

Trabalho de Conclusão de Curso

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE KI-67 E α -SMA EM AMELOBLASTOMAS, CERATOCISTO ODONTOGÊNICO E FOLÍCULO PERICORONÁRIO

LIGIA FIGUEIREDO VALESAN



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Ligia Figueiredo Valesan

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE KI-67 E α -SMA EM
AMELOBLASTOMAS, CERATOCISTO ODONTOGÊNICO E
FOLÍCULO PERICORONÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Odontologia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial para
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.
Orientadora: Prof^a. Kamile Leonardi Dutra
Horstmann
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Elena Riet
Correa Rivero

Florianópolis
2017

Ligia Figueiredo Valesan

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE KI-67 E α -SMA EM
AMELOBLASTOMAS, CERATOCISTO ODONTOGÊNICO E
FOLÍCULO PERICORONÁRIO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de outubro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Kamile Leonardi Dutra Horstmann
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientadora

Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Profª. Dra. Grasieli de Oliveira Ramos
Universidade do Oeste de Santa Catarina
Membro

Profª. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva
Universidade Federal de Santa Catarina
Suplente

Dedico este trabalho a **Deus**, por guiar meus passos e abençoar meus projetos de vida.

Aos meus pais, **Lair e Édina**, por nunca medirem esforços para a minha formação e por serem minha fonte de inspiração e tranquilidade.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela minha vida, por me guiar pelos melhores caminhos e por destinar a mim os seus melhores anjos da guarda, sinto-me infinitamente grata e abençoada.

A **Universidade Federal de Santa Catarina**, principalmente ao curso de graduação em Odontologia, seu corpo docente e os funcionários (direção, administração e limpeza) que trabalham todos os dias e contribuem de alguma forma para a construção do conhecimento.

A Prof^a **Dra. Kamile Leonardi Dutra Horstmann**, orientadora, pela dedicação incondicional não só a este trabalho, mas a tudo o que faz, com a paciência e a inteligência que compete a uma excelente docente, executa suas funções com dedicação, carinho e atenção. Não tenho palavras para agradecer toda a sua ajuda, você fez com que este momento tortuoso para muitos se tornasse leve e agradável para mim.

A Prof^a **Dra. Elena Riet Correa Rivero**, co-orientadora, pelo apoio, correções, dicas, palavras de incentivo e preocupação em desenvolver esta pesquisa da melhor forma possível.

Aos meus pais, **Lair e Édina**, meus exemplos de perseverança, honestidade, garra e fé. Não consigo expressar em palavras tamanho amor e gratidão que sinto, sem o apoio incondicional de vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. Cada palavra de incentivo nas horas difíceis e o reconhecimento nas horas alegres me fizeram acreditar em cada sonho, e ao lado de vocês muitos deles estão se tornando realidade. Vocês são meu porto seguro, meu acalento, minha felicidade, minha fonte de inspiração. Amo vocês!

A minha dupla querida, **Thaiane**, amiga para todos os momentos, minha confidente e detetive. Passamos por todos os momentos da faculdade juntas, desde a primeira fase, dividindo alegrias, tristezas, frustrações e conquistas, uma dando apoio à outra. Chegar até aqui com você ao meu lado torna este momento ainda mais especial. Agradeço muito a Deus por ter conhecido-a, você é um grande presente para mim. Obrigada por tudo, conte comigo para sempre!

Aos **professores** que participaram ativamente do meu crescimento profissional e pessoal ao longo da graduação, principalmente aqueles que têm o dom da docência, aqueles que fazem o que gostam e que transmitem seu conhecimento de forma descomplicada e competente. Não poderia deixar de citar aqui o Professor **Daltoé**, que é um desses exemplos, que tem um lugar especial guardado no coração da 13.1, sempre participando de

nossos eventos e lutando por nossas causas, fazendo com que a temida patologia bucal fosse mais suave, com músicas descontraídas no começo da aula e sua inteligência admirável.

As professoras **Dra. Grasieli de Oliveira Ramos** e **Dra. Carolina Amália Barcellos Silva** por aceitarem fazer parte da minha banca e por terem sido tão receptivas e acessíveis. Especialmente a Prof^a Dra. Grasieli de Oliveira Ramos que contribui significativamente com suas pesquisas em relação ao assunto abordado neste trabalho.

Aos meus **amigos**, por serem parte da minha existência, por compartilharem conversas, alegrias, sonhos, resumos e medos. Com certeza, cada um de vocês ficará guardado no meu coração de alguma forma, boa sorte a todos nesta nova etapa da vida e um até breve.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Os tumores odontogênicos (TOs) compreendem um grupo complexo de lesões dos ossos gnáticos, com apresentações histopatológicas e comportamentos clínicos diversos. Dentre os TOs, o ameloblastoma destaca-se por estar entre os mais frequentes e apresentar grande importância clínica vinculada à natureza neoplásica, agressiva, infiltrativa e recidivante. Em janeiro de 2017 foi publicada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) a 4ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, na qual a classificação e a nomenclatura dos tumores ósseos odontogênicos e maxilofaciais foi revisada e atualizada. A decisão mais controversa foi mover o tumor odontogênico ceratocístico (TOC) novamente à categoria de cisto e renomeá-lo para ceratocisto odontogênico (CO). Os cistos são lesões odontogênicas benignas que podem atingir grandes dimensões, porém, o CO desperta atenção pela possibilidade de ser agressivo e altamente recidivante. O objetivo deste trabalho consiste na análise imunohistoquímica da presença de miofibroblastos (α -SMA) e da proliferação celular (Ki-67) em lesões de CO e ameloblastomas comparando-os ao grupo controle constituído por casos de folículo pericoronário (FP) de terceiros molares completamente inclusos. Foram selecionadas as fotografias das lâminas histológicas das patologias em questão e do grupo controle que já haviam sido submetidas à técnica de imunohistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC). Os casos de ameloblastomas foram divididos de acordo com suas características clínico-radiográficas, seguindo a nova nomenclatura estabelecida pela 4ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço em: ameloblastoma (AM) e ameloblastoma unicístico (AU). As análises das reações imunohistoquímicas foram feitas por meio do *software* NIH Image J® 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 expressão de α -SMA foi observada nos miofibroblastos presentes no tecido conjuntivo próximo ao epitélio, através da contagem do total de células positivas e negativas por campo, em 10 campos consecutivos para cada caso. Posteriormente, foi calculada 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. Para o anticorpo Ki-67 foram consideradas as marcações nucleares

das células epiteliais da camada basal e supra basal. Foram contadas as células epiteliais positivas e negativas em 10 campos consecutivos. Posteriormente, foi realizada a média de células positivas para cada caso. Para comparar os resultados obtidos foi empregado o teste estatístico de *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*. Para ambos os marcadores, o teste estatístico de *Kruskal-Wallis* mostrou diferença estatística, cuja expressão foi maior em CO, quando comparado a AM/AU e FP. O teste de *Mann Whitney* comparou AM e AU, e não apontou diferença estatística em ambos os marcadores. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a expressão elevada dos anticorpos, Ki-67 e α -SMA, encontrada no CO pode estar relacionada ao comportamento biológico singular desta patologia. Bem como, a expressão semelhante encontrada nos casos de AM, AU e FP pode demonstrar que este último não é um tecido quiescente como o esperado.

Palavras-chave: Ameloblastoma. Tumores odontogênicos. Saco dentário. Miofibroblastos. Antígeno Ki-67.

ABSTRACT

Odontogenic tumors (OTs) comprise a complex group of lesions, with distinct histopathological presentations and clinical behaviors. Among the OTs, ameloblastoma stands out as being the most common and presenting great clinical importance linked to the neoplastic, aggressive, infiltrative, and recurrent nature. In January 2017, the World Health Organization published the 4th edition of the World Classification of Head and Neck Tumors, where the classification and nomenclature of odontogenic and maxillofacial bone tumors were reviewed and updated. The most controversial decision was to move the nematocyst odontogenic tumor (KOT) back to the cyst category and rename it to odontogenic nematocyst (OK). Cysts are benign odontogenic lesions that can reach large dimensions, but the CO calls attention because it is aggressive and highly recurrent. This work aims to evaluate the presence of myofibroblasts (α -SMA) and cellular proliferation index (Ki-67) in OK lesions and ameloblastomas comparing them to a control group of pericoronal follicles (PF) from impacted third molars. Samples of OK ameloblastomas and PF which have been submitted to the immunohistochemical technique by the streptavidin-biotin-peroxidase method at the Oral Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (LPB-UFSC) were selected. The cases of ameloblastomas were divided according to their clinical and radiographic characteristics, following the new nomenclature established by the 4th edition of the World Classification of Head and Neck Tumors in ameloblastoma (AM) and unicystic ameloblastoma (UA). The analysis of immunohistochemical reactions was done using NIH Image J® 1.45q software from images captured with a light microscope-coupled photographic camera, with a magnitude of 400x. The presence of myofibroblasts was observed through the expression of α -SMA in the fibroblasts present in the connective tissue near the epithelium. The evaluation of the α -SMA was performed by counting the total positive cells per field, in 10 consecutive fields for each case. Subsequently, the mean of positive cells were calculated for each case. For the Ki-67, the nuclear staining of the epithelial cells was considered. Positive and negative epithelial cells were counted in 10 consecutive fields. Subsequently, the mean of positive cells was assessed for each case. The Kruskal-Wallis and Mann Whitney statistical tests were used to compare the results. For both markers, the Kruskal-Wallis statistical test showed statistical difference, whose expression was higher in CO, when compared to AM / UA and PF.

