

Kamile Leonardi Dutra

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES
DE MATRIZ -1, -2 E -9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS E
Ki-67 EM AMELOBLASTOMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia – Área de concentração Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elena Riet Correa Rivero

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

A large empty rectangular box with a thin black border, occupying the lower half of the page. It is positioned centrally below the text and appears to be a placeholder for a barcode or other identifying information.

Kamile Leonardi Dutra

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES
DE MATRIZ -1, -2 E -9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS E
Ki-67 EM AMELOBLASTOMA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia – Área de Concentração Diagnóstico Bucal” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 06 de Fevereiro de 2014.

Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Alessandra Camargo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Manoela Domingues Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

À minha mãe Iara, minha grande guerreira, que sempre luta junto a mim. Tua aprovação e teu sorriso de orgulho são o mais importante. Essa conquista é nossa, TE AMO!

Ao meu gatinho, Matheus, sempre ao meu lado, apoiando e vibrando a cada passo. O real significado de companheirismo eu descobri contigo neste último ano, obrigada, te amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos anjos por me abençoarem a cada dia. E por me carregarem no colo nos dias mais difíceis, iluminando meu caminho. Amém!

À Prof. Dra. Elena, minha orientadora e amiga, que sempre fez questão de frisar o relacionamento de amizade acima de tudo. Mesmo longe fisicamente, sempre se fez presente, e nunca deixou faltar nenhum auxílio. Um exemplo de profissional, e de que com determinação e amor ao que fazemos o caminho do sucesso pode ser alcançado. Foi uma honra ter sido orientada por ti, obrigada por ter enxergado e acreditado em meu potencial!

À minha coorientadora, Prof^a Mabel Cordeiro, pelo auxílio e ajustes fundamentais realizados neste trabalho. Muito obrigada pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Filipe Modolo, que com muita paciência e competência me acompanhou nas rotinas do LPB. Você me ajudou demais na ausência da minha orientadora. Foi um aprendizado muito grande poder trabalhar contigo. Obrigada!

A todos os mestres do departamento de patologia da UFSC, somando os professores ainda não citados: Maria Inês Meurer, Liliane J. Grando, Filipe Daniel, Rodrigo O. A. de Lima, e também ao Felipe Daltoé que permaneceu um ano conosco. Vocês formam uma equipe sensacional, com uma inteligência admirável e incrível humildade em transmitir o conhecimento.

Aos professores do Ambulatório de Estomatologia/HU: Aira Bonfim, Alessandra Camargo, Etiene Munhoz, Inês Beatriz Rath, Sônia Maria Fabro, e toda sua equipe de profissionais voluntários e alunos, os quais realizam um serviço único de atendimento aos pacientes, com excepcional competência profissional aliada a indescritível sensibilidade humana.

Ao Prof. Dr. João Luiz Dorneles Bastos pela ajuda na análise estatística.

Às minhas colegas de mestrado, novas amigas deixam o caminho a ser trilhado mais leve.

À minha querida amiga Grasi, pela ajuda na realização deste trabalho.

À minha companheira de laboratório, Soraia Alves, conversas e risos faziam o tempo de procedimentos da imunoistoquímica passar mais rápido.

Aos bolsistas do LPB/UFSC, Fábio, Suzi e Elis, sempre atentos auxiliando no que era preciso.

À CAPES, pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste mestrado, bem como, a PRPG e UFSC pelo fornecimento do material necessário a esta pesquisa.

À minha família: Pai, Mana, Dir, Ilmor, Paulo, Celso, Rose... É o carinho de vocês que alimenta minha alma, e me encoraja a seguir em frente. Obrigada por existirem!

“Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

(Fernando Pessoa, 2005)

RESUMO

O ameloblastoma (AM) é um tumor odontogênico benigno que, apesar de apresentar crescimento lento, é localmente agressivo devido ao seu crescimento infiltrativo, o que resulta em alta taxa de recidiva quando não removido adequadamente. O objetivo deste estudo foi contribuir para um melhor entendimento sobre os mecanismos de invasão do AM, por meio da avaliação imunistoquímica da expressão das metaloproteinases de matriz 1, 2 e 9, da presença de miofibroblastos (MF) e do índice de proliferação celular (Ki-67). A amostra foi composta por treze casos de ameloblastoma sólido (AS), cinco casos de ameloblastoma unicístico (AU) e oito casos de folículos pericoronários (FP), como amostra de tecido odontogênico não neoplásico. O teste estatístico de Kruskal-Wallis mostrou diferença estatística para as MMP-1 e -2 no epitélio, cuja expressão foi menor em AS, quando comparado a AU e FP. A expressão de MMP-9 no estroma foi significativamente maior em FP, quando comparado a AS e AU. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a expressão de MMP 1, 2 e 9, presença de MF e Ki-67 foi semelhante em AM e FP, o que demonstra uma intensa atividade de remodelação tecidual em todos os grupos, não sendo, portanto, o FP um tecido quiescente como o esperado.

Palavras-chave: Metaloproteinases de Matriz. Miofibroblastos. Proliferação celular. Tumores odontogênicos. Ameloblastoma.

ABSTRACT

Ameloblastoma (AM) is a benign but locally invasive odontogenic tumour, characterized by a slow infiltrative growth pattern with a high recurrence index. To better understand the interaction between tumor cells and the stroma, the present study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2 and -9), the cellular proliferation index (Ki-67), and the presence of myofibroblasts (MF) in AM. Thirteen cases of solid ameloblastoma (SA) and five cases of unicystic ameloblastoma (UA) were selected for an immunohistochemical investigation of the proteins MMP-1, MMP-2, MMP-9, Ki-67 and α -smooth muscle actin (α -SMA) in MF. Eight samples of pericoronal follicles (PF) were included as a normal odontogenic tissue control. Kruskal-Wallis test showed statistically significant differences in the epithelial expression of MMP-1 and 2, with lower expression in SA when compared to UA and PF. Higher stromal expression of MMP-9 was found in PF, comparing to SA and UA. These results suggest that the proliferative activity, the presence of myofibroblasts and the production of matrix metalloproteinase 1, 2 and 9 were similar in AM and PF, showing an intense activity of tissue remodeling in all groups not being the PF a quiescent tissue as expected.

Keywords: Matrix Metalloproteinase-1. Matrix Metalloproteinase-2. Matrix Metalloproteinase-9. Myofibroblasts. Cell proliferation. Odontogenic tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise histopatológica e imunoistoquímica do ameloblastoma sólido.....	55
Figura 2 – Análise histopatológica e imunoistoquímica do ameloblastoma unicístico.....	57
Figura 3 – Análise histopatológica e imunoistoquímica do folículo pericoronário.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Anticorpos utilizados.....	46
--------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio-padrão dos 3 grupos	61
Tabela 2 – Valores da média e desvio-padrão para cada caso.....	75
Tabela 3 – Características clínicas e radiográficas.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Ameloblastoma
AS – Ameloblastoma sólido
AU – Ameloblastoma unicístico
CEPSH – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
DAB – Diaminobenzidina
DP – Desvio-padrão
DPM – Desvio-padrão da média
FP – Folículo pericoronário
G - Grupo
HE – Hematoxilina e Eosina
HU – Hospital Universitário
IgG – Imunoglobulina G
kDa – Unidade de massa atômica ou Dalton
Ki-67 – Proteína não-histona de proliferação celular
LPB – Laboratório de Patologia Bucal
M – Molar
MEC – Matriz extracelular
MF – Miofibroblastos
MMP – Metaloproteinase de matriz
MT-MMP – Metaloproteinase de matriz ligadas à membrana
OMS – Organização mundial da saúde
p – Valor de Significância
PBS – Tampão Fosfato Salina
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH – Potencial Hidrogênico
r – Coeficiente de correlação
RT- PCR – Reação em cadeia da polimerase após conversão pela transcriptase reversa
SAP – Serviço de Anatomia Patológica
TA – Temperatura ambiente
TGF – $\beta 1$ – Fator de crescimento tumoral $\beta 1$
TIMPs – Inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz
TO – Tumores odontogênicos
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
 α -SMA – Alfa actina de músculo liso
 μm – Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Alfa

% - Por cento

°C – Graus Celsius

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	TUMORES ODONTOGÊNICOS.....	29
1.2	AMELOBLASTOMA.....	29
1.3	METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	32
1.4	MIOFIBROBLASTOS.....	35
1.5	ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (Ki-67).....	36
1.6	FOLÍCULO PERICORONÁRIO.....	37
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	ARTIGO.....	43
	REFERÊNCIA.....	63
	APÊNDICES.....	69
	ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUMORES ODONTOGÊNICOS

Os tumores odontogênicos (TOs) compreendem um grupo complexo de lesões heterogêneas com comportamento clínico e tipo histológico diversos. Variam de lesões com crescimento limitado, hamartomas, a neoplasias benignas e malignas (Fregnani *et al.*, 2010). São exclusivos dos ossos gnáticos e derivam de interações indutivas entre os tecidos odontogênicos, sendo formados por epitélio, ectomesênquima ou ambos. A etiologia dos TOs é desconhecida e a maioria parece desenvolver-se *de novo*, sem aparente fator causal (Philipsen *et al.*, 2005a; Neville *et al.*, 2009).

Os TOs são raros e levantamentos epidemiológicos mostram uma variada frequência destes, o que é justificado por fatores geográficos, étnicos e socioeconômicos (Fregnani *et al.*, 2010), ou ainda devido a diferentes fontes de dados utilizadas (Neville *et al.*, 2009). No Brasil, estudos reportam que a prevalência de TOs varia entre 2,4% (Santos *et al.*, 2011) a 6,8% (Sousa *et al.*, 2002) de todas as lesões orais diagnosticadas. No estado de Santa Catarina, um estudo recente desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) revelou uma prevalência de 3% de TOs em todas as lesões orais diagnosticadas (Ramos *et al.*, 2014).

A classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), “*WHO Classification of Tumours – Head and Neck Tumours*” classifica os TOs em benignos, malignos e não neoplásicos, levando em consideração o comportamento da lesão (Philipsen *et al.*, 2005b). Dentre os tumores benignos, um dos mais frequentes e significativo é o AM, representando entre 13 a 58% de todos os TOs (Gardner *et al.*, 2005; Philipsen *et al.*, 2005b).

1.2 AMELOBLASTOMA

O AM é definido pela OMS como uma neoplasia benigna de origem epitelial, com estroma fibroso e maduro, não havendo a presença de ectomesênquima odontogênico (Barnes *et al.*, 2005). Pode surgir dos restos da lâmina dentária, de um órgão do esmalte em desenvolvimento, do revestimento epitelial de um cisto odontogênico ou das células basais da mucosa (Neville *et al.*, 2009), e sua etiologia não é definida. Acredita-se que a desregulação de diversos genes envolvidos no

desenvolvimento normal de um dente podem fazer parte da sua patogênese (Gardner *et al.*, 2005).

