

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

SABRINA NOGUEIRA DE MORAES

ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS
ASSOCIADAS A VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/ β -CATENINA EM
AMELOBLASTOMAS SÓLIDOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS
CÍSTICOS CALCIFICANTES

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para
obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia na
Área de Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rebeca de Souza Azevedo

Este exemplar corresponde à
versão final da Dissertação
defendida pelo aluno, e orientada
pela Profa.Dra. Rebeca de Souza
Azevedo

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M791a Moraes, Sabrina Nogueira de, 1984-
Análise da expressão imunoistoquímica de proteínas associadas a via de sinalização Wnt/ β -catenina em ameloblastomas sólidos e tumores odontogênicos císticos calcificantes / Sabrina Nogueira de Moraes. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Rebeca de Souza Azevedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sindecana-1. 2. Proteína Wnt1. 3. Beta catenina. I. Azevedo, Rebeca de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of the immunohistochemical expression of proteins associated with Wnt/ β -catenin signaling in ameloblastomas and calcifying cystic odontogenic tumors

Palavras-chave em Inglês:

Syndecan-1

Wnt1 protein

Beta catenin

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Rebeca de Souza Azevedo [Orientador]

Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Marcio Ajudarte Lopes

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata SABRINA NOGUEIRA DE MORAES aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rebeca de Souza Azevedo", written over a horizontal line.

Profa. Dra. REBECA DE SOUZA AZEVEDO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Simone de Queiroz Chaves Lourenço", written over a horizontal line.

Profa. Dra. SIMONE DE QUEIROZ CHAVES LOURENÇO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcio Ajudarte Lopes", written over a horizontal line.

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente a minha querida mãe **Rosane de Paula Nogueira**, exemplo de mulher batalhadora, alegre, amiga, e temente a Deus. Foi o seu apoio, incentivo e amor incondicional que tornaram possível esta caminhada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, minha força e alegria.

À minha irmã **Mônica Nogueira de Moraes** pelo carinho em todos os momentos.

Ao meu pai **Oliveira de Moraes Santos**, bondade e tranquilidade em pessoa, e minha irmã **Maria Carolina Fitaroni de Moraes**, que sempre está com um sorriso no rosto.

Ao **Rondinelli Corrêa Dutra**, um presente de Deus. Agradeço pelo companheirismo, paciência, dedicação e carinho. Seu apoio foi muito importante neste momento.

À minha querida família: avó, tias-avós, tias, tios, primas, primos e padrinhos. Obrigada pelo incentivo e carinho.

À **Rebeca de Souza Azevedo**, exemplo de entusiasmo pelo conhecimento. Agradeço pela orientação, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**.

Ao **CNPq**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

À **Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia**, coordenadora geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pelo exemplo de dedicação. Agradeço pelo apoio e atenção durante o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes** pela oportunidade e ensinamentos no Orocentro. Com seu dom em transmitir conhecimento proporcionou aprendizado desde o início do curso.

Aos demais professores do curso de Pós-graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, **Prof. Dr. Edgard Graner**, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, **Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas** e **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, pelo ensino e auxílio a cada momento dessa caminhada.

Ao **Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires** pelo grande apoio e ensino, e a **Profa. Dra. Luciana Armada Dias** pela ajuda e solicitude durante as reações imunoistoquímicas. Agradeço pela convivência atenciosa e de grande aprendizado.

À **Marisol Martínez Martínez** pela amizade e ajuda em momentos importantes.

À **Patrícia do Socorro Queiroz Feio** pelas palavras de apoio e incentivo.

À **Isadora Luana Flores** pelas conversas alegres e o carinho.

Ao **Bruno Augusto Benevenuto de Andrade** pelas palavras de conforto.

Aos demais colegas e amigos da FOP, **Adriele, Alicia, Ana Camila, Ana Carolina, Andréia, Camilla, Carolina, Débora, Elizabete, Fabiana, Felipe, Fernanda, José Sabino, Karina, Katya, Lara, Lívia, Luciana, Marcondes, Manoela, Marianne, Michele, Priscila, Renato, Rodrigo, Rogério, Rose, Sibele e Wilfredo**. Agradeço as conversas e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Orocentro, especialmente **Cida, Érika Graf Pedroso, Jeane, Karen Mendes Graner e Valéria Totti**. Agradeço o carinho e o apoio que tornaram especiais os dias na clínica.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, especialmente **Fabiana Facco Casarotti**. Agradeço pelo carinho ao me ensinar e principalmente por ter sua amizade.

