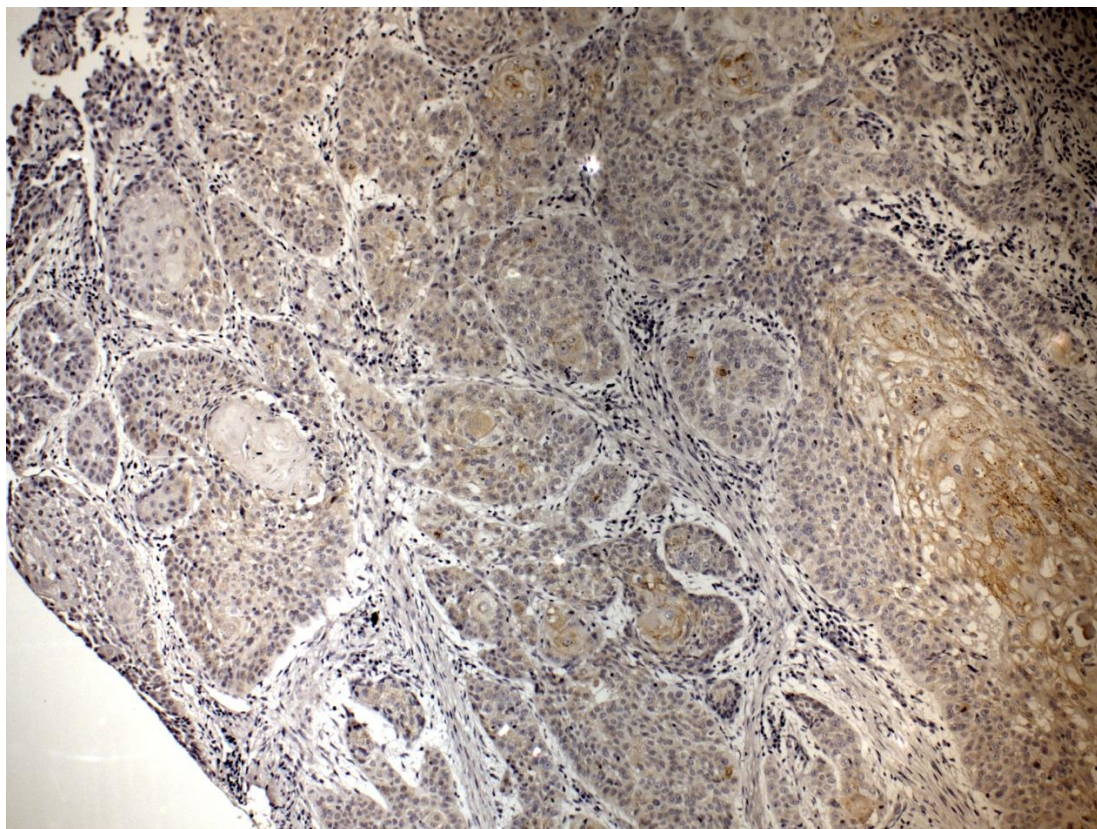
Fonte: O autor Células coradas em marrom refletem a atividade de mTOR

Fotomicrografia carcinoma epidermóide com imunexpressão de PTEN



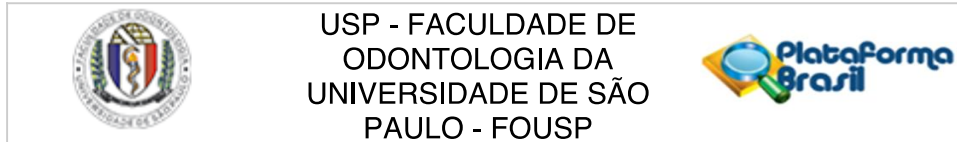
Fonte: O autor. Células coradas em marrom refletem a atividade de PTEN

Fotomicrografia carcinoma epidermóide com imunoexpressão de NFkB



Fonte: O autor. Células coradas em marrom refletem a atividade de NFkB

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da expressão dos marcadores AKT, PTEN, NFkB e mTOR em ameloblastomas

Pesquisador: RAMON RIBEIRO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47958721.3.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.019.185

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo realização de análise imuno-histoquímicas aos anticorpos das proteínas AKT, mTOR, PTEN e NFkB, nos casos de ameloblastomas, pertencentes ao Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), afim de identificar e correlacionar o comportamento biológico dos ameloblastomas referente a proliferação, invasão, adesão e apoptose celular com os biomarcadores.

Objetivo da Pesquisa:

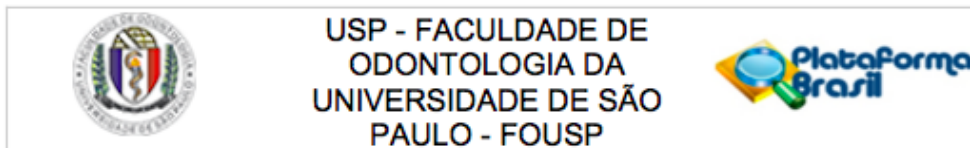
Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo selecionar 40 casos de ameloblastomas, pertencentes ao Serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP para realização de análise imuno-histoquímicas aos anticorpos das proteínas AKT, mTOR, PTEN e NFkB.

Objetivo Secundário:

Objetivos Específicos: 1) Correlacionar o comportamento biológico dos ameloblastomas com os biomarcadores e o crescimento invasivo tumoral. 2) Atualizar informações para diagnóstico, comportamento clínico, tratamento e pesquisa dos ameloblastomas. 3) Avaliação destes

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: 5.019.185

biomarcadores nos ameloblastomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Será utilizado arquivo do serviço de anatomia patológica. Não haverá seleção presencial de pacientes e os dados são sigilosos, os riscos são mínimos, pois trata-se de material biológico já coletado e cedido pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP não trazendo para a pesquisa dados pessoais que possam identificar os cedentes, diminuindo assim, sensivelmente, uma identificação acidental.

Benefícios:

O estudo irá correlacionar o comportamento das proteínas com o crescimento invasivo tumoral no intuito de relacionar futuros medicamentos para o tratamento químico dos ameloblastomas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto e os documentos foram reformulados adequadamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentada Folha de rosto assinada pelo pesquisador e pelo senhor Diretor. Projeto de pesquisa completo. Cronograma está de acordo com as recomendações da CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os documentos foram reformulados adequadamente. Não existem impedimentos éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

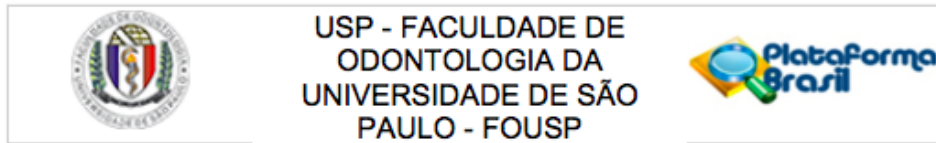
Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d.

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).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

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: 5.019.185

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1630227.pdf	16/09/2021 14:48:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	plataformabrasil3ramonribeiro.docx	15/09/2021 16:15:25	RAMON RIBEIRO	Aceito
Outros	cartaresposta2pendenciasCAAE47958721.docx	15/09/2021 16:14:10	RAMON RIBEIRO	Aceito
Outros	cartaacervo.docx	16/07/2021 11:52:49	RAMON RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoramonribeiro.pdf	11/06/2021 14:20:07	RAMON RIBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Outubro 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