The Mann Whitney test compared AM and UA, and showed no statistical difference, in both markers. Based on the results obtained it can be concluded that high expression of antibodies, Ki-67 and α -SMA, found at the CO may be related to different biological behavior of this pathology. And the similar expression found in cases of AM, UA and PF, can demonstrate that the latter is not a quiescent tissue as expected.

Keywords: Ameloblastoma. Odontogenic tumors. Dental sac. Myofibroblasts. Antigen Ki-67.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Análise imunohistoquímica (streptavidina-biotina- peroxidase, 400X), expressão nuclear de Ki-67 no epitélio.....46
- Figura 2- Análise imunohistoquímica (streptavidina-biotina- peroxidase, 400X), expressão citoplasmática de α -SMA no tecido conjuntivo.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Anticorpos utilizados.....	31
--------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da comparação entre os 3 grupos.....	33
Tabela 2 - Comparação entre os 3 grupos para Ki-67.....	33
Tabela 3 - Comparação entre os 3 grupos para α -SMA.....	34
Tabela 4 - Comparação entre AM e AU.....	34
Tabela 5 - Correlação entre a marcação dos anticorpos Ki-67 e α -SMA.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -SMA** – alfa actina de músculo liso
AE – ameloblastoma extraósseo
AM – ameloblastoma
AU – ameloblastoma unicístico
BAX – *associated protein X*
BCL2 – *B cell lymphoma protein 2*
CD-10 – neprilisina
CEPSH – comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CO – ceratocisto odontogênico
DP – desvio-padrão
FP – folículo pericoronário
G – grupo
HU – hospital universitário
Ki-67 – proteína não-histona de proliferação celular
LPB – laboratório de patologia bucal
MCM3 – *minichromosome maintenance proteins 3*
MFs – miofibroblastos
OMS – organização mundial da saúde
p – valor de significância
PCNA – antígeno nuclear da proliferação celular
PTCH1 – *drosophila patched gene 1*
p38MAPK – *phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase*
p53 - protooncogene
SCNCB – síndrome do carcinoma nevoide de células basais
TOC – tumor odontogênico ceratocístico
TOs – tumores odontogênicos
UFSC – universidade federal de santa catarina
uPA – *urokinase plasminogen activator*

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa

% – por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. ARTIGO	26
3.1 <i>Title page</i>	26
3.2 <i>Abstract</i>	27
3.3 <i>Main text</i>	28
3.3.1 <i>Introduction</i>	28
3.3.2 <i>Material and methods</i>	31
3.3.3 <i>Results</i>	32
3.3.4 <i>Discussion</i>	34
4. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
FIGURA 1	46
FIGURA 2	47
APÊNDICE A - Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado para o marcador Ki-67.....	48
APÊNDICE B - Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado para o marcador α -SMA	50
ANEXO A - Comitê de ética.....	52
ANEXO B – Ata de apresentação do trabalho de conclusão de curso.....	56

1. INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos (TOs) abrangem um grupo vasto de lesões com apresentações histopatológicas e comportamentos clínicos diversos. Algumas lesões são neoplasias verdadeiras e outras podem apresentar-se como hamartomas (NEVILLE *et al.*, 2009). Os TOs são considerados lesões neoplásicas raras de difícil diagnóstico e terapêutica desafiadora (HENRIQUES *et al.*, 2008), os quais se desenvolvem exclusivamente nos ossos gnáticos a partir do epitélio odontogênico, ectomesênquima ou ambos (ROBBINS *et al.*, 2010). No Brasil, os estudos relatam que a incidência dessas lesões está entre 2,4% (SANTOS *et al.*, 2001) e 6,8% (SOUSA *et al.*, 2002) de todas as lesões bucais diagnosticadas.

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS), durante a 3ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, reorganizou a classificação histológica dos TOs e o Ceratocisto Odontogênico foi renomeado para Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC) e designado como um tumor benigno derivado do epitélio odontogênico (HENRIQUES *et al.*, 2008). Porém, em janeiro de 2017 foi publicada pela OMS a 4ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, na qual a classificação e a nomenclatura dos tumores ósseos odontogênicos e maxilofaciais foi revisada e atualizada, a fim de fornecer uma classificação de consenso contemporâneo à comunidade de patologistas de cabeça e pescoço (WRIGHT e VERED, 2017).

A decisão mais controversa na reclassificação de 2017 foi mover o TOC novamente à categoria de cisto e renomeá-lo para Ceratocisto Odontogênico (CO) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A nova edição também contempla a mudança de terminologia dos ameloblastomas ficando mais simplificada. Estabelecendo-se da seguinte maneira: ameloblastoma (AM), ameloblastoma unicístico (AU) e ameloblastoma extraósseo/periférico (AE) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). O adjetivo "sólido/multicístico" antes usado para ameloblastoma multicístico/sólido foi descartado por não possuir significância biológica e gerar confusão com o ameloblastoma unicístico (WRIGHT e VERED, 2017).

Os cistos são lesões odontogênicas benignas que podem atingir grandes dimensões, dentre eles o CO desperta atenção pela possibilidade de ser agressivo e recidivante (SHEAR *et al.*, 2003; PHILIPSEN *et al.*, 2005). De acordo com sua origem, os cistos odontogênicos são subclassificados em cistos de desenvolvimento ou inflamatórios (NEVILLE *et al.*, 2009). O

CO é classificado como um cisto de desenvolvimento benigno que particularmente apresenta características histopatológicas e de comportamento clínico específico (NEVILLE *et al.*, 2009).

Há um consentimento de que a origem do CO ocorre a partir dos restos epiteliais da lâmina dental, e que seu crescimento e desenvolvimento podem estar relacionados a fatores ainda desconhecidos (NEVILLE *et al.*, 2009). Este tipo de lesão tem preferência por homens na faixa etária da primeira até a quarta década de vida. Tem predileção por posterior de mandíbula e tende a crescer na direção ântero-posterior, dentro da cavidade medular dos ossos gnáticos, sem causar expansão óssea evidente sem reabsorver raízes dentárias. Esta peculiaridade pode ser útil no diagnóstico diferencial, pois os cistos dentígero e radicular de tamanho comparável geralmente estão associados à expansão óssea (NEVILLE *et al.*, 2009).

Destaca-se na patogênese deste cisto a mutação do gene supressor de tumor (PTCH1) dentre outras alterações genéticas e epigenéticas (BARRETO *et al.*, 2000). Lesões múltiplas de CO, frequentemente, estão associadas à síndrome do carcinoma nevoide de células basais (SCNCB) ou Síndrome de Gorlin (PHILIPSEN *et al.*, 2005). O CO pode ser uma das primeiras manifestações da SCNCB, ocorrendo, geralmente, nas primeiras décadas de vida (YAMAMOTO *et al.*, 2011).

Histologicamente, o CO apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, friável e delgada com revestimento epitelial composto por uma camada uniforme de epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, com camada basal composta por células epiteliais colunares dispostas em paliçada. A interface epitélio-conjuntivo é plana. O lúmen cístico pode conter um líquido claro semelhante à transudato seroso ou pode estar preenchido por um material caseoso que microscopicamente consiste em restos de ceratinócitos. Pode haver pequenos cistos, cordões ou ilhas satélites de epitélio odontogênico na cápsula fibrosa (NEVILLE *et al.*, 2009). Radiograficamente, apresenta-se como uma lesão radiolúcida, unilocular de margens festonadas bem definidas.

São também contemplados nesta pesquisa os TOs epiteliais benignos, com atenção especial para o ameloblastoma (AM) e o ameloblastoma unicístico (AU) devido a sua alta frequência, grande importância clínica, crescimento local persistente e habilidade em produzir deformidades marcantes antes de provocar debilidades graves. Com prevalência de aproximadamente 30% dentre os tumores odontogênicos benignos, os ameloblastomas (YAMAMOTO *et al.*, 2011) tem origem a partir do epitélio reduzido do órgão do esmalte ou restos epiteliais da

lâmina dentária ou revestimento epitelial de cistos ou então de células basais da mucosa oral (NEVILLE *et al.*, 2009). Acredita-se que a desregulação de diversos genes envolvidos no desenvolvimento normal de um dente pode contribuir para sua patogênese (GARDNER *et al.*, 2005).

Pesquisas afirmam que os ameloblastomas aumentam de tamanho lentamente e são localmente invasivos (ONGUTI *et al.*, 1997), apresentando prevalências distintas: 86% dos casos de AM, 13% dos casos de AU e 1% dos casos de AE (NEVILLE *et al.*, 2009). O AM representa a maioria dos casos, é o mais agressivo (REICHART, PHILIPSEN e SONNER, 1995; GARDNER *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2009; FREGNANI *et al.*, 2010) e exibe índice de recidiva de até 95% após simples curetagem (NEVILLE *et al.*, 2009) e de até 31% após curetagem e crioterapia (FREGNANI *et al.*, 2010). O AM tem preferência pela 3ª até a 7ª década de vida enquanto que o AU atinge, preferencialmente, pacientes na 2ª década de vida e ambos não tem preferência por gênero. Radiograficamente, o AM pode apresentar-se uni ou multilocular de limites imprecisos, deslocamento e reabsorção dental e expansão de cortical. O AU manifesta-se como uma lesão radiolúcida unilocular de limites bem definidos.