À **Profa. Dra. Liliana Aparecida Pimenta de Barros** e a **Prof. Dra. Rosa Maria Lourenço Carlos Maia** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo pelo exemplo e incentivo desde a minha graduação. Agradeço o carinho e conversas que me fortaleceram nessa etapa distante da família.

Às pessoas especiais que Deus colocou na minha família. **Anderson Aguiar de Almeida**, grande exemplo de superação e alegria. Agradeço a esse irmão que recebi de Deus o carinho e o incentivo. E **Ramon Guimarães Ribeiro**, sempre atencioso com a minha família.

Aos meus familiares, especialmente a minha querida avó **Zoraide de Paula Nogueira**, pelo amor e carinho, e **Gabriela Nogueira Pavan**, querida prima-irmã, pela convivência desde a infância com muito amor.

Aos meus grandes amigos que mesmo distantes sempre são alegria e apoio, **Alana Santos Vieira, Diana Bandeira Dias, Francielle Siqueira Stange, George Nunes Bueno, Juliana Ramalho, Mariana Monteiro Vieira, Maria Izabel Prado Santana, Pablo Henrique M. Delazare, Ricardo Corona da Silva, Suelen G. Sperandio Cott**. Agradeço pela amizade e carinho de sempre.

Aos amigos que conquistei em Piracicaba, especialmente as amigas **Tarita Schnitman, Daiana Carolina Monteiro, Danielle Oliveira, Helena, Leane, Verônica, Christiane e Dona Antônio**. Agradeço pelas conversas, almoços e companhia.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente nessa etapa de crescimento profissional e pessoal. Agradeço as palavras de apoio, as orações e o carinho.

RESUMO

O ameloblastoma (AME) é um dos tumores odontogênicos (TO) mais comuns e, apesar de ser uma lesão benigna, pode apresentar comportamento clínico agressivo, localmente destrutivo e invasivo, enquanto o tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) é um TO benigno cístico que apresenta similaridades microscópicas com o AME, mas, geralmente, exibe comportamento clínico de menor agressividade. A via de sinalização Wnt/ β -catenina está envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral de neoplasias benignas e malignas, e a expressão alterada de suas proteínas já foi identificada em alguns TO, provavelmente contribuindo para suas biologias tumorais. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a expressão imunoistoquímica de marcadores associados a via de sinalização Wnt/ β -catenina – Wnt1, Wnt5a, β -catenina e syndecan-1 (SDC-1) – em 17 casos de AME sólido e de 6 casos de TOCC. Os resultados revelaram que nos AME, a maioria dos casos foram focalmente positivos para Wnt1 e Wnt5a, a β -catenina foi positiva no citoplasma isoladamente ou em associação a positividade de membrana, e SDC-1 exibiu positividade epitelial em 100% dos casos e positividade estromal em 40% dos casos. Nos casos de TOCC, a positividade para Wnt1 e Wnt5a foi de 100% e incluiu também as células fantasmas. A β -catenina foi positiva no citoplasma e no núcleo das células epiteliais da maioria dos casos, e SDC-1 exibiu positividade epitelial em 100% dos casos e positividade estromal em 16,7% dos casos. Em conclusão, este estudo evidenciou que a expressão de Wnt1 e Wnt5a é mais proeminente nos casos de TOCC, a expressão de β -catenina em AME é citoplasmática e em TOCC é nuclear, e que a expressão estromal de SDC-1 é mais proeminente nos casos de AME, reforçando, assim, o papel de Wnt1 e Wnt5 no desenvolvimento do TOCC, de β -catenina no desenvolvimento do TOCC e do AME, e de SDC-1 estromal no fenótipo invasivo do AME. Além disso, a expressão de Wnt1 e de Wnt5a nas células fantasmas do TOCC pode contribuir para esta histogênese. Por conseguinte, a via de sinalização Wnt/ β -catenina parece contribuir para o desenvolvimento das lesões de AME sólido e de TOCC.