De acordo com a Classificação da OMS de 2005 o AM ocorre em quatro situações clínico-radiográficas distintas: sólido/multicístico (AS), unicístico (AU), desmoplásico e extra-ósseo/periférico (Gardner *et al.*, 2005).

Embora raro, o AM é o segundo TO mais comum, representando 13 a 58% de todos os casos (Gardner *et al.*, 2005; Philipsen *et al.*, 2005a). Entre os TOs diagnosticados em dois Laboratórios de Anatomopatologia da UFSC, o AM foi a segunda lesão mais frequente representando 23% de todos os casos diagnosticados (61% AS e 39% AU) (Ramos *et al.*, 2014). Não apresenta predileção por sexo, acometendo igualmente homens e mulheres.

O AS representa a maioria dos casos (Reichart, Philipsen e Sonner, 1995; Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010), e tende a ser o mais agressivo com maior probabilidade de recorrência após o tratamento cirúrgico. Possui crescimento lento, é localmente invasivo, porém sem tendência à metástase (Gardner *et al.*, 2005). As células tumorais do AS infiltram os espaços medulares do osso esponjoso antes que a reabsorção óssea seja visível na radiografia, fato que justifica as altas taxas de recorrências (Neville *et al.*, 2009), essa invasão pode avançar reabsorvendo as corticais ósseas (Fregnani *et al.*, 2010).

O AU é uma variante do AM que se apresenta como um cisto e representa entre 5 a 15% de todos os casos (Gardner *et al.*, 2005). É uma lesão expansiva, porém usualmente não infiltra osso adjacente (Rosenstein *et al.*, 2001; Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009).

O AM desmoplásico possui imagem clínica e características histológicas específicas, e sua relação para o AS é de 1:5,4 casos (Gardner *et al.*, 2005).

O AM extra-ósseo/periférico é o correspondente extra-ósseo do AS, compreende entre 1,3 a 10% dos casos (Gardner *et al.*, 2005).

Clinicamente, o AM possui localização preferencial em corpo e ramo ascendente de mandíbula (Reichart, Philipsen e Sonner, 1995; Philipsen e Reichart, 1998; Rosenstein *et al.*, 2001; Gardner *et al.*, 2005; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010). A maioria dos casos de AS é diagnosticado entre os 30 e os 60 anos, sendo raro abaixo dos 20 anos. Já a idade média para o AU é significativamente menor, sendo de 16 anos em casos associados com um dente não-erupcionado e de 35 anos na ausência deste (Gardner *et al.*, 2005).

Radiograficamente, o AS pode apresentar-se como uma radiolucidez unilocular ou multilocular (Gardner *et al.*, 2005). O quadro mais típico é uma lesão radiolúcida multilocular, com aspecto descrito como “bolhas de sabão” ou “favos de mel”, dependendo do tamanho das lojas ósseas em seu interior (Neville *et al.*, 2009). O AU manifesta-se como uma lesão radiolúcida unilocular bem definida (Philipsen e Reichart, 1998; Reichart e Phillipsen, 2004; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009).

O envolvimento de dentes retidos no tumor é encontrado em 72% dos casos de AS, e entre 50 a 80% dos casos de AU, configurando diagnóstico diferencial com outras lesões císticas, como o cisto dentífero (Reichart, Philipsen e Sonner, 1995) e cisto radicular ou residual, dependendo do posicionamento (Neville *et al.*, 2009).

Histologicamente, vários subtipos do AS são conhecidos, porém esta variação não interfere no comportamento clínico da lesão. Os AS folicular e plexiforme são os mais comuns (Reichart, Philipsen e Sonner, 1995; Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009).

O AS folicular compreende ilhotas de epitélio odontogênico que lembram o epitélio do órgão do esmalte, dispersas em um estroma de tecido conjuntivo fibroso. As células periféricas são morfologicamente colunares, alongadas e alinhadas em uma única camada dispostas em paliçada, com núcleos hipercromáticos em polaridade invertida, lembrando os ameloblastos. As células centrais podem se arranjar frouxamente, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte (Gardner *et al.*, 2005).

O AS plexiforme é formado por extensos cordões de epitélio odontogênico anastomosados. Também possuem células periféricas que lembram ameloblastos e células centrais arranjadas frouxamente (Gardner *et al.*, 2005).

Para o AU são consideradas duas variantes histopatológicas: luminal e mural. A variante luminal é uma lesão cística revestida parcial ou totalmente por epitélio ameloblastomoso. As células epiteliais basais são cilíndricas ou colunares, arranjadas em paliçada com polarização nuclear invertida e as células suprajacentes mostram-se dispostas frouxamente como no retículo estrelado. Nesta variante o tumor está confinado à superfície luminal do cisto. No entanto, podem ocorrer extensões intraluminais do tumor projetadas para a luz cística. Na variante mural, a parede do cisto é infiltrada pelo epitélio ameloblastomatoso, que exhibe padrão folicular ou plexiforme (Gardner *et al.*, 2005).

As opções de tratamento para o AM variam desde terapias conservadoras, incluindo enucleação e curetagem até ampla ressecção em bloco (Reichart, Philipsen e Sonner, 1995). Os fatores que devem ser considerados na escolha do tratamento são: tipo do tumor, se sólido ou unicístico, aspectos histológicos e radiográficos, localização, tamanho e idade do paciente (Fregnani *et al.*, 2010).

Dentre os aspectos radiográficos, a imagem multilocular e a ruptura da cortical óssea vêm sendo relacionados com índices de recorrência mais altos (Fregnani *et al.*, 2010).

Considerando o tipo do tumor, o AS exibe índice de recidiva de até 95% após simples curetagem (Neville *et al.*, 2004), e de até 31% após curetagem e crioterapia (Fregnani *et al.*, 2010). Abordagens conservadoras podem deixar ilhas tumorais remanescentes no osso, o que irá configurar recorrências futuras (Chapelle *et al.*, 2004; Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010). O ideal é a excisão cirúrgica com adequada margem de segurança, de 1,0 cm (Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010) a 3,0 cm (Chapelle *et al.*, 2004) além dos limites radiográficos.

O AU frequentemente recebe o diagnóstico clínico de cisto dentífero e é tratado com enucleação, tendo sua real natureza revelada somente com o exame histopatológico. Para a variante luminal, nenhum tratamento posterior à enucleação é necessário. Já para a variante mural, a possibilidade de reintervenção para ressecção local deve ser considerada (Gardner *et al.*, 2005). A taxa de recidiva dos AU do tipo mural varia em 20% a 25% (Philipsen e Reichart, 1998).

O acompanhamento por um longo período de tempo dos pacientes com AM é essencial, uma vez que recidivas têm sido documentadas mais do que dez anos após o tratamento inicial (Gardner *et al.*, 2005).

1.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

A matriz extracelular (MEC) é basicamente constituída por colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos. Sua principal função é sustentar a adesão celular dos tecidos e realizar a transmissão de sinais celulares. A membrana basal também é uma forma de MEC, porém é mais especializada e separa as células epiteliais do tecido conjuntivo subjacente (Egeblad e Werb, 2002).

A remodelação da MEC ocorre em processos fisiológicos, como na embriogênese, e em condições patológicas, como em doenças inflamatórias; processos de destruição tecidual (invasão tumoral e

metástases), fibroses (cirrose hepática) e no enfraquecimento da matriz (cardiomiopatias, aneurismas da Aorta) (Amalinei *et al.*, 2010).

Estudos recentes vêm demonstrando que membros da família das Metaloproteinasas de Matriz (MMP) assumem um papel importante na degradação de macromoléculas da MEC em condições fisiológicas e patológicas (Nishida *et al.*, 2008). As MMP atuam no desenvolvimento embrionário, involução do útero pós-parto, remodelação e crescimento ósseo, ovulação e cicatrização de feridas, e em processos patológicos importantes como na destruição das articulações no reumatismo e osteoartrite, invasão tumoral, periodontites e osteoporose (Woessner, 1991).

As MMP compreendem uma família de endopeptídeos zinco-dependentes, formada por 21 componentes. São enzimas proteolíticas que conseguem clivar os componentes da MEC, como o colágeno e proteoglicanos (Woessner, 1991; Egeblad e Werb, 2002; Amalinei *et al.*, 2010). Historicamente eram classificadas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e amrilisinases, de acordo com o substrato que possuíam especificidade (Egeblad e Werb, 2002). No entanto, os membros desta família possuem ampla especificidade, o que gerou conflitos quando muitos dos membros foram nomeados (Woessner, 1991). Conforme o número de MMP conhecidas foi crescendo, um sistema de numeração sequencial foi adaptado, e atualmente são agrupadas de acordo com sua estrutura. São oito classes estruturais distintas: cinco classes citoplasmáticas e três ligadas à membrana (Egeblad e Werb, 2002).

As MMP apenas são sintetizadas e secretadas na MEC na presença de um sinal claro de sua necessidade. Isso ocorre, por exemplo, quando fatores de crescimento sinalizam a produção de enzimas direcionadas à remodelação tecidual, que permitirão o crescimento. (Woessner, 1991).

A expressão e ativação das MMP estão aumentadas em quase todos os cânceres humanos quando comparados aos tecidos normais, e esta expressão vem sendo associada a um pior prognóstico para o paciente. Acredita-se que as MMP possam regular o microambiente do tumor. Isso inclui crescimento, diferenciação, apoptose, migração, invasão, metástases, regulação da angiogênese e vigilância do sistema imune (Egeblad e Werb, 2002; Amalinei *et al.*, 2010). Especificamente para a invasão tumoral e metástases, é necessária uma extensa degradação de componentes da MEC, como o colágeno intersticial e o colágeno da membrana basal (tipo IV), fibronectina, laminina e várias proteoglicanas (Woessner, 1991). As MMP exercem essas funções por meio da clivagem de diversos grupos de substratos, não somente de

componentes estruturais da MEC, como também de proteínas ligantes de fatores de crescimento, precursores de fatores de crescimento, receptores de quinases tirosinas (*receptor tyrosine kinases*), moléculas de adesão celular e outras proteinases (Egeblad e Werb, 2002).

A MMP-1 ou collagenase-1 degrada o colágeno de tripla hélice, mais especificamente o colágeno intersticial (tipo I, II, III), algumas ainda podem clivar caseína e gelatina. Está envolvida em várias condições patológicas podendo ser produzida por células tumorais, e também é encontrada na cicatrização de feridas, sendo produzida por fibroblastos, macrófagos e outras células do tecido de granulação (Woessner, 1991; Amalinei *et al.*, 2010).

A MMP-2 e 9 ou gelatinase-A e B, respectivamente, degradam o colágeno previamente desnaturado. Ambas estão associadas à invasão de células tumorais devido a sua habilidade de degradar o colágeno do tipo IV, principal componente da membrana basal, considerada uma barreira física natural que separa o compartimento epitelial do estroma, sendo o primeiro obstáculo a ser vencido em uma invasão de carcinomas por exemplo (Egeblad e Werb, 2002; Amalinei *et al.*, 2010).