Histologicamente, o AM possui o padrão folicular, o mais comum da categoria, apresentando ilhas de epitélio em meio a um estroma maduro de tecido conjuntivo fibroso. Os ninhos epiteliais possuem uma região central de células angulares arranjadas frouxamente. Cercando esta região central há uma camada única de células colunares altas que apresentam polaridade reversa. Existe ainda o padrão plexiforme, menos comum do que o folicular, que consiste em cordões de epitélio odontogênico longos e anastomosados delimitados por células colunares ou cúbicas, circundando as células epiteliais arranjadas mais frouxamente. O estroma de suporte tende a ser vascular e arranjado frouxamente (NEVILLE *et al.*, 2009).

O AU apresenta três variantes histopatológicas. A primeira é o AU luminal que consiste em uma parede cística fibrosa com revestimento composto total ou parcialmente por epitélio ameloblástico com camada basal de células colunares ou cúbicas. O núcleo hiper cromático apresenta polaridade reversa e vacuolização citoplasmática basilar. As células epiteliais apresentam-se frouxamente coesas. A segunda variante é o AU intraluminal em que nódulos do ameloblastoma se projetam do revestimento cístico em direção ao lúmen. E, por último, o AU mural em que a parede fibrosa do cisto está infiltrada por ameloblastoma típico folicular ou plexiforme (NEVILLE *et al.*, 2009).

Dentre os TOs diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB - UFSC), os ameloblastomas foram a segunda lesão mais frequente, representando 23% de todos os casos diagnosticados, dentre eles, 61% eram AM e 39% AU. Na época, o CO era considerado um TO e foi a primeira lesão mais frequente diagnosticada pelo laboratório (RAMOS *et al.*, 2014).

No presente estudo, os tecidos patológicos foram comparados ao grupo controle, formado por espécimes teciduais de folículo pericoronário (FP). O FP é uma estrutura embriológica, de origem ectomesenquimal, que envolve o germe dentário durante a odontogênese. Após a formação do esmalte, a coroa do dente em desenvolvimento é envolvida pelo epitélio reduzido do órgão do esmalte e pelo folículo dentário, estruturas que formam o FP, e protegem o elemento dental durante a erupção (ADELSPERGER *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2015).

Outro aspecto relevante desta pesquisa é o uso de marcadores biológicos como o Ki-67, por conta das informações que podem fornecer em relação ao diagnóstico e prognóstico das mais variadas neoplasias (ARISAWA *et al.*, 1999). Esse marcador é uma proteína não histônica, inicialmente se expressa em Gap 1 (G1), apresentando níveis aumentados em síntese (S) e Gap 2 (G2) e pico em mitose (M), mas está ausente nas células em repouso (G0) (MATOS *et al.*, 2012). A utilização do marcador de proliferação celular Ki-67 (antígeno nuclear associado ao ciclo celular) mostra, não só uma medida mais precisa da quantidade de células em proliferação, mas também a possibilidade de investigação das neoplasias humanas de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (ARISAWA *et al.*, 1999); (HALL e EMBERY, 1997). O anticorpo monoclonal Ki-67 é considerado um marcador confiável para identificar com precisão a atividade celular proliferativa e representar um indicador importante da agressividade e do potencial de recidiva das neoplasias (BROWN e GATTER, 1990).

Cosarca *et al.* (2016) realizaram a análise imunohistoquímica dos marcadores Ki-67, p53, MCM3 e PCNA em restos epiteliais de FP de dentes inclusos. Cujo objetivo era identificar uma possível correlação com a imunexpressão destes marcadores em lesões de CO e cisto dentífero. Obtiveram como resultado a marcação positiva em mais de 60% dos FP para todos os marcadores e houve também diferença estatística significativa entre CO e cisto dentífero para os marcadores Ki-67, p53 e MCM3. Segundo os autores, para determinar a capacidade proliferativa dos restos epiteliais do FP os marcadores Ki-67, PCNA e MCM3 são os mais úteis na

prática e são os mais propensos a ajudar na distinção entre cisto dentífero e CO. Para a marcação da camada basal, os marcadores Ki-67 e MCM3 são os mais sensíveis, da mesma forma que o marcador PCNA é o mais útil para a camada suprabasal. Aproximadamente 90% dos casos de FP mostraram-se positivos para Ki-67. Os autores ainda concluem que ao demonstrarem a capacidade proliferativa do FP, a hipótese de que a remoção dos dentes inclusos pode prevenir possíveis transformações císticas em tumorais pode ser reforçada.

Ahlem *et al.* (2015) investigaram a correlação entre os marcadores Ki-67 e CD-10 em lesões de ameloblastoma recidivantes. Os autores comprovaram haver relação estatística significativa entre a expressão dos marcadores CD-10 e Ki-67 e o grau de invasividade local e recorrência do ameloblastoma. Desta maneira, o índice de proliferação de Ki-67 parece ser um marcador importante para avaliação do prognóstico das neoplasias estudadas. Os autores ressaltaram que quando os marcadores Ki-67 e CD-10 são positivos deve-se fazer uma criteriosa preservação do paciente e em casos de recidiva da lesão, a opção pela cirurgia de ressecção é válida.

Outro importante marcador utilizado neste trabalho é o α -SMA, o qual permite avaliar a presença de miofibroblastos nos casos de CO, FP, AM e AU (DESMOULIERE, GUYOT e GABBIANI, 2004; NADALIN *et al.*, 2008). Os miofibroblastos (MFs) são fibroblastos que possuem características semelhantes ao de músculo liso, com capacidade contrátil e elevada expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) (NADALIN *et al.*, 2008). Inicialmente, acreditava-se que os MFs eram responsáveis pelo mecanismo defensivo de isolar a lesão e impedir a invasão de células malignas, porém, nos últimos anos, estudos têm demonstrado que a presença de MFs está relacionada à progressão tumoral, participando na modulação da angiogênese, facilitação da invasão das células tumorais e promoção da metastização, uma vez que, além de produzir colágeno, eles também são responsáveis pela síntese de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, favorecendo assim, o crescimento invasivo da lesão (VERED *et al.*, 2005; NADALIN, 2008).

De Oliveira Ramos *et al.* (2012) avaliaram a presença de miofibroblastos (α -SMA) e Ki-67 em casos de CO e FP. Os testes mostraram diferença estatística significativa para a marcação de Ki-67 sendo superior nos casos de CO. As células positivas para Ki-67 estavam localizadas, principalmente, na camada suprabasal e foram pouco expressas no FP. Já a marcação para α -SMA foi observada de maneira difusa pelo tecido conjuntivo tanto no CO quanto no FP, mostrando-se levemente

superior no FP. Os autores concluíram que a expressão elevada de Ki-67 pode estar relacionada ao comportamento biológico do CO em relação à agressividade local e ao alto grau de recidiva após tratamento conservador.

Dutra *et al.* (2014) fizeram a análise imunohistoquímica das metaloproteinases de matriz (1, 2 e 9), α -actina de músculo liso (α -SMA) e Ki-67 em ameloblastomas e FP, a fim de elucidar o comportamento biológico dessa neoplasia. Os resultados estatísticos para α -SMA demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os ameloblastomas e o FP, embora tenha se observado maior número de células positivas no tipo histológico anteriormente chamado de ameloblastoma sólido. E também não houve diferença estatística significativa da expressão de Ki-67 quando comparado o AM e AU com o FP. Os autores concluem que a expressão dessas proteínas está associada tanto ao comportamento tumoral do ameloblastoma como também com a remodelação tecidual do FP.

Syamala *et al.*, (2016) compararam o número médio de miofibroblastos presentes em lesões de cisto dentífero e CO com ameloblastomas. Com objetivo de investigar a correlação desta células com o comportamento biológico agressivo destas lesões, os pesquisadores fizeram a análise imunohistoquímica dos MFs marcados com α -SMA. Quando comparados os três grupos, os ameloblastomas expressaram o maior número de MFs e o cisto dentífero o menor número. Houve diferença estatística significativa entre o cisto dentífero e o CO, bem como entre o cisto dentífero e os ameloblastomas. Contudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de CO e ameloblastomas. Os autores concluíram que houve uma correlação positiva entre a contagem de MFs e o conhecido comportamento biológico das lesões.

No presente estudo, ao avaliar o índice proliferativo das células epiteliais, por meio do anticorpo Ki-67, e a presença de MFs, por meio do anticorpo α -SMA, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase que alia simplicidade, facilidade de manuseio pelos patologistas e amplo uso para diagnóstico. Este método combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas objetivando identificar componentes celulares ou tissulares através da reação com anticorpos específicos.

Aliando a técnica imunohistoquímica e os marcadores biológicos PCNA e Ki-67, Arisawa *et al.* (1999) concluíram que estes marcadores combinados com os dados clínicos e histopatológico fornecem informações úteis sobre o comportamento biológico e possível prognóstico da neoplasia,

além de auxiliarem na escolha da melhor terapia a ser utilizada. Os autores ressaltam que tanto o Ki-67 quanto o PCNA avaliam o número de células presentes no ciclo celular, mas não fornecem informações sobre o tempo em que cada célula completa o seu ciclo celular, podendo então, não indicar uma alta atividade proliferativa da neoplasia e sim um maior tempo no ciclo. O uso do Ki-67 tem se demonstrado superior ao do PCNA por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos, além de ter sua expressão celular aumentada nos períodos G2 e M do ciclo celular.