Palavras chave: ameloblastoma; tumor odontogênico cístico calcificante; Wnt 1; Wnt 5a; β -catenina; syndecan-1.

ABSTRACT

Ameloblastoma (SMA) is one of the most common odontogenic tumors (OT), and although benign, it may have aggressive clinical behavior, be locally destructive and invasive, while calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) is a benign cystic OT that presents microscopic similarities with AME, but, in general, it has a less aggressive clinical behavior. Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in benign and malignant tumor development and progression, and changes in expression of its proteins have been identified in some OT, probably contributing to their tumoral biologies. Thus, the aim of this study was to evaluate and compare the immunohistochemical expression of markers associated with Wnt/ β -catenin signaling pathway – Wnt1, Wnt5a, β -catenin and syndecan-1 (SDC-1) – in 17 cases of solid SMA and 6 cases of CCOT. The results showed that in AME, most of the cases were focally positive for Wnt1 and Wnt5a, β -catenin was positive in the cytoplasm only or in association with membrane positivity, and SDC-1 had epithelial positivity in 100% of the cases and stromal positivity in 40% of the cases. In CCOT cases, Wnt1 and Wnt5a was of 100% and also included ghost cells. β -catenin was positive in the cytoplasm and in the nucleus of epithelial cells in most of the cases, and SDC-1 had epithelial positivity in 100% of the cases and stromal positivity in 16.7% of the cases. In conclusion, this study highlighted that Wnt1 and Wnt5a expression was most prominent in CCOT, β -catenin expression was cytoplasmatic in AME and nuclear in CCOT, and that stromal expression of SDC-1 was most prominent in AME, so, reinforcing Wnt1 and Wnt5 role in CCOT development, β -catenin role in CCOT and AME development, and stromal SDC-1 role in the AME invasive phenotype. In addition, Wnt1 and Wnt5a expression in ghost cells of CCOT may contribute to this histogenesis. Therefore, Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to contribute to solid AME and CCOT development.

Keywords: ameloblastoma; calcifying cystic odontogenic tumor; Wnt 1; Wnt 5a; β -catenin; syndecan-1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Tumores odontogênicos.....	2
2.2. Ameloblastoma.....	4
2.3. Tumor odontogênico cístico calcificante.....	7
2.4. Via de sinalização Wnt/ β -catenina.....	11
2.5. Papel da via de sinalização Wnt/ β -catenina no ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante	17
3. PROPOSIÇÃO.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Seleção da amostra.....	22
4.2. Análise dos dados demográficos, clínicos e radiográficos.....	22
4.3. Análise histopatológica.....	23
4.4. Análise imunoistoquímica.....	23
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Características clínicas.....	26
5.2. Características histopatológicas.....	28
5.3. Características imunoistoquímicas.....	30
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS	64
Anexo 1.....	64
Anexo 2.....	65

1. Introdução

As lesões derivadas do tecido odontogênico pertencem a um grupo formado por condições variáveis, que inclui tumores odontogênicos (TO), como o ameloblastoma (AME) e o tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC), de interesse em diferentes estudos epidemiológicos, clinicopatológicos e de biologia tumoral (Hassanein *et al.*, 2003; Sekine *et al.*, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2010; Avelar *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2011; Habibi *et al.*, 2011; Siar *et al.*, 2011a; Siar *et al.*, 2011b).

Os TO são lesões incomuns e dentro deste grupo, o AME é considerado um das lesões mais frequentes e, apesar de ser uma lesão benigna, pode apresentar comportamento clínico agressivo, localmente destrutivo e invasivo (Gardner *et al.*, 2005). O TOCC é uma neoplasia benigna um pouco menos frequente e que apresenta similaridades microscópicas com o AME, porém um comportamento clínico de menor agressividade (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina canônica e não-canônica é essencial para a ativação das fases iniciais da odontogênese (Chen *et al.*, 2009). Contudo, a literatura também apresenta algumas evidências da participação dessa via no desenvolvimento e potencial de invasão dos AME, por ativação de Wnt1 ou Wnt5a, levando ao acúmulo citoplasmático e translocação nuclear de β -catenina, que vai auxiliar na ativação de genes associados à proliferação celular e no aumento da expressão de syndecan-1 (SDC-1), que também é capaz de ativar diretamente glicoproteínas da família Wnt. Além disso, apesar do número limitado de estudos, parece que a via de sinalização Wnt/ β -catenina por meio de uma mutação em β -catenina e, o consequente, acúmulo citoplasmático e nuclear dessa proteína, está envolvido também na patogênese dos TOCC.