A atividade das MMP nos tumores é caracterizada pelo aumento da remodelação e degradação tecidual, resultantes de um equilíbrio entre a concentração destas enzimas e de seus inibidores (TIMPs) (Amalinei *et al.*, 2010). No estroma tumoral de um câncer invasivo podem ser encontradas MMP-2 e 1, sendo a última geralmente expressa em carcinomas de cabeça e pescoço (Amalinei *et al.*, 2010). Já a MMP-9 é mais focal e expressa em células endoteliais (Amalinei *et al.*, 2010).

MMP-2 e 9 são sintetizadas por células do estroma do tumor, incluindo fibroblastos, MF, células inflamatórias e endoteliais (Egeblad e Werb, 2002). Em cistos odontogênicos as MMP-1, 2 e 9 estão presentes e desempenham importante papel no seu mecanismo de crescimento (Ali, 2008). Em cistos e tumores odontogênicos como o cisto dentífero, cisto radicular, tumor odontogênico ceratocístico e AM, a expressão de MMP é um importante fator utilizado para o estabelecimento de diferenças no comportamento biológico das lesões (Henriques *et al.*, 2011). O comportamento biológico do AM vem sendo associado com a alta expressão de MMP por inúmeros autores (Egeblad e Werb, 2002; Kumamoto *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2004; Kumamoto e Ooya, 2006; Nishida *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Amalinei *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2010; Farias *et al.*, 2012).

1.4 MIOFIBROBLASTOS

Os MF são células mesenquimais especializadas, com fenótipo híbrido entre fibroblastos e células musculares lisas. Morfologicamente se apresentam como células fusiformes ou estrelárias, de citoplasma palidamente eosinofílico e núcleo vesicular alongado (Eyden *et al.*, 2009). Funcionalmente, possuem habilidade contrátil, devido à elevada expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) e sintetizam diversos componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno e metaloproteinases de matriz (MMP), o que faz com que a ativação dessas células no estroma tenha importância no crescimento e progressão tumorais (Vered *et al.*, 2005b; Nadalin, 2008; Fregnani *et al.*, 2009).

A α -SMA confere a várias células não musculares a capacidade de exercer uma elevada capacidade tensional, e é o marcador mais utilizado para a identificação dos MF em células fusiformes, permitindo a investigação do comportamento destas células em situações experimentais e clínicas (Desmouliere, Guyot e Gabbiani, 2004; Nadalin, 2008).

Em humanos e animais os MF foram primeiramente encontrados no tecido de granulação de feridas abertas. Posteriormente, foram identificados em alguns tecidos normais cujas células são submetidas a estresse mecânico como o ligamento periodontal, gengiva marginal, mucosa do palato, glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos e vilosidades intestinais. Essas células também estão presentes em lesões reativas, tumores benignos localmente agressivos, fibromatoses, sarcomas e carcinomas, incluindo os da cavidade oral (Takata *et al.*, 2000; Tomasek *et al.*, 2002; Nadalin, 2008; Eyden *et al.*, 2009).

Os MF derivam de células mesenquimais, particularmente fibroblastos, e menos frequentemente de células do músculo liso, pericitos e células endoteliais (Eyden *et al.*, 2009).

Acredita-se que o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) seja o principal fator envolvido na diferenciação de fibroblastos em MF, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), responsável pela sua maturação (Vered *et al.*, 2005a; Nadalin, 2008). O aumento da expressão de TGF- β 1 já foi encontrado no epitélio de lesões odontogênicas, especialmente no AM, de maneira semelhante ao descrito no estroma de carcinomas, incluindo os da cavidade oral (Takata *et al.*, 2000). Isso pode explicar o aumento da frequência de MF

em AM e a expectativa de maior agressividade quanto maior o número de MF no estroma da lesão (Vered *et al.*, 2005b; Fregnani *et al.*, 2009).

A transição de fibroblasto para MF é aceita como o evento-chave na formação do tecido de granulação durante a cicatrização de feridas ou fibrose, na promoção e regulação da transformação epitelial maligna e na manutenção da progressão do câncer (Desmouliere, Guyot e Gabbiani, 2004).

Acredita-se que os MF possam influenciar a evolução tumoral por meio de três mecanismos: 1) síntese e expressão de componentes específicos da MEC; 2) remodelação mecânica do tecido de granulação bem como transmissão de tensão para as células tumorais; 3) produção de citocinas específicas (Desmouliere, Guyot e Gabbiani, 2004).

No estroma de tumores, a contractilidade e produção de colágeno pelos MF explica o fenômeno de retração e consistência firme vista em alguns carcinomas. Além disso, essas células favorecem a migração das células neoplásicas devido à secreção de proteases capazes de degradar a MEC como as MMPs 2 e 9 (Eyden *et al.*, 2009).

São escassos os estudos sobre a presença de MF em cistos e tumores odontogênicos. Tem sido demonstrado que essas células são mais abundantes em tumor odontogênico ceratocístico e AM, quando comparado a cistos dentígeros, cistos odontogênicos ortoceratinizados e fibromas ameloblásticos (Vered *et al.*, 2005b). Essa expressão aumentada de MF em AM vem sendo associada a características de maior agressividade do tumor (Rothouse, Majack e Fay, 1980; Smith e Bartov, 1986; Vered *et al.*, 2005b; Fregnani *et al.*, 2009). Ainda, em AS tem sido relatada uma correlação positiva entre a presença de MF e MMP-2 no estroma tumoral, e a relação destes marcadores com a presença de cortical óssea rompida (Fregnani *et al.*, 2009).

1.5 ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67

O antígeno de proliferação Ki-67 é uma proteína nuclear de aproximadamente 395 kDa, expressa durante o ciclo celular (Sittel *et al.*, 1999), desta maneira, células quiescentes não expressam esta proteína (Gerdes *et al.*, 1984).

O anticorpo monoclonal Ki-67 é considerado um marcador confiável para identificar com precisão a atividade celular proliferativa (Brown e Gatter, 1990). Vem sendo amplamente utilizado como uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico, devido à associação entre o índice de proliferação de células tumorais e o comportamento da lesão, como tamanho do tumor e grau de diferenciação (Philipsen e Reichart,

1998; Brown e Gatter, 2002b; Metgud e Gupta, 2013). A taxa de proliferação das células tumorais pode representar um indicador importante da agressividade e do potencial de recidiva de neoplasias (Brown e Gatter, 2002b; a). Em AM a taxa de marcação do Ki-67 varia entre 0-26% das células tumorais (Piattelli *et al.*, 2002; Meer *et al.*, 2003; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Fregnani *et al.*, 2010; Metgud e Gupta, 2013).

Considerando o AS e o AU, tem sido demonstrado que a porcentagem de células positivas para Ki-67 é semelhante entre estes subtipos 12,8% e 15,1%, respectivamente. No entanto, AM recorrentes mostraram valores mais altos (17,2%) que os não-recorrentes (14,29%) (Bologna Molina *et al.*, 2008).

Com relação à localização das células Ki-67 positivas, os estudos mostram que as mesmas ocorrem principalmente na porção periférica do epitélio ameloblástico, sendo apenas algumas células positivas encontradas nas áreas centrais, demonstrando que as células periféricas são as principais responsáveis pelo crescimento do AM (Bologna-Molina *et al.*, 2008; Metgud e Gupta, 2013).

1.6 FOLÍCULO PERICORONÁRIO

O Folículo Pericoronário (FP) é uma estrutura embriológica, de origem mesenquimal, que envolve cada germe dentário durante a odontogênese. Sua principal função é a produção de esmalte dental. Após a formação do esmalte, a coroa do dente em desenvolvimento é envolvida pelo órgão reduzido do esmalte e pelo ectomesênquima, estruturas que formam o FP, e protegem o elemento dental durante a erupção (Adelsperger *et al.*, 2000).

A erupção dentária é definida como o movimento de um dente, de seu lugar de desenvolvimento no processo alveolar, para sua posição funcional na cavidade oral. O FP coordena a reabsorção e deposição de osso, nos lados opostos do dente em erupção, durante seu movimento intra-ósseo (Lautenschläger *et al.*, 2007). Durante diferentes estágios do desenvolvimento e erupção dental, MMPs são encontradas nos tecidos odontogênicos atuando na remodelação da MEC e regulação da síntese e degradação dos componentes do FP (Sahlberg *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2009). MMP-1, 2 e 9 já foram encontradas em tecidos do FP por diversos autores (Heikinheimo e Salo, 1995; Sahlberg *et al.*, 1999; Randall e Hall, 2002; Kumamoto e Ooya, 2006; Cerri *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2011).

As MMP-2 e 9 são amplamente expressas nos tecidos mesenquimais e células epiteliais do FP (Heikinheimo e Salo, 1995; Sahlberg *et al.*, 1999; Randall e Hall, 2002; Kumamoto e Ooya, 2006; Cerri *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2011). A MMP-1 já foi detectada em germes dentais, com expressão imunoistoquímica no epitélio interno e externo do órgão do esmalte, lâmina dental, estrato intermediário, retículo estrelado e FP (Randall e Hall, 2002; Kumamoto e Ooya, 2006). Em incisivos de ratos, onde está presente um processo eruptivo contínuo durante toda a vida, uma intensa expressão de MMP-2 no FP dos tecidos odontogênicos é encontrada (Gomes *et al.*, 2011). Quando este processo eruptivo é interrompido experimentalmente, uma diminuição da expressão de MMP-1 no FP é verificada (Omar *et al.*, 2011). Por outro lado, em uma erupção acelerada é detectado um aumento na proliferação celular no FP, demonstrada pelo aumento da expressão de Ki-67, e também ocorre um aumento na expressão de MT1-MMP e TIMP-2, proteínas que quando conectadas promovem a ativação da MMP-2 (Gomes *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

O fato do AM ser uma lesão benigna com elevado índice de recidiva, suportada principalmente em seu potencial de invasividade local, estimula o desenvolvimento de estudos com a finalidade de elucidar cada vez mais seu comportamento biológico. Embora haja diversos estudos na literatura mostrando a expressão de MMPs e Ki-67 em AM, este é o primeiro estudo a investigar a atividade proliferativa, associada a expressão de MMP-1, 2 e 9, e presença de MF em AS e AU, comparando ainda essa expressão a tecido odontogênico não neoplásico. O objetivo principal deste estudo foi colaborar para um melhor esclarecimento do comportamento biológico dessa neoplasia, por meio da investigação da atividade proliferativa do parênquima do AM, associado à interação deste com o estroma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação imunoistoquímica da expressão das metaloproteínases de matriz 1, 2 e 9, presença de MF e proliferação celular em AM e FP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9 em AM e FP, evidenciando o local e a frequência desta expressão;
- Analisar a presença de MF, por meio da expressão da proteína α -actina de músculo liso, em AM e FP;
- Verificar o índice proliferativo das células epiteliais, por meio da marcação do antígeno de proliferação Ki-67, em AM e FP;
- Comparar a expressão de cada proteína em estudo em AS, AU e FP;
- Estabelecer possíveis correlações entre a expressão das MMPs, MF e Ki-67 nos casos estudados, com o crescimento e prognóstico do AM;
- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

4 ARTIGO

Artigo formatado conforme as normas da revista *Tumor Biology* (acessadas em: 20/02/2014), exceto em relação ao idioma.