Meer *et al.* (2003) utilizaram os marcadores PCNA e Ki-67 para comparar a atividade proliferativa no ameloblastoma e ameloblastoma unicístico. As lesões foram processadas imunohistoquimicamente e através da contagem de células foi efetuada a análise estatística. Os resultados obtidos mostraram diferença estatística, em relação a atividade proliferativa, entre os subtipos estudados. O ameloblastoma unicístico teve maior expressão de PCNA e Ki-67 quando comparado ao outro subtipo. No entanto, os autores concluíram que não há relação entre a atividade proliferativa mostrada por estas proteínas e o comportamento biológico destas patologias. As altas taxas de recidiva do ameloblastoma podem estar relacionados à excisão incompleta da lesão e não à capacidade proliferativa da mesma, afinal, a morfologia complexa faz com que o prognóstico seja pior que o variante unicístico.

Tekkesin *et al.* (2012) investigaram a expressão dos marcadores BAX, BCL-2 e Ki-67 em CO comparando-o com lesões de ameloblastomas e cisto radicular. Cujo objetivo foi determinar o potencial de proliferação do CO em comparação aos ameloblastomas e cisto radicular. O epitélio de revestimento do CO mostrou maior expressão de Ki-67 quando comparado às lesões de ameloblastomas e cisto radicular. Concluindo que as altas expressões de Ki-67 no CO vão ao encontro do seu comportamento clínico agressivo e das altas taxas de recorrência.

Zhong *et al.* (2010) analisaram imunohistoquimicamente a expressão dos marcadores p38MAPK, uPA e Ki-67 em espécimes de ameloblastomas, CO, tumor odontogênico epitelial calcificante, tumor odontogênico adenomatoide, tumor odontogênico cístico calcificante e 5 FP. Dentre os 65 casos, 17 deram positivo para a proteína p38MAPK, 51, para uPA e 62, para Ki-67. Além disso, houve diferença estatística significativa na expressão dos marcadores p38MAPK, uPA e Ki-67 entre o grupo do FP e o grupo dos tumores odontogênicos epiteliais, sendo maior neste último. Os autores concluem que esses marcadores parecem desempenhar um papel

importante no processo de origem, desenvolvimento, invasão e proliferação dos tumores odontogênicos epiteliais.

Em 2013, Nafarzadeh *et al.* fizeram um estudo comparativo da expressão dos marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67 em 15 amostras de FP, cisto dentígero, ameloblastoma unicístico e ameloblastoma usando o método de imunohistoquímica. O coeficiente de correlação entre os dois marcadores foi de 0,88, mostrando correlação estatística positiva. Os níveis de expressão dos marcadores foram analisados através do teste estatístico do qui-quadrado cujos resultados foram significativos ($p \leq 0,05$) para os dois marcadores. O que justifica, segundo os autores, a recorrência e o diferente comportamento clínico das lesões.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar imunohistoquimicamente a presença de miofibroblastos (α -SMA) e da proliferação celular (Ki-67) em AM, AU, CO e FP.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de miofibroblastos, por meio da expressão da proteína α -actina de músculo liso, em AM, AU e CO em comparação ao FP.
- Verificar o índice proliferativo das células epiteliais, por meio da marcação do antígeno de proliferação Ki-67 em AM, AU e CO em comparação ao FP.
- Comparar a expressão de cada proteína estudada nos casos de AM, AU, CO e FP.
- Estabelecer possíveis ligações entre a expressão de Ki-67 e α -SMA dos casos estudados.
- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

3. ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Journal of Oral Pathology and Medicine* (acessada em 14/09/2017), exceto em relação ao idioma.

3.1 TITLE PAGE

Title: Análise imunohistoquímica de Ki-67 e α -SMA em ameloblastoma, ceratocisto odontogênico e folículo pericoronário.

Running title: Análise imunohistoquímica de Ki-67 e α -SMA.

Keywords: Ameloblastoma. Tumores odontogênicos. Saco dentário. Miofibroblastos. Antígeno Ki-67.

Authors: Valesan LF¹, De Oliveira Ramos G², Rivero ERC³, Dutra KL⁴.

¹Undergraduate student, School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. +55 49 99927-2077 lilivalesan@hotmail.com

² DDS, MSc, PhD. Dentistry course. West of Santa Catarina University, Joaçaba, Brazil. +55 48 996198474 grasieli.ramos@gmail.com

³ DDS, MSc, PhD, Adjunct Professor, School of Dentistry, Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. +55 48 98802-8784 riet.elena@gmail.com

⁴DDS, MSc, PhD candidate. Department of Dentistry. Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. +55 48 99662-4362 kamileldutra@gmail.com

Corresponding author: Dr. Kamile Leonardi Dutra; Federal University of Santa Catarina, Health Sciences Center, Department of Dentistry. Campus Universitário - Caixa Postal 476 – Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Zip code: 88040900; E-mail: kamileldutra@gmail.com

3.2 Abstract

Ameloblastoma (AM) and odontogenic keratocyst (OK), previously named as keratocystic odontogenic tumor, are benign odontogenic lesions characterized by local invasiveness and recurrence. The aim of this study was to perform an immunohistochemical analysis of the presence of myofibroblasts (α -SMA) and the cellular proliferation index (Ki-67) in those lesions comparing them to a control group consisted of pericoronal follicles (PF) from impacted third molars. Moreover, the cases of AM were classified according to the 4th edition of the World Classification of Head and Neck Tumors, and a group of unicystic ameloblastoma (UA) were also assessed. The immunohistochemical reactions were analyzed using the NIH Image J@ 1.45q software from images captured with a light microscope-coupled photographic camera, with a magnitude of 400x. The presence of myofibroblasts was observed through expression of α -SMA in the connective tissue near the epithelium. The evaluation of the α -SMA was performed by counting the total positive cells per field, in 10 consecutive fields for each case. Subsequently, the mean of positive cells was calculated for each case. For the ki-67, the nuclear markers of positive and negative epithelial cells were considered in 10 consecutive fields. Subsequently, positive cell averages were performed for each case. Statistical tests were used to compare the results obtained: Kruskal-Wallis and Mann Whitney. For both markers, the Kruskal-Wallis statistical test showed statistical difference, whose expression was higher in CO, when compared to AM/AU and PF. The Mann Whitney test compared AM and UA, and showed no statistical difference, in both markers. Based on the results obtained it can be concluded that high expression of antibodies, Ki-67 and α -SMA, found at the CO may be related to different biological behavior of this pathology. And the similar expression found in cases of AM, UA and PF, can demonstrate that the latter is not a quiescent tissue as expected.

Keywords: Ameloblastoma. Odontogenic tumors. Dental bag. Myofibroblasts. Antigen Ki-67.

3.3 Main text

3.3.1 Introduction

Em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS), durante a 3ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, reorganizou a classificação histológica dos tumores odontogênicos (TOs). O Ceratocisto Odontogênico foi renomeado para Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC), porém em janeiro de 2017 foi publicada pela OMS a 4ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, na qual a classificação e a nomenclatura dos tumores ósseos odontogênicos e maxilofaciais foi revisada e atualizada, a fim de fornecer uma classificação de consenso contemporâneo à comunidade de patologistas de cabeça e pescoço (WRIGHT e VERED, 2017).

A decisão mais controversa da classificação de 2017 foi mover o TOC novamente à categoria de cisto e renomeá-lo para Ceratocisto Odontogênico (CO) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A nova edição também apresenta a mudança na terminologia dos ameloblastomas, deixando-a mais simplificada. Estabelecendo-se da seguinte maneira: ameloblastoma (AM), ameloblastoma unicístico (AU) e ameloblastoma extraósseo/periférico (AE) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). O adjetivo "sólido/multicístico", antes usado para ameloblastoma convencional, foi descartado por não possuir significância biológica e gerar confusão com o ameloblastoma unicístico (WRIGHT e VERED, 2017).

Os cistos são lesões odontogênicas benignas que podem atingir grandes dimensões, o CO desperta atenção por ser agressivo e altamente recidivante (SHEAR, 2003); (PHILIPSEN *et al.*, 2005). De acordo com sua origem, os cistos odontogênicos são subclassificados em cistos de desenvolvimento ou inflamatórios. O CO está classificado como um cisto de desenvolvimento que apresenta características histopatológicas e de comportamento clínico específico (NEVILLE *et al.*, 2009). Há um consentimento de que a origem do CO ocorre a partir dos restos epiteliais da lâmina dental, e que seu crescimento e desenvolvimento podem estar relacionados a fatores ainda desconhecidos (NEVILLE *et al.*, 2009). Este tipo de lesão tende a crescer na direção ântero-posterior, dentro da cavidade medular dos ossos gnáticos, sem causar expansão óssea evidente. Esta peculiaridade pode ser útil no diagnóstico diferencial, pois os cistos dentífero e radicular de tamanho comparável geralmente estão associados à expansão óssea (NEVILLE *et al.*, 2009).

Destaca-se na patogênese deste cisto, a mutação do gene supressor de tumor (PTCH1) dentre outras alterações genéticas e epigenéticas (BARRETO *et al.*, 2000). Lesões múltiplas de CO, frequentemente, estão associadas à síndrome do carcinoma nevoide de células basais (SCNCB) ou Síndrome de Gorlin (PHILIPSEN *et al.*, 2005).

Histologicamente, o CO apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, friável e delgada, com revestimento epitelial composto por uma camada uniforme de epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, com camada basal composta por células epiteliais colunares dispostas em paliçada. A interface epitélio-conjuntivo é plana. O lúmen cístico pode conter um líquido claro semelhante à transudato ou pode estar preenchido por um material caseoso que microscopicamente consiste em restos de ceratinócitos. Pode haver pequenos cistos, cordões ou ilhas satélites de epitélio odontogênico na cápsula fibrosa (NEVILLE *et al.*, 2009).