2. Revisão da literatura

2.1. Tumores odontogênicos

Os TO compreendem um grupo heterogêneo de lesões incomuns, que se originam dos elementos epiteliais e/ou ectomesenquimais responsáveis pela formação da estrutura dentária e dos seus elementos de suporte, portanto, ocorrem exclusivamente nos ossos gnáticos ou nos seus tecidos de suporte e microscopicamente reproduzem as relações indutivas do processo de odontogênese (Philipsen *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009). São lesões de comportamento biológico variável, que inclui desde proliferações hamartomatosas até neoplasias verdadeiras, benignas ou malignas (Philipsen *et al.*, 2005; Mosqueda-Taylor, 2008), tendo o AME como o TO clinicamente significativo mais comum e o TOCC como um TO cístico que apresenta considerável diversidade clínica e microscópica (Neville *et al.*, 2009).

A frequência relativa e a distribuição dos diferentes tipos de TO variam de acordo com a região estudada, a fonte do material da pesquisa ambulatorial ou hospitalar e o sistema classificatório utilizado (Fregnani *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2005 ; Philipsen *et al.*, 2005; Mosqueda-Taylor, 2008). Ao considerar as classificações de TO elaborada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mais recentemente (Kramer *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 2005), é possível observar que os trabalhos baseados na classificação de 1992, de um modo geral, revelam o odontoma (ODT) e o AME como os dois TO mais comuns (tabela 1). Na classificação da OMS de 2005, o tumor odontogênico queratocístico (TOQ), que até então era considerado no grupo de cistos odontogênicos, passou a ser categorizado no grupo de TO e, a partir de então, o TOQ, juntamente com o ODT e o AME passaram a representar, de um modo geral, o primeiro ou segundo TO mais frequente (tabela 2).

Tabela 1 – Distribuição dos cinco TO mais frequentes no Mundo de acordo com a classificação de TO elaborada pela OMS em 1992.

<i>Autor</i>	<i>País</i>	<i>Total</i>	<i>ODT (n-%)</i>	<i>AME (n-%)</i>	<i>MIX (n-%)</i>	<i>TOA (n-%)</i>	<i>COC (n-%)</i>
Saghravarian <i>et al.</i> , 2010	Irã	165	44 (26,7%)	70 (42,4%)	15 (9,1%)	15 (9,1%)	0 (0%)
Sriram & Shetty, 2008	Índia	250	15 (6,0%)	154 (61,6%)	15 (6,0%)	31 (12,4%)	0 (0%)
Okada <i>et al.</i> , 2007	Sri Lanka	226	10 (4,4%)	157 (69,8%)	11 (4,8%)	21 (9,2%)	10 (4,4%)
Buchner <i>et al.</i> , 2006	Estados Unidos da América	1088	826 (75,9%)	127 (11,7%)	24 (2,2%)	19 (1,7%)	17 (1,6%)
Jones & Franklin, 2006	Reino Unido	331	79 (23,8%)	102 (30,8%)	20 (6,0%)	6 (1,8%)	16 (4,8%)
Olgac <i>et al.</i> , 2006	Istanbul	527	109 (20,6%)	133 (25,2%)	83 (15,7%)	11 (2,0%)	29 (5,5%)
Adebayo <i>et al.</i> , 2005	Nigéria	318	7 (2,2%)	233 (73,3%)	38 (11,9%)	9 (2,8%)	8 (2,5%)
Fernandes <i>et al.</i> , 2005	Brasil	340	85 (25%)	154 (45,3%)	31 (9,1%)	13 (3,8%)	12 (3,5%)
Ladeinde <i>et al.</i> , 2005	Nigéria	319	8 (2,5%)	201 (63%)	21 (6,5%)	24 (7,5%)	17 (5,3%)
Simon <i>et al.</i> , 2005	Tanzânia	116	3 (2,6%)	93 (80,1%)	8 (7,0%)	1 (0,9%)	2 (1,7%)
Ochsenius <i>et al.</i> , 2002	Chile	362	162 (44,7%)	74 (20,4%)	32 (8,8%)	24 (6,6%)	26 (7,2%)
Simon <i>et al.</i> , 2002	Tanzânia	213	11 (5,1%)	157 (73,7%)	22 (10,3%)	2 (0,9%)	19 (0,5%)
Santos <i>et al.</i> , 2001	Brasil	127	64 (50,4%)	39 (30,7%)	6 (4,7%)	11 (8,6%)	0 (0%)
Total		3379	1289 (38,1%)	1250 (36,9%)	217 (6,4%)	124 (3,6%)	99 (2,9%)