TÍTULO

Avaliação imunoistoquímica de metaloproteinases de matriz (1, 2 e 9), miofibroblastos e Ki-67 em ameloblastomas e folículos pericoronários.

RESUMO

Introdução: O ameloblastoma (AM) é uma neoplasia odontogênica benigna, com elevado grau de morbidade devido ao seu potencial de invasividade local. O objetivo deste estudo foi contribuir para o entendimento dos mecanismos de invasão do AM, por meio da avaliação imunoistoquímica da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP-1, 2 e 9), presença de miofibroblastos (MF) e do índice proliferativo das células neoplásicas (Ki-67).

Materiais e métodos: Treze casos de AM sólidos (AS) e cinco unicísticos (AU) foram selecionados para a investigação imunoistoquímica das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9, α -actina de músculo liso (α -SMA), e Ki-67. Também foram incluídos oito casos de folículos pericoronários (FP) como amostra de tecido odontogênico não neoplásico.

Resultados: O teste estatístico de Kruskal-Wallis mostrou diferença estatística para as MMP-1 e -2 no epitélio, cuja expressão foi menor em AS, quando comparado a AU e FP. A expressão de MMP-9 no estroma foi significativamente maior em FP, quando comparado a AS e AU. Para os MF, não houve diferença estatística entre os grupos, embora maior número de células positivas tenha sido observado em AS. A imunopositividade para o Ki-67 foi maior em AS/AU embora sem diferença significativa com o FP.

Conclusão: É possível concluir que a expressão, de MMP 1, 2 e 9, MF e Ki-67, esteve presente de maneira semelhante nos grupos em estudo. Demonstrando que a expressão dessas proteínas está associada tanto ao comportamento tumoral do AM como a remodelação fisiológica tecidual do FP.

Palavras-chave: Metaloproteinases de Matriz, Miofibroblastos, Proliferação celular, Tumores odontogênicos, ameloblastoma.

INTRODUÇÃO

O Ameloblastoma (AM) é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma neoplasia odontogênica benigna, de origem epitelial sem a presença de ectomesênquima, com comportamento biológico agressivo devido ao seu crescimento localmente invasivo (1). O AM se apresenta principalmente como uma neoplasia sólida (AS) ou cística (AU). O AS tende a ser mais agressivo e ter maior probabilidade de recorrência após o tratamento cirúrgico, quando comparado ao AU, devido ao seu comportamento infiltrativo (2).

Os mecanismos de invasão do AM não estão bem esclarecidos (3), mas têm sido relacionados com a ação de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular (MEC), como as metaloproteinases de matriz (MMP) (3, 4). As MMP são sintetizadas e secretadas na MEC na presença de um sinal claro de sua necessidade, e sua ativação está aumentada em quase todos os cânceres humanos quando comparados aos tecidos normais, o que vem sendo associado a um pior prognóstico para o paciente (5, 6). Acredita-se que as MMP possam regular o microambiente do tumor. Isso inclui crescimento, diferenciação, apoptose, migração, invasão, metástases, regulação da angiogênese e vigilância do sistema imune (5, 6). Especificamente, a MMP-1 degrada o colágeno intersticial dos tipos I, II, III, e pode clivar a caseína e gelatina (5, 7). As MMP-2 e 9 participam principalmente da degradação do colágeno tipo IV, componente da membrana basal (8, 9).

Os MF são células mesenquimais com fenótipo híbrido entre fibroblastos e células musculares lisas. Funcionalmente, apresentam capacidade contrátil, devido à expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) (10, 11), e sintetizam diversos componentes da MEC, como colágeno e MMP, o que faz com que a ativação dessas células no estroma tenha importância no crescimento e progressão tumorais (12). Acredita-se que os MF possam influenciar a evolução tumoral por meio de três mecanismos: 1) síntese e expressão de componentes específicos da MEC; 2) remodelação mecânica do tecido de granulação bem como transmissão de tensão para as células tumorais; 3) produção de citocinas específicas (13).

No mecanismo de crescimento do AM, a taxa de proliferação das células tumorais pode representar um indicador importante da agressividade e do potencial de recidivas de neoplasias e vem sendo identificado por meio da marcação do antígeno de proliferação celular Ki-67 (14). O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa durante o ciclo celular, desta maneira, células quiescentes não expressam esta proteína, tornando-o um marcador confiável para identificar com precisão a

atividade celular proliferativa. (GERDES et al. 1984) (SITTEL et al. 1999. (15). A expressão aumentada de Ki-67 nas células epiteliais tumorais vem sendo correlacionada com o diagnóstico e prognóstico da lesão, melhorando o entendimento da biologia neoplásica (14, 16).

O Folículo Pericoronário (FP) é uma estrutura embriológica, de origem mesenquimal, que envolve cada germe dentário durante a odontogênese. Sua principal função é a produção de esmalte dental. Após a formação do esmalte, a coroa do dente em desenvolvimento é envolvida pelo órgão reduzido do esmalte e pelo ectomesênquima, estruturas que formam o FP, e protegem o elemento dental durante a erupção (17). O FP coordena a reabsorção e deposição de osso, nos lados opostos do dente em erupção, durante seu movimento intra-ósseo (18). Durante diferentes estágios do desenvolvimento e erupção dental, MMP são encontradas nos tecidos odontogênicos atuando na remodelação da MEC (19, 20). A expressão das MMP-1, 2 e 9 têm sido descrita em tecidos do FP por diversos autores (9, 19, 21-26).

Considerando que o AM é uma lesão benigna de comportamento agressivo e elevado índice de recidiva, suportados principalmente em seu potencial de invasividade local, o presente estudo avaliou os mecanismos da invasão neoplásica, por meio da investigação imunoistoquímica das proteínas MMP-1, 2 e 9, α -SMA e Ki-67 em casos de AM e FP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número 1055/10. Foram selecionados 18 casos de AM nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC, divididos de acordo com as características clínico-radiográficas em: AS, 13 casos de AM sólidos; e AU, 5 casos de AM unicísticos. O grupo controle, FP, foi formado por 8 casos de folículos pericoronários de terceiros molares completamente inclusos, comprovados radiograficamente, e livres de processo inflamatório. Os 13 casos de AS ainda foram avaliados e divididos em espécimes com área cística e espécimes com área de proliferação sólida.

Imunoistoquímica

As amostras foram submetidas à técnica de imunoistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo

primário. Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro silanizadas (Sigma®, St. Louis, MO, EUA). Foi realizada a desparafinização e reidratação dos cortes, seguidas de imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato em banho-maria. O bloqueio da biotina endógena foi realizado pela incubação dos cortes em solução de leite desnatado a 5% em PBS, por 40 minutos. A incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), durante 18 horas. O Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado para aplicação do anticorpo secundário biotilado, o qual foi incubado em TA, por 30 minutos, seguido da incubação do complexo streptavidina-peroxidase por mais 30 minutos. As lâminas foram coradas com solução cromógena DAB (Dako, Corporation, Carpinteria, CA, USA) e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Controle Positivo
MMP-1	Policlonal	DBS	1:400	Placenta
MMP-2	Policlonal	Sigma	1:100	Carcinoma de mama
MMP-9	Policlonal	Sigma	1:250	Medula
α-SMA	Policlonal	Sigma	1:1000	HFI; Vasos sanguíneos
Ki- 67	Monoclonal– SP6	Biocare	1:100	Carcinoma epidermóide

Quadro 1: Anticorpos utilizados.

HFI – hiperplasia fibrosa inflamatória

Análise das reações imunoistoquímicas

Para avaliação das reações utilizou-se o software NIH ImageJ 1.45q (*National Institutes of Health*, Maryland, EUA) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica (Cannon, A620, San Jose, CA, USA) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400X.

A imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso

foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais em 10 campos consecutivos.

A avaliação para MMP-1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma, foi obtida individualmente no estroma e epitélio, através da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do epitélio ou estroma em cada campo (pixels totais), em 10 campos consecutivos para cada caso. No estroma foram excluídas as células inflamatórias e endoteliais.

A presença de MF foi observada pela expressão de α -SMA nos fibroblastos do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio ameloblástico. Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e pericitos. A contagem do total de células positivas por campo, em 10 campos consecutivos para cada caso, foi realizada e posteriormente a média de células positivas para cada caso foi definida.

Análise estatística

O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparação entre AS, AU e FP. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas/ área corada \pm os desvios-padrão. Considerou-se valor de $P \leq 0,05$ para dados com significância estatística.

RESULTADOS

Os resultados para as reações imunoistoquímicas estão demonstrados nas Tabelas 1.

Em todos os grupos estudados, a expressão de MMP-1 e MMP-2 mostrou marcação citoplasmática intensa e uniforme em toda a extensão do epitélio, bem como nos fibroblastos do tecido conjuntivo adjacente (Figuras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B e 3C). A expressão de MMP-9 mostrou marcação de fraca intensidade, localizada em toda extensão do epitélio, assim como nos fibroblastos do tecido conjuntivo adjacente (Figuras 1D, 2D e 3D).

Os MF foram evidenciados, por meio da marcação do α -SMA, de maneira difusa pelo tecido conjuntivo em todos os casos estudados (Figuras 1E, 2E e 3E). Embora sem diferença significativa, o número de MF foi maior nos casos de AS (Figura 1E), quando comparado aos casos de AU (Figura 2E). Os casos de FP mostraram menor quantidade dessas células no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio quando comparado aos demais grupos (Figura 3E).

A imunopositividade para o antígeno Ki-67 mostrou ampla variação entre os casos. Embora sem diferença significativa, foi

observado que a porcentagem de células Ki-67 positivas foi maior nos AM (Figuras 1F e 2F) com relação aos FP (Figura 3F). Nas áreas sólidas dos tumores as células positivas foram observadas principalmente na porção periférica das ilhas e cordões de epitélio ameloblástico (Figura 1F). Nas áreas císticas, a marcação foi principalmente observada nas células basais do revestimento epitelial (Figura 2F).

O teste estatístico de Kruskal-Wallis (Tabela 1) mostrou diferença estatística para as MMP-1 e -2 no epitélio, cuja expressão foi menor em AS (Figuras 1A, 1B e 1C), quando comparado a AU (Figuras 2A, 2B e 2C) e FP (Figuras 3A, 3B e 3C). E a expressão de MMP-9 no estroma foi significativamente maior em FP (Figura 3D), quando comparado a AS (Figura 1D) e AU (Figura 2D).