Os TOs são considerados lesões neoplásicas raras de difícil diagnóstico e terapêutica desafiadora (HENRIQUES *et al.*, 2008), os quais se desenvolvem exclusivamente nos ossos gnáticos a partir do epitélio odontogênico, ectomesênquima ou ambos (ROBBINS, 2010). Dentre os TOs epiteliais, foi optado pesquisar o ameloblastoma (AM) e o ameloblastoma unicístico (AU) devido a sua alta frequência, crescimento local persistente, habilidade em produzir deformidades marcantes antes de provocar debilidades graves. 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). O AM representa a maioria dos casos (REICHART, PHILIPSEN e SONNER, 1995; GARDNER *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2009; FREGNANI *et al.*, 2010) e exhibe índice de recidiva de até 95% após simples curetagem (NEVILLE *et al.*, 2009), e de até 31% após curetagem e crioterapia (FREGNANI *et al.*, 2010).

Histologicamente, o padrão folicular do AM é o mais comum, apresentando ilhas de epitélio em meio a um estroma maduro de tecido conjuntivo fibroso. Os ninhos epiteliais possuem uma região central de células angulares arrançadas frouxamente. Cercando esta região central há uma camada única de células colunares altas que apresentam polaridade reversa. Há também o padrão plexiforme, menos comum do que o folicular, que consiste em cordões de epitélio odontogênico longos e anastomosados delimitados por células colunares ou cúbicas, circundando as células epiteliais arrançadas mais frouxamente. O estroma de suporte tende a ser vascular e arrançado frouxamente (NEVILLE *et al.*, 2009).

O AU apresenta três variantes histopatológicas. A primeira é o AU luminal que consiste em uma parede cística fibrosa com revestimento composto total ou parcialmente por epitélio ameloblástico com camada basal de células colunares ou cúbicas. O núcleo hiper cromático apresenta polaridade reversa e vacuolização citoplasmática basilar. As células epiteliais apresentam-se frouxamente unidas. A segunda variante é o AU intraluminal em que os nódulos do ameloblastoma se projetam do revestimento cístico em direção ao lúmen. E por último, o AU mural em que a parede fibrosa do cisto está infiltrada por ameloblastoma típico folicular ou plexiforme (NEVILLE *et al.*, 2009).

O anticorpo monoclonal Ki-67 é um marcador biológico muito confiável na identificação da atividade celular proliferativa, mostrando a quantidade de células em proliferação, além disso, o seu uso é simples, rápido e pouco dispendioso (ARISAWA *et al.*, 1999; HALL R. E EMBERY, G., 1997). A taxa de proliferação das células tumorais pode representar um indicador importante da agressividade e do potencial de recidiva das neoplasias (BROWN e GATTER, 1990).

O outro anticorpo utilizado neste trabalho é o α -SMA, o qual permite avaliar a presença de miofibroblastos (MFs) nos tecidos de interesse (DESMOULIERE, GUYOT E GABBIANI, 2004; NADALIN, 2008). Os MFs são fibroblastos que possuem características semelhantes à de músculo liso, com capacidade contrátil devido à elevada expressão de α -actina de músculo liso (NADALIN, 2008). Inicialmente acreditava-se que os MFs eram responsáveis pelo mecanismo defensivo de isolar a lesão e impedir a invasão de células malignas, porém, nos últimos anos, estudos têm demonstrado que a presença de MFs está relacionada à progressão tumoral, participando na modulação da angiogênese, facilitação da invasão das células tumorais e promoção da metastização, uma vez que, além de produzir colágeno, eles também são responsáveis pela síntese de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, favorecendo assim o crescimento invasivo da lesão (VERED *et al.*, 2005; NADALIN, 2008).

Para avaliar o índice proliferativo das células epiteliais, por meio do anticorpo Ki-67, e a presença de MFs, por meio do anticorpo α -SMA, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase que alia simplicidade, facilidade de manuseio pelos patologistas e amplo uso para diagnóstico. Este método combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, objetivando identificar componentes celulares ou tissulares através da reação com anticorpos específicos. Com o exposto, a presente pesquisa tem por objetivo fazer a

análise imunohistoquímica da presença de MFs (α -SMA) e da proliferação celular (Ki-67) em lesões de AM, AU, CO e FP.

3.3.2 *Material and methods*

Comitê de ética

Este estudo faz parte de um macroprojeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob os números: 1.285.803 (Parecer Plataforma Brasil) / CAAE: 49115915.5.0000.0121.

Seleção da amostra

Foram selecionadas as fotografias das lâminas histopatológicas de casos de CO, FP e ameloblastomas que já haviam sido submetidas à técnica de imunohistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase no ano de 2014 pelos patologistas do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB - UFSC) (Quadro 1). Os casos de ameloblastomas foram divididos de acordo com suas características clínico-radiográficas e histológicas, seguindo a nova nomenclatura estabelecida na 4ª edição da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS em: AM e AU. O grupo controle foi formado por lâminas histopatológicas de casos de FP de terceiros molares completamente inclusos. As amostras de Ki-67 foram composta por 7 casos de AM, 8 casos de AU, 24 casos de CO e 6, de FP, como amostra de tecido odontogênico não neoplásico. As amostras de α -SMA foram composta por 8 casos de AM, 7 casos de AU, 22 casos de CO e 7, de FP, como amostra de tecido odontogênico não neoplásico.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
α -SMA	Policlonal	Sigma	1:1000
Ki-67	Monoclonal – SP6	Biocare	1:100

Quadro 1 - Anticorpos utilizados pelos patologistas em 2014.

Análise das reações imunohistoquímica

Para avaliação das amostras foi utilizado o *software* NIH Image J[®] 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 verificar a presença de MFs foi observada a expressão de α -SMA nos miofibroblastos presentes na cápsula de tecido conjuntivo fibroso, logo abaixo do revestimento epitelial. A avaliação do anticorpo α -SMA foi realizada através da contagem do total de células positivas e negativas por campo, em 10 campos consecutivos para cada caso. Posteriormente, foi calculada 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 tem marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e pericitos, pois essas células podem interferir nos resultados devido à expressão de α -SMA.

A imunopositividade para Ki-67 caracteriza-se pela coloração castanha do núcleo das células epiteliais. No presente estudo, a camada basal e suprabaasal do epitélio foram analisadas. Para cada caso foram contadas células epiteliais, positivas e negativas, em 10 campos consecutivos e, posteriormente, foi calculada a média de células positivas para cada caso, somando-se o total de células positivas em todos os campos e dividindo-as pelo total de campos.

Análise estatística

O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparação da expressão dos anticorpos estudados (Ki-67 e α -SMA) entre os casos de AM/AU, CO e FP. O teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar especificamente os resultados entre o AM e AU.

Também foi avaliada a correlação entre os marcadores Ki-67 e α -SMA, por meio da correlação de Spearman, através das médias obtidas. Os resultados da análise estatística foram expressos como média da porcentagem de células coradas \pm desvio-padrão para Ki-67 (Apêndice A) e α -SMA (Apêndice B). Considerou-se o valor de $p \leq 0,05$ para dados com significância estatística.

3.3.3 Results

Para ambos os marcadores, o teste estatístico de *Kruskal-Wallis* (Tabela 1) mostrou diferença estatística significativa, cuja expressão foi maior em CO (Tabela 2 e 3) quando comparado a AM/AU e FP. O teste de *Mann Whitney* (Tabela 4) comparou AM e AU, com ambos os marcadores, e não apontou diferença estatística significativa. Por meio da correlação de *Spearman* (Tabela 5), pode-se observar que houve correlação positiva entre os anticorpos Ki-67 e α -SMA. A expressão do anticorpo Ki-67, e a presença de MFs estão apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

A marcação para α -SMA foi observada de maneira difusa pelo tecido conjuntivo, nos casos estudados, sendo superior no CO. As células positivas para Ki-67 estavam localizadas principalmente na camada basal e suprabasal do revestimento epitelial, obtendo sua prevalência de marcação nos casos de CO.

Tabela 1. Resultado da comparação entre os 3 grupos

G	Mean Rank	
	Ki-67	α -SMA
AM/AU	13.00	15.83
FP	12.75	17.00
CO	31.81	28.80
P	0.000*	0.005*

Teste de Correlação de *Kruskal-Wallis*
Significância estatística: * $p \leq 0.05$

Tabela 2. Comparação entre os 3 grupos para Ki-67

G	AM/AU	FP	CO
AM/AU	-	0.477	0.000*
FP	0.477	-	0.006*
CO	0.000*	0.006*	-

Teste de *Kruskal-Wallis*
Significância estatística: * $p \leq 0.05$

Tabela 3. Comparação entre os 3 grupos para α -SMA

G	AM/AU	FP	CO
AM/AU	-	0.573	0.018*
FP	0.573	-	0.004*
CO	0.018*	0.004*	-

Teste de *Kruskal-Wallis*

Significância estatística: * $p \leq 0.05$

Tabela 4. Comparação entre AM e AU

G	<i>Mean Rank</i>	
	Ki-67	α-SMA
AM	6.93	8.25
AU	8.94	7.71
P	0.381	0.817

Teste de *Mann-Whitney*

Significância estatística: * $p \leq 0.05$

Tabela 5. Correlação entre a marcação dos anticorpos Ki-67 e α -SMA

		Ki-67	α-SMA
		Epitélio	Conjuntivo
Ki-67	Epitélio	1.0000	
α-SMA	Conjuntivo	0.381*	1.0000

*a correlação é significativa no nível 0,05

Teste de Correlação de *Spearman*

3.3.4 Discussion

Nesta pesquisa foi realizada a análise imunohistoquímica da presença de MFs (α -SMA) e da proliferação celular (Ki-67) comparando-as com lesões de AM, AU, CO e FP. Estando de acordo com a mais recente edição, publicada em janeiro de 2017, da Classificação Mundial de Tumores de Cabeça e Pescoço, na qual a categorização e a nomenclatura dos tumores ósseos odontogênicos e maxilofaciais foram revisadas e atualizadas, a fim de fornecer uma classificação de consenso

contemporâneo à comunidade de patologistas de cabeça e pescoço (WRIGHT e VERED, 2017).