ODT = odontoma; AME = ameloblastoma; MIX = mixoma; TOA = tumor odontogênico adenomatóide; COC = cisto odontogênico calcificante.

Tabela 2 – Distribuição dos cinco TO mais frequentes no Mundo de acordo com a classificação de TO elaborada pela OMS em 2005.

<i>Autor</i>	<i>País</i>	<i>Total</i>	<i>TOQ (n-%)</i>	<i>AME (n-%)</i>	<i>ODT (n-%)</i>	<i>MIX (n-%)</i>	<i>TOCC (n-%)</i>
Tawfik & Zyada, 2010	Egito	82	16 (19,5%)	34 (41,5%)	11 (13,4%)	7 (8,5%)	0 (0%)
Azevedo, 2009*	Brasil	568	191 (33,6%)	174 (30,6%)	76 (13,4%)	26 (4,6%)	31 (5,5%)
El-Gehani <i>et al.</i> , 2009	Líbia	148	52 (35,1%)	33 (22,3%)	29 (19,5%)	5 (3,3%)	10 (6,8%)
Lawall, 2009*	Brasil	803	299 (37,2%)	132 (16,4%)	190 (23,6%)	43 (5,3%)	42 (5,2%)
	México	1253	443 (35,3%)	213 (17%)	305 (24,3%)	120 (9,5%)	44 (3,5%)
Luo & Li, 2009	China	1309	507 (38,7%)	478 (36,5%)	80 (6,2%)	34 (2,6%)	26 (1,9%)
Avelar <i>et al.</i> , 2008	Brasil	238	69 (29%)	57 (23,9%)	54 (22,1%)	15 (6,3%)	15 (6,3%)
Jing <i>et al.</i> , 2007	China	1642	588 (35,8%)	661 (40,3%)	78 (4,7%)	76 (4,6%)	36 (2,2%)
Total		6043	2165 (35,8%)	1782 (29,5%)	823 (13,6%)	326 (5,39%)	189 (3,1%)

TOQ = tumor odontogênico queratocístico; AME = ameloblastoma; ODT = odontoma; MIX = mixoma; TOCC = tumor odontogênico cístico calcificante; * Tese de doutorado.

2.2. Ameloblastoma

O AME é um TO benigno de origem epitelial, que pode ser localmente agressivo e é classificado em até quatro diferentes variantes clinicopatológicas: AME sólido ou convencional, AME periférico, AME unicístico e AME desmoplásico (Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010). A forma sólida ou multicística é descrita como a mais frequente, e pode representar entre 33% e mais de 90% dos casos relatados na literatura (Chidzonga *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2001; Kessler, 2004; Fernandes *et al.*, 2005; Buchner *et al.*, 2006; Ghandhi *et al.*, 2006; Ledesma-Montes *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2007; Luo & Li, 2009; Gupta & Ponniah, 2010; Osterne *et al.*, 2011; Siar *et al.*, 2011a).