DISCUSSÃO

O AM é uma lesão benigna com elevado índice de recidiva e característica marcante de agressividade, suportada principalmente no seu potencial de invasividade local (2). A invasividade do AM vem sendo relacionada à ação de enzimas capazes de degradar a MEC, como as MMP (3-9, 27-30). No presente estudo, todas as amostras teciduais de AM apresentaram imunoreatividade aos anticorpos anti MMP-1, 2 e 9, com marcação tanto no epitélio quanto no estroma neoplásico, conforme já relatado por outros autores (3, 27). No entanto, embora a expressão de MMP em AM venha sendo relacionada com o comportamento biológico agressivo deste tumor (8, 10, 27, 28, 31-33), no presente estudo observou-se menor expressão de MMP-1 e 2 no epitélio do AS, em comparação com AU e FP, e menor expressão de MMP-9 no estroma do AS e AU, em comparação com o FP, ambas com diferença estatisticamente significativa.

São escassos os estudos comparativos da expressão de MMP entre tumores odontogênicos infiltrativos e FP. Ramos et al. (2013) encontraram menor expressão imunoistoquímica significativa de MMP-1 e 9 no estroma de FP, quando comparados a tumores odontogênicos ceratocísticos, já para a MMP-2 nenhuma diferença entre os grupos foi evidenciada (34). Até o momento, nenhum estudo comparou a expressão imunoistoquímica de MMP-1, 2 e 9 entre casos de AM e FP. Na comparação entre tumores invasivos e não invasivos, Ribeiro et al. (2009) encontraram expressão imunoistoquímica de MMP-1, 2 e 9 em quantidades semelhantes entre casos de AM e tumor odontogênico adenomatóide (27). Na comparação entre AM e tecido odontogênico não neoplásico, Zhong et al. (2003) verificou maior expressão de MMP-2 e 9 em AM quando comparado com o tecido normal da mucosa (32),

enquanto que Farias et al. (2012) encontrou expressão similar de MMP-2 em níveis de mRNA em AM e espécimes de gengiva saudável (30).

No presente estudo, a expressão de MMP-9 no estroma e de MMP-1 no epitélio dos FP foi significativamente maior em relação aos casos de AM, enquanto que a expressão epitelial de MMP-2 nos FP foi significativamente maior que nos AS e semelhante aos AU. A elevada marcação das MMP nos FP provavelmente é resultante do processo de erupção dental. O processo eruptivo resulta da força eruptiva do dente em movimento e da degradação do tecido adjacente a ele (25), por meio da ação coordenada de eventos celulares e moleculares (26). Várias destas moléculas fundamentais à erupção dental são produzidas pelo FP, um exemplo são as MMPs, encontradas durante diferentes estágios do desenvolvimento e erupção dental, atuando na remodelação da MEC (26-30). A importância das MMPs-1, 2 e 9, durante o processo de erupção tem sido demonstrada em diversos estudos (25, 26, 27, 28, 29). Além disso, a menor expressão de MMP-2 em AS, quando comparada ao FP, encontrada no presente estudo, pode ocorrer pela necessidade de preservação de alguns constituintes da membrana basal, o que é crucial para o processo de diferenciação das células neoplásicas e manutenção da arquitetura estrutural do tumor (16).

Além da erupção dental, as MMPs também são identificadas atuando durante a odontogênese. Kumamoto et al. (2006) encontrou expressão de MT1-MMP (MMP-1 ligada à membrana, considerada precursora da MMP-2) fortemente expressa em germes dentais em desenvolvimento (9). No órgão do esmalte, a expressão de MMP-2 e MMP-9 já foi identificada no epitélio interno, o qual é formado por células que sofrerão diferenciação em ameloblastos. No AM esse processo de diferenciação celular é incompleto, as células colunares periféricas lembram ameloblastos, os quais não sofrem maturação. Desta maneira, no AM não é necessária uma modificação estrutural da membrana basal para que ocorra a sua degradação, necessitando menor quantidade de MMP-2 e 9 para degradar o colágeno do tipo IV (27), o que pode justificar a baixa positividade dessas enzimas no tumor em comparação ao FP.

Cabe ressaltar que no presente estudo foi utilizado o programa *Image J*[®] para a avaliação da expressão das MMP, sendo a expressão destas considerada apenas com relação à quantidade de área marcada e não com relação à intensidade de marcação. A análise da expressão imunoistoquímica das MMP por quantidade de área marcada (*pixels* positivos) foi escolhida para a metodologia deste trabalho por ser uma técnica que permite a padronização entre os casos, com uma análise

segura e reproduzível, visto que a expressão das MMP é citoplasmática e difusa nos tecidos estudados (6). Estudos que consideram a área marcada e a intensidade de marcação pelas MMP são encontrados na literatura(4, 28, 35), no entanto, para o presente estudo, a morfologia característica do AM inviabilizou uma avaliação as cegas dos espécimes, para uma análise subjetiva de intensidade de marcação.

Na avaliação da taxa proliferativa do presente estudo, observamos que a imunopositividade para o antígeno Ki-67 foi maior em AM do que em FP, porém sem diferença estatisticamente significativa. A maior média de expressão foi encontrada em AU (8.00 ± 9.43), localizada principalmente nas células epiteliais basais cilíndricas ou colunares do revestimento cístico. Esses dados corroboram com os estudos de Rosenstein et al. (2001), Meer et al. (2003), Bologna-Molina et al. (2008) e Henriques et al. (2011) (31, 36-38), e podem ser explicados pelo fato do AU possuir maior quantidade de células nas camadas basais e suprabasais, as quais são mais propensas à proliferação e consequente positividade, o que por sua vez resulta em um índice proliferativo maior (16, 36, 37). Já o AS exibe maior quantidade de células epiteliais nas áreas centrais das ilhas tumorais, onde há uma tendência do Ki-67 encontrar-se negativo (37).

Além da proliferação celular, uma etapa considerada importante no crescimento e progressão tumorais é a ativação de MF no estroma (39). Embora não tenha sido evidenciada diferença significativa entre os grupos deste estudo, a maior frequência de MF foi encontrada nos AS (54.18 ± 22.56), seguidos pelos AU (45.49 ± 16.17) e por fim nos FP (36.98 ± 12.34). Um aumento no número de MF, no estroma de tumores odontogênicos, tem sido relacionado a um comportamento mais agressivo dessas lesões (39). Em AS, a maior frequência de MF está relacionada ao aumento da expressão epitelial de TGF- β 1, de maneira semelhante a carcinomas bucais, indicando aumento da transdiferenciação de fibroblastos em MF nestas lesões (39, 40).

Em muitos AM são observadas combinações dos aspectos sólidos e císticos. O AS mostra acentuada tendência a apresentar degeneração cística, e a variante mural do AU pode apresentar áreas de proliferação sólida infiltrando o tecido conjuntivo (2). Por esse motivo, esse estudo propôs a avaliação das áreas císticas e das áreas de proliferação sólida, independentemente da classificação clínico-radiográfica dos casos. Embora sem diferença estatística, foi observada maior porcentagem de células Ki-67 positivas e maior número de MF nas áreas sólidas, quando comparadas às áreas císticas. Em relação às MMP, foi observada expressão significativamente maior de MMP-2 no epitélio das áreas

císticas, reforçando a ideia descrita anteriormente de que a menor expressão de MMP-2 em AS pode ocorrer pela necessidade de preservação de alguns constituintes da membrana basal, o que é crucial para o processo de diferenciação das células neoplásicas e manutenção da arquitetura estrutural do tumor (27).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a expressão de MMP 1, 2 e 9, MF e Ki-67 foi semelhante entre os grupos em estudo, o que demonstra uma intensa atividade de remodelação tecidual em AM e FP, não sendo este último um tecido quiescente como o esperado.

REFERÊNCIAS

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours: Lyon: IARC Press; 2005.
2. Gardner D, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen H, Coleman H. Ameloblastomas. World Health Organization classification of tumors Pathology and genetics of head and neck tumors: Lyon: IARC Press; 2005. p. 296-300.
3. Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology*. 2004;45(1):65-72.
4. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(2):114-20.
5. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(2):215-28.
6. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.
7. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb j*. 1991;5(8):2145-54.
8. Zhang B, Zhang J, Huang H-Z, Xu Z-Y, Xie H-L. Expression and role of metalloproteinase-2 and endogenous tissue regulator in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2010;39.

9. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(6):345-51.
10. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics.* 2010;43(1):146-55.
11. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncology.* 2005;41(10):1028-33.
12. Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, Fisher C. The myofibroblast and its tumours. *J Clin Pathol.* 2009;62(3):236-49.
13. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani C. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *International Journal of Developmental Biology.* 2004;48(5-6):509-17.
14. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002;40(1):2-11.
15. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990;17(6):489-503.
16. Metgud R, Gupta K. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Ann Diagn Pathol.* 2013.
17. Adelsperger J, Campbell JH, Coates DB, Summerlin DJ, Tomich CE. Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(4):402-6.
18. Lautenschläger GeA, Gallina MC, Ferreira Júnior O, Lara VS. Primary failure of tooth eruption associated with secondarily inflamed dental follicle: inflammatory follicular cyst? *Braz Dent J.* 2007;18(2):144-7.
19. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(2):121-30.
20. Paiva KB, Zambuzzi WF, Accorsi-Mendonca T, Taga R, Nunes FD, Sogayar MC, et al. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. *J Mol Histol.* 2009;40(3):201-7.
21. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res.* 1995;74(5):1226-34.
22. Randall LE, Hall RC. Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):205-11.
23. Gomes JR, Omar NF, dos Santos Neves J, Narvaes EA, Novaes PD. Immunolocalization and activity of the MMP-9 and MMP-2 in

odontogenic region of the rat incisor tooth after post shortening procedure. *J Mol Histol.* 2011;42(2):153-9.

24. Omar NF, Gomes JR, Neves Jdos S, Salmon CR, Novaes PD. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. *J Mol Histol.* 2011;42(6):505-11.

25. Gomes JR, Omar NF, Dos Santos Neves J, Narvaes EA, Novaes PD. Increase of MT1-MMP, TIMP-2 and Ki-67 proteins in the odontogenic region of the rat incisor post-shortening procedure. *J Mol Histol.* 2010;41(6):333-41.

26. Cerri PS, Pereira-Junior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Anat.* 2010;217(2):116-25.

27. Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, Galvao HC, Medeiros AM, Freitas RA. Immunoeexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.* 2009;15(7):472-7.

28. Zhang B, Zhang J, Xu ZY, Xie HL. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Cancer.* 2009;9:427.

29. Nishida Y, Miyamori H, Thompson EW, Takino T, Endo Y, Sato H. Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. *Cancer Res.* 2008;68(21):9096-104.