Conceitualmente as neoplasias não regredem espontaneamente depois de retirado o estímulo que as produziu, no entanto, após uma abordagem conservadora, como a marsupialização, muitos casos de CO regredem espontaneamente, este é um dos fatos que poderia justificar sua reclassificação de tumor (Tumor Odontogênico Ceratocisto) para cisto (Ceratocisto Odontogênico) (HENRIQUES *et al.*, 2008). O CO é uma forma diferente de cisto odontogênico de desenvolvimento que merece consideração especial devido às suas características histopatológicas e de comportamento clínico específico como recorrência após tratamento e mutações no gene PTCH1 (NEVILLE *et al.*, 2009).

Para o ameloblastoma a terminologia foi simplificada, o subtipo "sólido/ multicístico" para o ameloblastoma convencional foi descartado por não possuir significância biológica e poder levar à confusão com o ameloblastoma unicístico. O subtipo extraósseo/ periférico não sofreu alteração e por fim, o ameloblastoma desmoplásico foi reclassificado como subtipo histológico e não como entidade clinicopatológica (HENRIQUES *et al.*, 2008).

No presente estudo, a expressão do antígeno de proliferação celular (Ki-67) foi mais elevada nos casos de CO quando comparado às lesões de AM/AU x FP. Estes resultados sugerem que a expressão de Ki-67 foi semelhante entre os grupos de AM/AU e FP, não sendo este último um tecido quiescente como o esperado. Enquanto que as amostras de CO demonstraram índice de proliferação celular significativamente maior, sugerindo que esta lesão possa ter um maior potencial invasivo. O que corrobora com os estudos descritos por (De Oliveira Ramos *et al.* 2012; Soluk Tekkesin *et al.* 2012; Dutra *et al.* 2014; Zhong *et al.* 2010 e Arisawa *et al.* 1999).

Averiguar a taxa de proliferação das células tumorais utilizando marcadores como o Ki-67 é muito vantajoso, pois eles mostram a desregulação do ciclo celular e justificam as altas taxas de proliferação desses neoplasmas além de, representar um indicador importante da agressividade e do potencial de recidiva de certas patologias. Associar criteriosamente os dados clínicos, histopatológicos e de análise imunohistoquímica é muito favorável para fornecer informações valiosas sobre o comportamento biológico e possível prognóstico das patologias (ARISAWA *et al.*, 1999; BROWN e GATTER, 1990).

As altas taxas de Ki-67 encontradas, nesta pesquisa, na camada basal e suprabasal do epitélio do CO podem justificar o comportamento localmente agressivo, o alto potencial proliferativo e o alto índice de recidivas, apesar de que é possível que esta última característica esteja relacionada à remoção incompleta da lesão ou outros fatores relacionados ao ato cirúrgico e não necessariamente ao seu crescimento intrínseco.

Algumas características de certas lesões císticas, como serem bem delimitadas e encapsuladas, favorecem o comportamento clínico benigno, não invasivo e de excelente prognóstico. Porém, o revestimento capsular encontrado no CO é fino e friável, logo se fragmenta facilmente durante o ato cirúrgico, além de frequentemente apresentar cistos satélites na sua cápsula e exibir a interface epitélio-conjuntivo plana, colaborando para um comportamento clínico agressivo e prognóstico sombrio. Diferentemente de alguns tumores odontogênicos epiteliais como é o caso do AM em que a massa tumoral cresce sem a presença da cápsula e em íntima relação com os tecidos circunjacentes implicando em um tratamento cirúrgico com margem de segurança maior e prognóstico sombrio (HENRIQUES *et al.*, 2008).

Ao correlacionar o AU/AM x FP a expressão de Ki-67 revelou-se de forma muito semelhante, não apresentando diferença estatística significativa, o que demonstra que o FP não é um tecido letargo como o esperado, quando comparado a este tipo de neoplasia, estudos de Dutra *et al.* (2014) ratificam este achado. Dentre os vários trabalhos correlacionando à presença de terceiros molares e o surgimento de cistos e tumores Cosarca *et al.* (2016) sugerem a remoção de dentes inclusos, para prevenção do surgimento destas patologias, Al-Khateeb e Bataineh (2006) corroboram com essa indicação.

Ao realizar o teste de *Mann-Whitney* e contrapor AM x AU não houve diferença estatística significativa para a expressão de Ki-67, dado também encontrado por Bologna-Molina *et al.* (2013) e Bologna-Molina *et al.* (2008). Possivelmente as altas taxas de recidiva do AM estão associadas à excisão incompleta da lesão e não ao seu alto índice proliferativo. No entanto Meer *et al.* (2003) comparou a atividade proliferativa dos dois tipos de ameloblastoma e verificou que o AU teve maior expressão de Ki-67, contudo, os autores concluíram que não há relação entre a atividade proliferativa mostrada por estes marcadores e o comportamento biológico destas patologias e também reforçam a ideia de que a excisão incompleta da lesão de AM, por conta da sua morfologia complexa, é a causa das altas taxas de recidiva.

Em contrapartida, Ahlem *et al.* (2015) acreditam que o alto índice proliferativo das células epiteliais tumorais bem como a alta expressão de Ki-67 em AM pode estar correlacionado ao grau de infiltração local e de recorrência desse tipo de neoplasia, estudos como o de Sandra, F. *et al.* (2001) e Li *et al.* (1995) corroboram com esta linha de pesquisa. Considerando-se a distribuição dos diversos tipos de células epiteliais, bem como os diferentes mecanismos de crescimento do AM e AU, essas condições podem influenciar no resultado do índice proliferativo. Essas discrepâncias podem refletir diferenças na metodologia empregada para avaliar a atividade proliferativa e reforçam a necessidade de usar métodos reprodutíveis padrões para permitir as comparações entre os diferentes espécimes. Em resumo, os dados publicados sobre índices proliferativos em AU e AM são ainda muito controversos.

Além da proliferação celular, outra etapa considerada importante no crescimento e progressão das patologias é a ativação de MFs no estroma (VERED *et al.*, 2005). No presente estudo, a maior expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) foi nos casos de CO, quando comparados os grupos de AM/AU e FP, achados descritos também por Kouhsoltani *et al.*, (2016), Roy e Garg, (2013) e Nadalin (2008). O maior número de MFs sugere que essas células possam ser um dos fatores responsáveis pelo comportamento biológico agressivo de certas lesões odontogênicas. Os miofibroblastos são células-chave para a remodelação do tecido conjuntivo, eles interagem com células epiteliais, sintetizam enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, podendo assim controlar a progressão, invasão tumoral e a angiogênese (Desmouliere *et al.*, 2004). Vered *et al.* (2005) e Nonaka *et al.* (2012) também reportaram que a maior quantidade de MFs pode estar relacionada ao comportamento agressivo de certas patologias.

Em contrapartida, estudos de Syamala *et al.* (2016) e Santos *et al.* (2017) encontraram maior quantidade de MFs marcados por α -SMA em lesões de ameloblastomas. Dutra *et al.* (2014) ao compararem ameloblastoma e FP, encontrou maior expressão de α -SMA no ameloblastoma convencional, e Ramos *et al.* (2012) encontraram maior expressão de α -SMA no FP ao compararem com lesões de CO. A maior expressão de α -SMA no FP, provavelmente está associada à remodelação óssea que ocorre durante o processo de formação e erupção dental (HOSOYA *et al.*, 2006).

Os MFs podem atuar em estreita associação com as células epiteliais para provocar mudanças no microambiente estromal, favorável ao

crescimento e progressão das lesões patológicas. Estas células podem ter um grande valor no prognóstico, comportamento biológico e no potencial de crescimento de certas patologias, como no CO e ameloblastomas (SYAMALA *et al.*, 2016).

Observou-se no presente estudo uma correlação positiva entre os anticorpos Ki-67 e α -SMA, demonstrando haver uma reciprocidade entre a proliferação de epitélio e conjuntivo nas patologias estudadas, contudo esta correlação positiva observada foi fraca.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão das lesões estudados nesta pesquisa, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de avaliar outras proteínas expressas no epitélio de revestimento e cápsula conjuntiva, utilizando-se de amostras maiores e, se possível, associando o estudo imunohistoquímico com as técnicas de biologia molecular.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos por meio da análise imunohistoquímica foi possível concluir que a expressão elevada dos anticorpos Ki-67 e α -SMA encontrada no CO pode estar relacionada ao comportamento biológico diferenciado desta patologia. E a expressão semelhante encontrada nos casos de AM, AU e FP pode demonstrar que este último não é um tecido quiescente como o esperado. Os resultados demonstraram que há uma correlação positiva entre os marcadores Ki-67 e α -SMA.

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> >.

AHLEM, B. *et al.* Study of Ki67 and CD10 expression as predictive factors of recurrence of ameloblastoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, v. 132, n. 5, p. 275-9, Nov 2015. ISSN 1879-7296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anorl.2015.08.016> >.