30. Farias LC, Gomes CC, Rodrigues MC, de Castro WH, Lacerda JC, EF EF, et al. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. *BMC Clin Pathol.* 2012;12:11.

31. Rosenstein T, Pogrel MA, Smith RA, Regezi JA. Cystic ameloblastoma--behavior and treatment of 21 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59(11):1311-6; discussion 6-8.

32. Zhong M, Li ZJ, Wang J, Yue YL, Bao G. [The study of the invasive biologic behavior of ameloblastoma]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2004;39(1):45-8.

33. Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(2):231-40.

34. Ramos G, Costa A, Meurer M, Vieira D, ERC. R. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2013.

35. Nadalin MR, Fregnani ER, Silva-Sousa YT, da Cruz Perez DE. Presence of myofibroblasts and matrix metalloproteinase 2 in radicular cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors: a comparative immunohistochemical study. *J Endod.* 2012;38(10):1363-7.

36. Meer S, Galpin JS, Altini M, Coleman H, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(2):213-21.
37. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2008;44(8):805-11.
38. Henriques AC, Vasconcelos MG, Galvao HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(4):468-75.
39. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol.* 2005;41(10):1028-33.
40. Takata T, Miyauchi M, Ogawa I, Kudo Y, Takekoshi T, Zhao M, et al. Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. *Virchows Arch.* 2000;436(4):319-23.

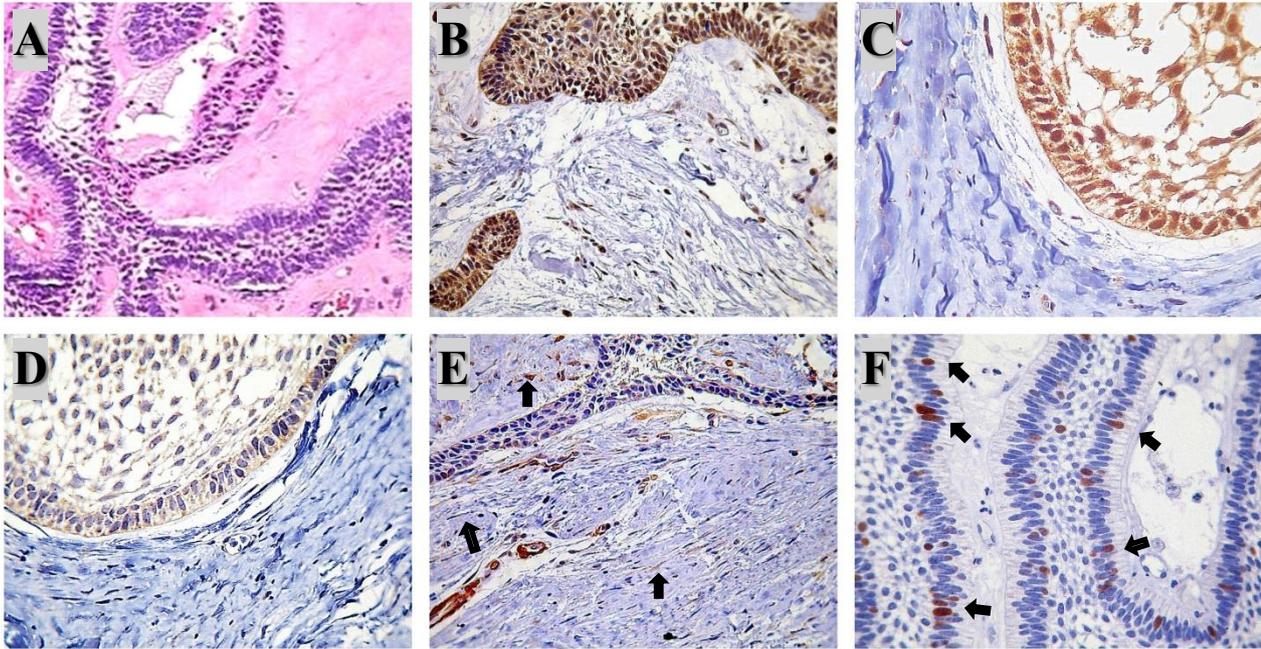


Figura 1: Análise histopatológica e imunoistoquímica do ameloblastoma sólido.

Análise histopatológica (HE, 400X): **A)** Ilhotas de epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso. Análise imunoistoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase, 400X): **B)** Expressão citoplasmática de MMP-1; **C)** Expressão citoplasmática de MMP-2; **D)** Expressão citoplasmática de MMP-9; **E)** Expressão citoplasmática de α -SMA; **F)** Expressão nuclear de Ki-67.

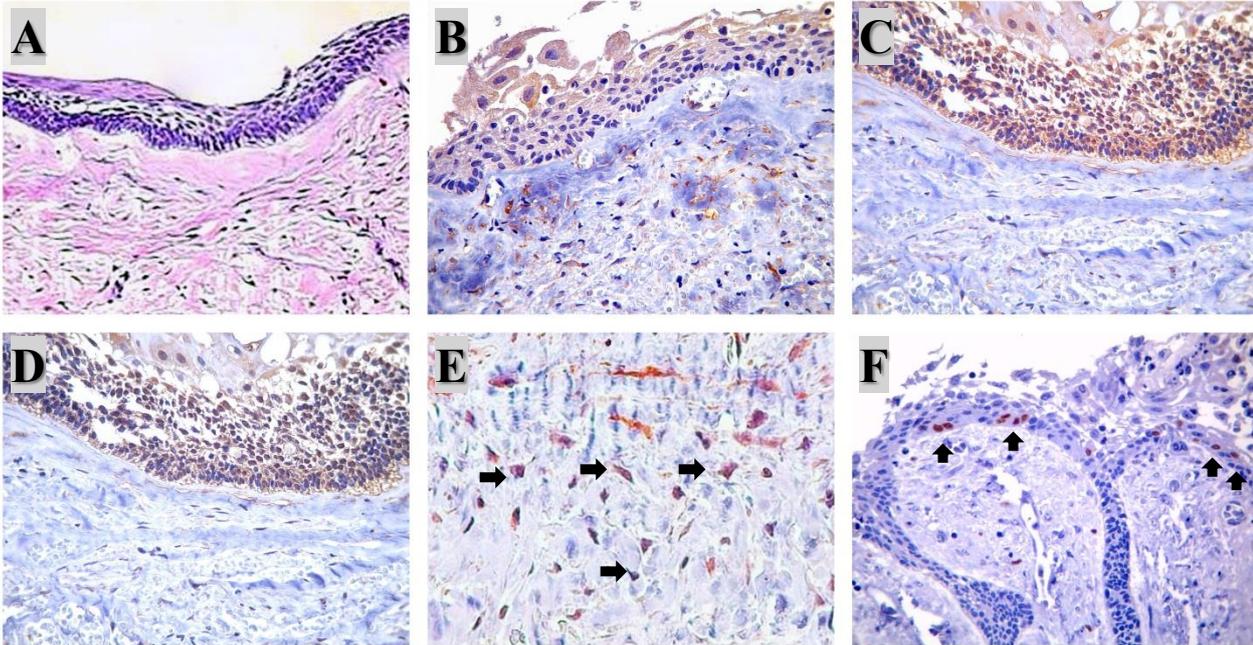


Figura 2: Análise histopatológica e imunoistoquímica do ameloblastoma unicístico.

Análise histopatológica (HE, 400X): **A)** Epitélio ameloblastomatoso revestindo uma cavidade cística, suportado por estroma fibroso. Análise imunoistoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase, 400X): **B)** Expressão citoplasmática de MMP-1; **C)** Expressão citoplasmática de MMP-2; **D)** Expressão citoplasmática de MMP-9; **E)** Expressão citoplasmática de α -SMA; **F)** Expressão nuclear de Ki-67.

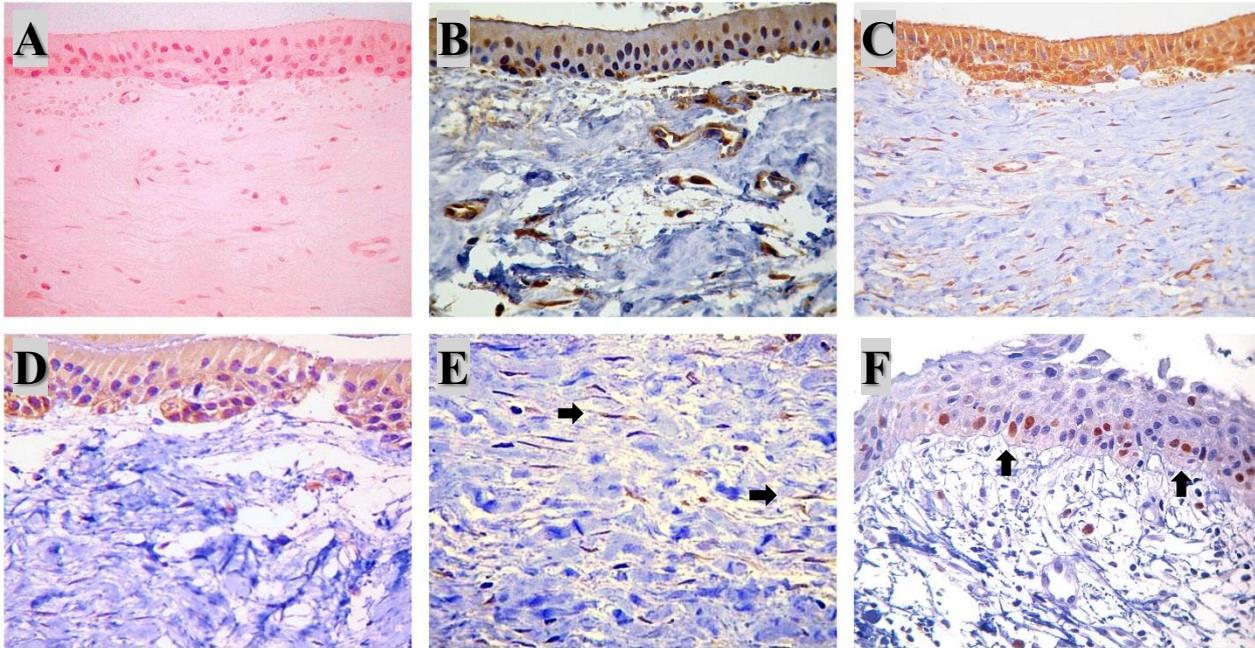


Figura 3: Análise histopatológica e imunoistoquímica do folículo pericoronário.

Análise histopatológica (HE, 400X): **A)** Epitélio odontogênico suportado por tecido conjuntivo fibroso. Análise imunoistoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase, 400X): **B)** Expressão citoplasmática de MMP-1; **C)** Expressão citoplasmática de MMP-2; **D)** Expressão citoplasmática de MMP-9; **E)** Expressão citoplasmática de α -SMA; **F)** Expressão nuclear de Ki-67.

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos 3 grupos

G	MMP-1		MMP-2		MMP-9		Ki-67	MFs
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
AS	14.27 ± 8.70	1.93 ± 1.65	17.88 ± 6.36	1.67 ± 1.06	23.90 ± 10.54	4.45 ± 2.31	6.92 ± 6.42	54.18 ± 22.56
AU	22.99 ± 3.93	2.32 ± 1.59	29.34 ± 6.87	3.06 ± 1.62	31.54 ± 5.84	7.36 ± 6.51	8.00 ± 9.43	45.49 ± 16.17
FP	31.87 ± 6.89	2.17 ± 0.88	26.93 ± 4.37	1.50 ± 0.96	26.78 ± 9.8	14.75 ± 9.87	3.62 ± 9.47	36.98 ± 12.34
P	0.0018*	0.1465	0.0016*	0.2130	0.3230	0.0013*	0.0690	0.1499

Teste de Kruskal-Wallis

Significância estatística: * $p < 0.05$

Valores expressos como média ± desvio-padrão (%)

REFERÊNCIAS

ADELSPERGER, J. et al. Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 89, n. 4, p. 402-6, Apr 2000. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760721> >.

ALI, M. A. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 2, p. 258-63, Aug 2008. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.01.021> >.

AMALINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010. ISSN 1220-0522 (Print)1220-0522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARNES, L. et al. **WHO Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.

BOLOGNA-MOLINA, R. et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. **Oral Oncol**, v. 44, n. 8, p. 805-11, Aug 2008. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.10.007> >.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, Dec 1990. ISSN 0309-0167 (Print)0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Ki67 protein, the immaculate deception. **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, Jan 2002a. ISSN 0309-0167 (Print)0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CERRI, P. S. et al. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. **J Anat**, v. 217, n. 2, p. 116-25, Aug 2010. ISSN 0021-8782. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01249.x> >.

CHAPELLE, K. A. et al. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 42, n. 5, p. 381-90, Oct 2004. ISSN 0266-4356 (Print)0266-4356. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2004.04.005> >.

DESMOULIERE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, C. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 509-517, 2004. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349825> >.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-74, Mar 2002. ISSN 1474-175X (Print)1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc745> >.

EYDEN, B. et al. The myofibroblast and its tumours. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 3, p. 236-49, Mar 2009. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2008.061630> >.

FARIAS, L. C. et al. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. **BMC Clin Pathol**, v. 12, p. 11, 2012. ISSN 1472-6890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6890-12-11> >.

FREGNANI, E. R. et al. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, 2010.

_____. Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. **Pathol Oncol Res**, v. 15, n. 2, p. 231-40, Jun 2009. ISSN 1219-4956 (Print)1219-4956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-008-9110-4> >.

GARDNER, D. et al. Ameloblastomas. In: (Ed.). **World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors**: Lyon: IARC Press, 2005. cap. 6, p.296-300.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1710-5, Oct 1984. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOMES, J. R. et al. Increase of MT1-MMP, TIMP-2 and Ki-67 proteins in the odontogenic region of the rat incisor post-shortening procedure. **J Mol Histol**, v. 41, n. 6, p. 333-41, Dec 2010. ISSN 1567-2379. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-010-9295-1> >.

_____. Immunolocalization and activity of the MMP-9 and MMP-2 in odontogenic region of the rat incisor tooth after post shortening procedure. **J Mol Histol**, v. 42, n. 2, p. 153-9, Apr 2011. ISSN 1567-2379. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-011-9318-6> >.

HEIKINHEIMO, K.; SALO, T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. **J Dent Res**, v. 74, n. 5, p. 1226-34, May 1995. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HENRIQUES, A. C. et al. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 112, n. 4, p. 468-75, Oct 2011. ISSN 1079-2104. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.05.033>>.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 6, p. 345-51, Jul 2006. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00432.x>>.

KUMAMOTO, H. et al. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 2, p. 114-20, Feb 2003. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

LAUTENSCHLÄGER, G. E. A. et al. Primary failure of tooth eruption associated with secondarily inflamed dental follicle: inflammatory follicular cyst? **Braz Dent J**, v. 18, n. 2, p. 144-7, 2007. ISSN 1806-4760. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982555>>.

MEER, S. et al. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 2, p. 213-21, Feb 2003. ISSN 1079-2104 (Print)1079-2104. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1067/moe.2003.62>>.

METGUD, R.; GUPTA, K. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. **Ann Diagn Pathol**, Oct 1 2013. ISSN 1092-9134. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2013.06.006>>.

NADALIN, M. **Estudo imunoistoquímico da expressão de α -actina de músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos**. 2008. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade De Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

NISHIDA, Y. et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. **Cancer Res**, v. 68, n. 21, p. 9096-104, Nov 1 2008. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2522>>.

OMAR, N. F. et al. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. **J Mol Histol**, v. 42, n. 6, p. 505-11, Dec 2011. ISSN 1567-2379. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s10735-011-9356-0>>.

PAIVA, K. B. et al. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodeling modulated by MMP/RECK balance. **J Mol Histol**, v. 40, n. 3, p. 201-7, Jun 2009. ISSN 1567-2379. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-009-9231-4> >.

PHILIPSEN, H. P.; REICHART, P. A. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. **Oral Oncol**, v. 34, n. 5, p. 317-25, Sep 1998. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PIATTELLI, A. et al. Ki-67 expression in dentigerous cysts, unicystic ameloblastomas, and ameloblastomas arising from dental cysts. **J Endod**, v. 28, n. 2, p. 55-8, Feb 2002. ISSN 0099-2399 (Print)0099-2399. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PINHEIRO, J. J. et al. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. **Histopathology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, Jul 2004. ISSN 0309-0167 (Print)0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01902.x> >.

PHILIPSEN, H. et al. Neoplasmas e lesões semelhantes originando-se a partir do aparelho odontogênico e do esqueleto maxilofacial: Introdução. In: LYON (Ed.). **World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours**, 2005a. p.285.

RAMOS, G. D. O. et al. Odontogenic tumors: a 14-year retrospective study in Santa Catarina, Brazil. **Braz Oral Res**, 2014.

RANDALL, L. E.; HALL, R. C. Temporospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. **Connect Tissue Res**, v. 43, n. 2-3, p. 205-11, 2002. ISSN 0300-8207 (Print)0300-8207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

REICHART, P.; PHILIPSEN, H.; SONNER, S. Ameloblastoma: Biological Profile of 3677 Cases. **Oral Oncol, Eur J Cancer**, v. 31B, n. 2, 1995.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P. **Odontogenic tumors and allied lesions**. London: Quintessence Publishing Co Ltd, 2004.

RIBEIRO, B. F. et al. Immunoeexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. **Oral Dis**, v. 15, n. 7, p. 472-7, Oct 2009. ISSN 1354-523x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01575.x> >.

ROSENSTEIN, T. et al. Cystic ameloblastoma--behavior and treatment of 21 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 59, n. 11, p. 1311-6; discussion 1316-8, Nov 2001. ISSN 0278-2391 (Print)0278-2391. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/joms.2001.27522> >.

ROTHOUSE, L. S.; MAJACK, R. A.; FAY, J. T. An ameloblastoma with myofibroblasts and intracellular septate junctions. **Cancer**, v. 45, n. 11, p. 2858-63, Jun 1 1980. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAHLBERG, C. et al. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. **Eur J Oral Sci**, v. 107, n. 2, p. 121-30, Apr 1999. ISSN 0909-8836 (Print)0909-8836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANTOS, J. N. et al. Odontogenic tumors: analysis of 127 cases. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pob/v15n4/a07v15n4.pdf> >.

SIQUEIRA, A. S. et al. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. **Histopathology**, v. 57, n. 1, p. 128-37, Jul 2010. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03596.x> >.

SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol**, v. 35, n. 6, p. 583-9, Nov 1999. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SMITH, S. M.; BARTOV, S. A. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. **J Oral Pathol**, v. 15, n. 5, p. 284-6, May 1986. ISSN 0300-9777 (Print)0300-9777. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOUSA, F. B. et al. Pediatric oral lesions: a 15-year review from Sao Paulo, Brazil. **J Clin Pediatr Dent**, v. 26, n. 4, p. 413-8, Summer 2002. ISSN 1053-4628 (Print)1053-4628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKATA, T. et al. Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. **Virchows Arch**, v. 436, n. 4, p. 319-23, Apr 2000. ISSN 0945-6317 (Print)0945-6317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 5, p. 349-63, May 2002. ISSN 1471-0072 (Print)1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm809> >.

VERED, M. et al. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral Oncology**, v. 41, n. 10, p. 1028-1033, 2005a. ISSN 0964-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139563> >.

WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **Faseb j**, v. 5, n. 8, p. 2145-54, May 1991. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHONG, M. et al. [The study of the invasive biologic behavior of ameloblastoma]. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 39, n. 1, p. 45-8, Jan 2004. ISSN 1002-0098 (Print)1002-0098. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

Apêndices

APÊNDICE A - Metodologia Expandida

Aspectos legais e éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH), sob o número 1055/10 (Anexo A), bem como pelo Hospital Universitário e pelo Departamento de Patologia da UFSC.

Seleção da amostra

As amostras estudadas foram selecionadas nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC) e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC (SAP-HU-UFSC), por meio dos diagnósticos de AM realizados nesses serviços. Foram selecionadas as lâminas coradas em HE e os blocos de parafina contendo fragmentos de tecido obtido através de biópsia incisional ou excisional. Para a realização da técnica imunoistoquímica, foram selecionados 18 casos onde era possível observar a presença de epitélio ameloblástico e estroma tumoral. Foram excluídos da amostra os casos que possuíam abundante presença de infiltrado inflamatório. Foram selecionados 8 folículos pericoronários de terceiros molares completamente inclusos, comprovados radiograficamente, e livres de processo inflamatório, para controle da expressão imunoistoquímica nos tecidos odontogênicos normais. Os casos de AM foram divididos de acordo com suas características clínico-radiográficas (Tabela 6) em dois grupos, AS, composto por 13 casos de Ameloblastomas sólidos e AU, com 5 casos de Ameloblastomas unicísticos. O grupo controle, FP, foi composto por 8 casos de folículos pericoronários. Os 13 casos de AS ainda foram avaliados conforme a presença de áreas de proliferação sólida e áreas cística.

Análise microscópica

As lâminas coradas em HE foram analisadas em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico prévio de AM. Para essa avaliação foram confeccionadas novas lâminas dos casos selecionados, coradas em HE.