AL-KHATEEB TH, BATAINEH AB. Pathology associated with impacted mandibular third molars in a group of Jordanians. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; v.64: p.1598-1602.

ARISAWA, E. A. L. *et al.* Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 Breve Revisão. Pós - Graduação em Revista São José dos Campos, v. 1, p. 54-60, 1999. Disponível em: < <http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/view/37/17> >.

BARRETO D. C. *et al.* PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *Journal of dental research*, v.79, n.6, p.1418-1422, 2000.

BOLOGNA-MOLINA R. *et al.* Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013.

BOLOGNA-MOLINA R, *et al.* Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol*, 2008.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67 - it use in histopathology. *Histopathology*, v. 17, n. 6, p. 489-503, 1990. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076881> >.

COSARCA, A. S. *et al.* The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Rom J Morphol*

Embryol, v. 57, n. 2, p. 407-12, 2016. ISSN 1220-0522 (Print)1220-0522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE OLIVEIRA RAMOS, G. *et al.* Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. J Oral Pathol Med, v. 43, n. 4, p. 282-8, Apr 2014. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DESMOULIERE, A. *et al.* 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> >.

DUTRA, K. L. *et al.* Incidência de anormalidades histológicas em tecido correspondente ao espaço pericoronário de terceiros molares inclusos e semi-inclusos. Rev. odontol. UNESP, v. 44, n. 1, p. 18-23, 02/2015 2015. ISSN 1807-2577. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.1004>>.

DUTRA, K. L. *et al.* Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in ameloblastomas and pericoronal follicles. J Oral Pathol Med, v. 45, n. 8, p. 586-90, Sep 2014. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12411> >.

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.

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.

HALL, R. C.; EMBERY, G. The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues. Advances in Dental Research, v. 11, n. 4, p. 478-486, 1997. ISSN 08959374. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=36578935&site=ehost-live> >.

HENRIQUES, A. C. G. *et al.* Considerações sobre a classificação e o comportamento Biológico dos Tumores Odontogênicos Epiteliais: Revisão da Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, p. 175-184, 2009.

HOSOYA A. *et al.* Immunohistochemical Localization of alfa-Smooth Muscle Actin During Rat Molar Tooth Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2006;54;1371-1378.

KOUHSOLTANI, M. *et al.* Immunohistochemical evaluation of myofibroblast density in odontogenic cysts and tumors. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, v. 10, n. 1, p. 37-42, Winter 2016. ISSN 2008-210X (Print)2008-210x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.15171/joddd.2016.006> >.

LI T. J. *et al.* Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in unicystic ameloblastoma. *Histopathology*, 1995.

MATOS, F. R. *et al.* Expressão de MMPs, marcadores angiogênicos e proliferação celular em tumores odontogênicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 5, p. 375-381, 2012.

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> >

NADALIN, M. *et al.* Presence of myofibroblasts and matrix metalloproteinase 2 in radicular cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors: A comparative immunohistochemical study. *Journal of Endodontics*, v. 38, p. 1363-1367, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.05.020> >

NAFARZADEH, S. *et al.* A comparative study of PCNA and Ki-67 expression in dental follicle, dentigerous cyst, unicystic ameloblastoma and ameloblastoma. *Int J Mol Cell Med*, v. 2, n. 1, p. 27-33, Winter 2013. ISSN 2251-9637 (Print)2251-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920517/>>.

NEVILLE, B. W. *et al.* Patologia Oral & Maxilofacial. 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 972p.

NONAKA C. F. *et al.* Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. Arch Oral Biol 2012; 57: 230–7.

ONG'UTI M. N. *et al.* Ki-67 antigen in ameloblastomas: correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 1997; 26: 376-379.

PLILIPSEN, H. *et al.* Neoplasmas e lesões semelhantes originando-se a partir do aparelho odontogenico 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.

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

ROY, S.; GARG, V. Evaluation of stromal myofibroblasts expression in keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparative study. J Oral Maxillofac Pathol, v. 17, n. 2, p. 207-11, May 2013. ISSN 0973-029X (Print)0973-029x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.119789>>.

SANDRA, F. *et al.* Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki67 in ameloblastoma. Oral Oncol, 2001.

SANTOS, J. N. *et al.* Odontogenic tumors: analysis of 127 cases. Pesqui Odontol Bras, v. 15, n. 4, p. 308-13, 2001 Oct-Dec 2001. ISSN 1517-7491. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11787319>>.

SANTOS, P. P. A. *et al.* Immunohistochemical analysis of myofibroblasts, TGF- β 1, and IFN- γ in epithelial odontogenic lesions. J Oral Pathol Med, v.

46, n. 5, p. 365-370, May 2017. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12494> >.

SHEAR, M. Odontogenic keratocysts: clinical features. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, v. 15, n. 3, p. 335-45, Aug 2003a. ISSN 1042-3699. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088687 >.

SOLUK TEKKESIN, M.; MUTLU, S.; OLGAC, V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg*, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2012. ISSN 1018-5615 (Print)1018-5615. Disponível em: < <http://www.turkjpath.org/text.php3?doi=10.5146/tjpath.2012.01097> >.

SOUSA, F. B. *et al.* Pediatric oral lesions: a 15-year review from São Paulo, Brazil. *J Clin Pediatr Dent*, v. 26, n. 4, p. 413-8, 2002. ISSN 1053-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175139> >.

SYAMALA, D. *et al.* Immunohistochemical evaluation of myofibroblasts in odontogenic cysts and tumors: A comparative study. *J Oral Maxillofac Pathol*, v. 20, n. 2, p. 208-13, May-Aug 2016. ISSN 0973-029X (Print)0973-029x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.185898> >.

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, 2005. ISSN 0964-1955. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139563> >.

WRIGHT, J. M.; 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*, v. 11, n. 1, p. 68-77, Mar 2017. ISSN 1936-055x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-017-0794-1> >.

YAMAMOTO, T. *et al.* Nevoid basal cell carcinoma syndrome: Clinical features and implications of development of basal cell carcinoma in skin

and keratocystic odontogenic tumor in jaw and their gene expressions. *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 23, n. 3, p. 105-112, 2011. ISSN 0915-6992. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0915699211000057> >.

ZHONG, Y.; WANG, L.; CHEN, X. M. [Expression of p-p38MARK, uPA and Ki-67 in epithelial odontogenic tumour]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, v. 45, n. 9, p. 535-9, Sep 2010. ISSN 1002-0098 (Print)1002-0098. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122446> >.

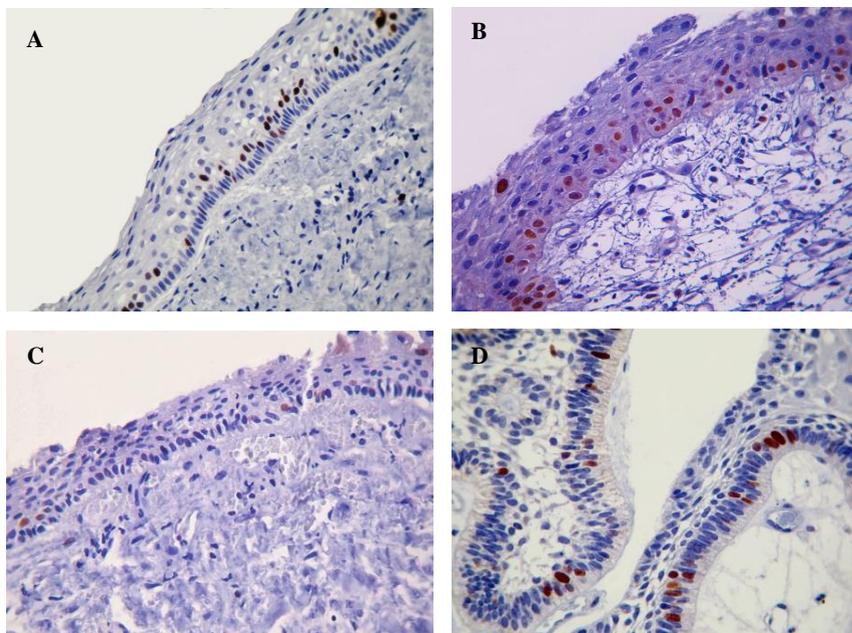


Figura 1. Análise imunohistoquímica (400X), da expressão nuclear de Ki-67 no epitélio, predominantemente na camada basal e suprabasal. **A) Ceratocisto odontogênico:** Revestimento epitelial pavimentoso estratificado, paracarinizado, fino e uniforme, com camada basal em paliçada e cápsula de tecido conjuntivo fibroso; **B) Folículo pericoronário:** epitélio odontogênico suportado por tecido conjuntivo fibroso denso e ausência de processo inflamatório; **C) Ameloblastoma unicístico:** epitélio ameloblastomatoso revestindo uma cavidade cística, suportado por estroma fibroso; **D) Ameloblastoma:** ilhotas de epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso.

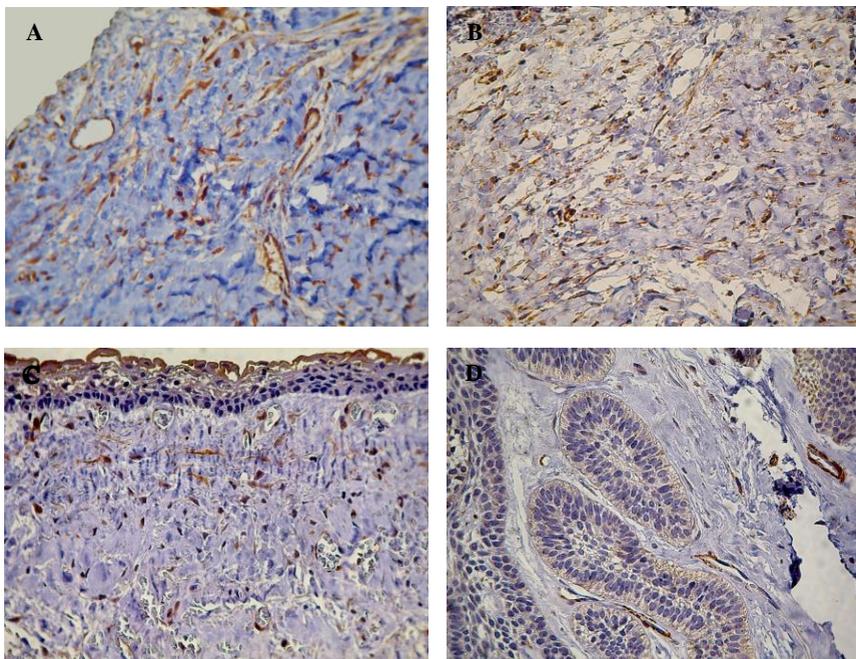


Figura 2. Análise imunohistoquímica (400X), da expressão citoplasmática de α -SMA no tecido conjuntivo, observado de maneira difusa no tecido. **A) Ceratocisto odontogênico:** cápsula de tecido conjuntivo fibroso; **B) Folículo pericoronário:** tecido conjuntivo fibroso denso e ausência de processo inflamatório; **C) Ameloblastoma unicístico:** epitélio ameloblastomatoso revestindo uma cavidade cística, suportado por estroma fibroso; **D) Ameloblastoma:** ilhotas de epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso.

APÊNDICE A

Apêndice A. Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado para o marcador Ki-67.

C	G	Ki-67	
		Média	DP
1	1	11	4.11
2	1	3	3.73
3	1	0	1.27
6	1	5	3.81
8	1	1	0.87
10	1	3	4.28
11	1	0	0.52
20	1	10	2.64
16	1	20	7.60
4	1	1	1.09
13	1	1	1.06
14	1	0	0.61
15	1	4	3.08
17	1	5	4.14
19	1	6	2.67
MÉDIA	1	4,66	2,76
1	2	1	1.02
4	2	30	23.47
11	2	1	0.63
10	2	0	0.00
12	2	2	1.36
13	2	1	0.96
MÉDIA	2	5,83	4,57
1	3	26	10.22
2	3	26	8.21
3	3	40	9.28
4	3	46	7.73
5	3	34	7.52
6	3	25	7.01
7	3	29	4.02

8	3	23	3.94
9	3	28	6.27
10	3	31	8.36
11	3	27	7.33
12	3	14	2.16
13	3	31	14.54
14	3	1	1.06
15	3	25	4.59
16	3	9	5.12
17	3	27	9.80
18	3	21	7.61
19	3	26	8.69
20	3	7	3.86
21	3	10	2.83
22	3	18	4.25
23	3	32	12.68
24	3	33	7.35
MÉDIA	3	24,54	6,85

Legenda: C= caso; G=grupo; DP=desvio-padrão
G1=AM/AU; G2=FP; G3=CO.

APÊNDICE B

Apêndice B. Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado para o marcador α -SMA.

C	G	α -SMA	
		Média	DP
1	1	36	17.23
2	1	80	10.76
6	1	28	19.04
8	1	76	11.05
10	1	91	4.76
11	1	26	16.80
12	1	42	29.15
18	1	44	13.30
19	1	9	5.79
17	1	66	20.74
16	1	62	21.79
15	1	77	20.41
13	1	25	16.85
14	1	59	20.65
4	1	55	15.12
MÉDIA	1	51,73	16,22
4	2	76	8.31
8	2	67	17.88
1	2	40	26.90
10	2	69	11.49
11	2	51	16.86
12	2	48	10.68
13	2	57	17.71
MÉDIA	2	58,28	15,69
1	3	85	7.91
2	3	73	10.22
3	3	84	6.59
4	3	92	4.29
5	3	78	10.06
6	3	76	14.30

7	3	93	5.34
8	3	95	2.38
9	3	95	4.43
10	3	54	20.67
11	3	83	7.59
12	3	67	14.17
13	3	69	10.33
15	3	71	15.54
16	3	73	13.25
17	3	78	18.88
18	3	72	18.84
19	3	87	9.22
20	3	43	17.81
21	3	65	17.70
22	3	55	14.53
23	3	49	19.76
MÉDIA	3	74,40	11,99

Legenda: C= caso; G=grupo; DP=desvio-padrão
G1=AM/AU; G2=FP; G3=CO.

ANEXO A - Comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49115915.5.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.285.803

Apresentação do Projeto:

A pesquisa intitulada “Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo” é do tipo observacional descritiva, retrospectiva contando a pesquisadora com a participação de 70 participantes de pesquisa que autorizarão o uso de material já coletado em procedimento anterior e alheio a presente pesquisa armazenado no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB); também se fará consulta as fichas de biópsias.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico das lesões odontogênicas, especialmente o AM e o TOC, por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral.

Objetivo Secundário:

- Estabelecer a incidência de TOCs e AMs diagnosticados no LPB/UFSC nos anos de 2006 até 2014;
- Determinar o perfil clínico dessas lesões, verificando dados em relação ao paciente como: sexo, idade, etnia, e dados em relação à lesão como: localização, tamanho, presença de recidiva, entre outras características;
- Verificar a associação entre o TOC e a presença da Síndrome do Carcinoma Nevóide de Células

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.285.803

Basais;

- Fazer a classificação histológica dos casos de AM de acordo com a classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde) de 2005;
- Fazer a avaliação histológica dos casos de TOC, visando observar as características descritas na classificação da OMS de 2005;
- Avaliar a frequência de expressão de proteínas relacionadas com o crescimento e invasão tumoral, como as MMPs -7 e -26; podoplanina; caveolina -1, RANK, RANKL; OPG; catepsina K; IL-6, MF e Ki-67, em AM e TOCs, e comparar essa expressão com cistos radiculares/residuais.
- Comparar a expressão dessas proteínas em AM e TOCs, com cistos radiculares/residuais, os quais representam lesões de origem odontogênica não neoplásicas.
- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Uma vez que será utilizado material de arquivo, o único risco desta pesquisa seria a perda do anonimato, porém, é compromisso veemente dos pesquisadores envolvidos manter o sigilo sobre a identidade dos participantes.

Benefícios:

Em um levantamento realizado por nosso grupo de pesquisa, envolvendo dois Serviços de diagnóstico ligados ao SUS no Estado de SC, o tumor odontogênico ceratocístico (TOC) e o ameloblastoma (AM) foram os tumores odontogênicos (TO) mais frequentes, acometendo, na maioria das vezes, pacientes jovens. Embora a maioria dos TO seja benigna, sendo os tumores malignos raros, alguns desses tumores, como o AM, mixoma e TOC, apresentam um comportamento agressivo, quando comparados aos demais tumores benignos ou aos cistos de origem odontogênica. O tratamento do AM e mixoma consiste, na maioria dos casos, em remoção cirúrgica em bloco, ou seja, com margem de segurança de 1 a 3cm, o que acaba acarretando em alta morbidade para os pacientes, os quais muitas vezes, ainda estão em fase de crescimento ósseo. Essa modalidade terapêutica também é aplicada em alguns casos de TOC. As interações parênquima/estroma no mecanismo de invasão dessas lesões ainda são pouco abordadas na literatura da área. Como resultado, ainda existem lacunas importantes na compreensão do comportamento biológico dessas neoplasias, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de invasão e osteoclastogênese. O conhecimento detalhado dos mecanismos de invasão dessas lesões poderá possibilitar o estabelecimento de alternativas terapêuticas menos invasivas,

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.285.803

melhorando dessa forma a vida dos pacientes que apresentam essas lesões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta fundamentação bibliográfica, clareza em seus objetivos, pertinência e uma vez obtido os dados conclusivos, possibilitará a pesquisadora alternativas terapêuticas menos invasivas melhorando a resposta ao tratamento dessas lesões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos estão de acordo com as solicitações do CEP SH.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram constatadas alterações pontuais no TCLE, não havendo inadequações, ou impedimentos a realização da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_585388.pdf	29/09/2015 11:10:31		Aceito
Outros	RESPOSTACEPSH.pdf	29/09/2015 11:08:42	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	29/09/2015 11:06:59	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDaInstituicao.pdf	10/09/2015 17:20:12	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisaDetalhado.pdf	04/09/2015 10:42:39	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	04/09/2015 10:42:12	Elena Riet Correa Rivero	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.285.803

Não

FLORIANOPOLIS, 19 de Outubro de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – Ata de apresentação do trabalho de conclusão de curso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 16 dias do mês de outubro de 2017 às 16.30 horas, em sessão pública no Auditório do Centro de Ciências da Saúde desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professora Prof. ^a Dra. Kamile Leonardi Dutra Horstmann e pelos examinadores:

- 1 - Gianeli de Oliveira Romos
- 2 - Felipe Augusto Daltari

a aluna Ligia Figueiredo Valesan apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado.

Análise imunohistoquímica de ki-67 e α -sma em ameloblastomas, ceratocisto odontogênico e folículo pericoronário; como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando

Kamile L. Dutra
Presidente da Banca Examinadora

Gianeli Romos
Examinador 1

Felipe Augusto Daltari
Examinador 2

Ligia Figueiredo Valesan
Aluno