Procedimentos laboratoriais

As amostras foram submetidas à técnica de imunistoquímica pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos, sendo estes: placenta (MMP-1), carcinoma de mama (MMP-2), medula (MMP-9), hiperplasia fibrosa inflamatória e vasos sanguíneos como controle interno (miofibroblastos - α -SMA) e carcinoma epidermóide (Ki-67). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

A desparafinização dos cortes foi realizada mantendo as lâminas em estufa a 65°C, durante 3 horas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a dois banhos em xilol em temperatura ambiente (TA), primeiro, imersas de um dia para o outro (*overnight*), e o segundo durante 20 minutos. Continuando a reidratação dos cortes, foram realizados 3 banhos em álcool etílico absoluto, 1 banho em álcool etílico 95%, 1 banho em álcool etílico 85% e 2 banhos em água destilada, todos de 5 minutos cada. Para realizar o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas na solução de peróxido de hidrogênio (50 ml de PBS + 50 ml de álcool metílico + 1 ml de H₂O₂) durante 20 minutos, e posteriormente submetidas à solução de peróxido de hidrogênio 3% (90 ml de álcool metílico + 10 ml de H₂O₂) durante 10 minutos. A reativação antigênica foi realizada mantendo as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria durante 40 minutos em temperatura constante de 96°C. Posteriormente as lâminas foram removidas do banho-maria e 30 minutos foram aguardados para que a solução, onde estavam imersas, atingisse a TA. Mais 2 banhos de 5 minutos em PBS foram realizados. A incubação com os anticorpos primários (Quadro 1) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), durante 18 horas. Foram feitos 2 banhos de 5 minutos cada em PBS e seguiu-se com a incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG biotinado (Dako, Dinamarca) durante 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas com streptavidina-biotina-peroxidase durante mais 30 minutos, e novamente 2 banhos, de 5 minutos cada, em PBS. Os cortes foram submetidos à coloração com a solução cromógena DAB (Dako, Dinamarca), com exposição de cada corte por no máximo 5 minutos. Posteriormente foram submetidas a 1 banho em água destilada por 5 minutos e a contracoloração com Hematoxilina de Harris, com exposição de 2,5 minutos. A remoção do pigmento formólico deu-se por rápida imersão das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônia 1%, e subsequente lavagem em água corrente durante 2 minutos. Os cortes foram novamente desidratados

com uma sequência de 1 banho em álcool etílico 85%, 1 banho em álcool etílico 95% e 3 banhos em álcool etílico absoluto, durante 5 minutos cada. Por fim, mais 2 banhos em xilol durante 20 minutos cada, e a montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck, Alemanha). Após montadas, as lâminas foram preservadas em estufa (40°C) por no mínimo 24 horas.

Análise imunoistoquímica

A análise das reações imunoistoquímicas foi realizada utilizando o software NIH ImageJ 1.45q (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica (Cannon, A620, San Jose, CA, USA) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400X.

Para cada anticorpo, em cada caso, foi avaliada a frequência e local de marcação, bem como a análise quantitativa da expressão.

A imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais (positivas e negativas) em até 10 campos consecutivos, sendo posteriormente realizada a média de células positivas para cada caso, multiplicando-se o total de células positivas por 100 e dividindo-se esse valor pelo total de células epiteliais.

A avaliação para MMP-1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma, foi obtida individualmente no estroma e no epitélio, através da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do epitélio ou estroma em cada campo (pixels totais), em 10 campos consecutivos para cada caso, quando avaliamos o revestimento epitelial removemos da imagem a porção referente ao tecido conjuntivo e quando avaliamos o tecido conjuntivo removemos da imagem a porção referente ao tecido epitelial. No estroma também foram excluídas as células inflamatórias e endoteliais. Essas exclusões foram realizadas com auxílio da programa ImageJ, onde era possível selecionar essas porções e remove-las das imagens.

Para verificar a presença de MFs foi observada a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) nos fibroblastos presentes na cápsula de tecido conjuntivo fibroso, logo abaixo do revestimento epitelial. A avaliação do antígeno α -SMA foi realizada através da contagem do total de células positivas para cada campo, no total de 10 campos consecutivos para cada caso, sendo posteriormente realizada a média de

células positivas para cada caso, somando-se o total de células positivas em todos os campos e dividindo-se pelo total de campos. Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e células nas proximidades dos vasos sanguíneos, pois essas células podem interferir nos resultados devido a expressão de α -SMA.

As informações obtidas nas análises foram armazenadas em um banco de dados criado com o auxílio do *EpiData 3.1* (*EpiData Association, Odense, Denmark*), e exportadas para uma planilha do *software Microsoft Excell®* (*Microsoft Office Corporation*).

Análise estatística

Para realizar a comparação entre os grupos AS, AU e FP, a partir dos resultados da análise quantitativa, para cada anticorpo estudado, foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, teste não paramétrico para comparar 3 ou mais amostras independentes.

Para comparar os resultados entre espécimes com área de proliferação sólida e espécimes com área cística, foi aplicado o teste estatístico de Mann Whitney, teste não paramétrico para comparar 2 amostras independentes.

Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas/ área corada \pm os desvios-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de $P \leq 0,05$ para dados com significância estatística.

APÊNDICE B – Tabela com os valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado.

Tabela 2. Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado

G	MMP-1				MMP-2				MMP-9				Ki-67		MFs	
	Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
AS	28.69	6.53	2.81	1.21	16.72	2.86	0.45	0.18	17.11	3.42	2.39	0.50	19	4.76	39.90	22.18
	17.70	4.88	3.89	1.90	23.62	3.62	3.16	0.89	16.27	4.86	1.29	0.16	5	2.29	87.60	38.03
	12.09	2.81	1.06	0.20	13.76	1.61	3.21	0.81	14.15	0.77	5.50	1.69	0	0	46.35	25.31
	15.19	2.74	1.70	0.95	19.76	3.63	2.61	2.41	11.24	1.26	1.91	0.47	5	5.72	58.30	19.63
	21.89	6.54	4.88	3.58	31.42	2.54	2.59	0.63	32.07	2.74	5.32	3.13	2	1.61	87.43	23.73
	17.74	3.75	4.77	3.05	8.82	1.32	1.36	1.68	29.27	4.11	1.83	0.62	0	0	57.76	24.31
	29.72	9.72	2.28	1.29	16.20	2.75	1.86	0.22	39.72	4.99	9.36	1.13	10	10.41	92.30	23.76
	7.32	2.80	0.13	0.15	13.03	1.02	1.72	0.36	50.70	3.39	6.88	1.84	0	0	41	16.81
	11.07	6.29	0.56	0.36	21.16	1.86	0.70	0.40	30.74	1.67	5.79	0.57	16	3.48	43.25	19.41
	2.23	1.66	0.80	0.07	8.22	1.77	0.26	0.08	16.89	2.35	4.61	1.49	3	0.48	31.80	30.63
	3.73	3.34	0.96	0.52	19.62	2.55	2.41	0.06	30.85	8.34	5.62	0.87	12	2.23	42.75	13.01
	7.12	6.13	0.77	0.40	23.44	3.51	1.05	0.16	25.05	3.56	4.30	0.39	13	3.04	56.50	22.70
11.12	8.15	0.60	0.08	16.74	2.34	0.35	0.03	39.21	4.99	3.15	0.58	5	0.68	19.40	11.45	
AU	21.95	2.55	4.99	0.77	28.68	2.49	1.78	0.28	30.91	2.43	2.55	0.78	3	0.13	63.80	18.27
	16.60	9.06	1.95	1.40	40.75	3.38	5.24	1.53	40.76	4.30	17.53	5.42	1	0.06	48.10	18.60
	24.91	5.90	1.32	0.66	23.61	0.89	4.35	0.82	31.23	4.56	9.95	2.09	24	7.09	25.33	9.34
	25.01	3.22	4.06	1.41	29.43	1.96	2.27	0.36	24.47	2.06	1.80	0.18	3	2.03	57.30	15.97
	26.48	11.3	4.29	0.99	24.27	11.55	1.69	0.25	26.48	4.03	4.98	1.14	9	1.68	32.92	10.40
FP	24.66	5.87	1.21	0.60	22.92	0.89	0.19	0.06	19.76	0.79	11.11	3.55	2	0.95	25.4	16.81
	40.10	11.85	1.03	0.80	21.93	0.73	2.77	0.89	43.73	5.25	16.41	2.55	27	21.18	42.6	25.70

G	MMP-1				MMP-2				MMP-9				Ki-67		MFs	
	Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
FP	27.9	14.35	2.79	1.25	28.16	0.9	2.62	0.43	22.52	1.18	13.11	2.55	0	0	37.75	28.57
	29	10.19	1.95	0.85	26.56	1.01	2.25	0.21	19.08	1.13	20.37	0.88	0	0	22	10.58
	28.53	14.07	2.38	0.80	31.86	1.28	0.83	0.13	26,78	1.28	14,75	2.25	0	0	55.9	22.18
	41.66	13.25	3.25	1.68	24.04	0.28	0.78	0.19	14.13	0.73	15.49	2.23	0	0	49.6	19.80
	25.17	9.62	3.29	0.12	25.56	2.62	0.92	0.19	33.46	3.32	17.14	3.34	0	0	24.42	7.72
	37.98	11.0	1.53	0.49	34.48	2.8	1.66	0.54	34.79	2.80	9.64	1.37	0	0	38.2	17.78

Grupo: G1 – Ameloblastomas Sólidos; G2 – Ameloblastomas Unicísticos; G3 – Folículos Pericoronários.

Desvio-padrão: DP.

Média: M

APÊNDICE C – Tabela com as principais características clínicas e radiográficas dos casos estudados.

Tabela 3. Principais características clínicas e radiográficas dos casos estudados

Variável	Categoria	N (total)	N (%)
Idade (anos)	<18	3	17
	18-32	9	50
	>32	6	33
Etnia	Leucoderma	14	78
	Melanoderma	3	17
	Feoderma	1	5
Gênero	Feminino	10	56
	Masculino	8	44
Tempo de evolução (meses)	<6	6	33
	6-12	6	33
	>12	6	33
Localização da lesão	Mandíbula – região posterior	12	67
	Mandíbula – região anterior	6	33
Aumento de volume – ao exame físico	Intra-oral	17	94
	Extra-oral	8	44
Consistência à palpação	Óssea	10	56
	Crepitação papirácea	2	11
	Flutuante	9	50
Sintomatologia	Ausente	12	67
	Presente	6	33
Tratamento prévio	Sim	5	28
	Não	13	72
Padrão RX	Radiolúcida Multilocular	13	28
	Radiolúcida Unilocular	5	72
Envolvimento dental	Sim	3	17
	Não	15	83
Reabsorção radicular	Ausente	14	78
	Presente	4	22
Deslocamento dental	Ausente	16	89
	Presente	2	11
Padrão histopatológico	Sólido	13	72
	Unicístico	5	28

Anexos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



CERTIFICADO Nº 1055

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 584/GP/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

APROVADO

PROCESSO: 1055 **FR:** 371735

TÍTULO: Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo

AUTOR: Eliana Riet Correa Ribeiro, Grazieli de Oliveira Ramos

FLORIANÓPOLIS, 25 de Outubro de 2010.

Coordenador do CEPSH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
 Coordenador do CEPSH/UFSC