O AME sólido, também denominado AME multicístico ou AME convencional, apresenta pico de prevalência entre a 3ª e 7ª décadas de vida sem predileção significativa por sexo ou cor de pele (Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011a), embora existam alguns trabalhos sugerindo uma maior frequência de AME em pacientes negros e amarelos (Reichart *et al.*, 1995; Kessler, 2004; Buchner *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2007; Luo & Li, 2009). A maioria dos casos envolve a mandíbula, especialmente a região posterior de ângulo e ramo e se caracteriza clinicamente por um aumento de volume assintomático, que pode atingir grandes dimensões se não tratado (Chidzonga *et al.*, 1996; Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005; Buchner *et al.*, 2006; Mendenhall *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011a). Os casos de AME envolvendo a maxila são menos frequentes que os casos mandibulares, contudo, exibem crescimento contínuo através da cortical mais fina e do osso mais esponjoso capaz de envolver as estruturas adjacentes de grande importância clínica, como a órbita e a base do crânio, sem exibir aumento de volume tão proeminente (Nastri *et al.*, 1995). Além disso, eventualmente, lesões menores são descobertas em exames radiográficos de rotina, em localização interradicular, residual, periapical e paradental (Ide *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009).

Radiograficamente, o AME pode se apresentar como uma lesão radiolúcida unilocular ou multilocular (Gardner *et al.*, 2005), em que na maioria das vezes exibe um padrão multilocular, lembrando “bolhas de sabão” quando as loculações são grandes e

lembrando “favos de mel” quando as loculações são pequenas (Kessler, 2004; Neville *et al.*, 2009). É comum ainda observar reabsorção radicular, expansão e/ou rompimento cortical, assim como a presença de dentes inclusos no interior da lesão (Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010).

Microscopicamente, o AME convencional é um tumor epitelial sólido infiltrativo, que frequentemente apresenta alterações císticas (Kessler, 2004; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010) e deve apresentar as características citológicas clássicas de hiperchromatismo, polarização e vacuolização nuclear das células basais descritas por Vickers & Gorlin (1970). A proliferação epitelial mais observada no AME é caracterizada por células colunares similares a ameloblastos na periferia e células estreladas arranjadas frouxamente de forma similar ao retículo estrelado do órgão do esmalte na porção central, acarretando um aspecto tintorial gradativo na observação em objetivas de menor aumento (Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005; Adebisi *et al.*, 2006). Esta proliferação celular pode organizar-se em diferentes padrões histopatológicos, tais como folicular, plexiforme, acantomatoso, de células granulares e de células basais, e ainda conter células fantasmas e células fusiformes ou ser uma mistura de mais de um destes padrões (Reichart *et al.*, 1995; Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009). A variante histopatológica folicular é a mais comum e mais reconhecida e se caracteriza pela proliferação de ilhas de epitélio odontogênico, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte em um estroma fibroso e maduro. O padrão plexiforme, que também é frequentemente observado, se caracteriza pela presença de cordões de epitélio odontogênico anastomosados em um estroma frouxo e bem vascularizado. O padrão acantomatoso, se caracteriza pela presença de extensa metaplasia escamosa na porção central de uma ilha de AME folicular. As demais variantes microscópicas são descritas como bastante incomuns, e incluem o padrão de células granulares caracterizado pela acentuada transformação epitelial das porções centrais das ilhas tumorais em células granulares e o padrão de células basais caracterizado pela presença de ninhos de células basalóides lembrando o carcinoma basocelular (Reichart *et al.*, 1995; Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2010; Black *et al.*, 2010). O aspecto hemangiomatoso é ainda mais raro e exibe um padrão plexiforme associado a grandes capilares revestidos por endotélio preenchidos por sangue

(van Rensburg *et al.*, 2001; Tamgadge *et al.*, 2010). Contudo, independente do padrão histopatológico observado em cada caso de AME sólido, esta variação parece não ter relação com o comportamento biológico e nem mesmo com o prognóstico do AME e, por isso, na maioria das vezes, o laudo histopatológico não inclui esta descrição (Bachmann & Linfesty, 2009).

O AME convencional apresenta um padrão de crescimento infiltrativo se estendendo pelo osso e o tecido mole adjacente, sendo comum a observação de ilhas neoplásicas distantes da massa tumoral por entre as trabéculas de osso intacto sem evidência de alteração radiográfica (Kessler, 2004; Mendenhall *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010), o que justifica, em parte, as elevadas taxas de recorrência que variam entre 50 e 90% para os casos tratados apenas por curetagem da lesão (Kessler, 2004; Gandhi *et al.*, 2006; Neville *et al.*, 2009). Dessa forma, apesar de ainda ser um assunto controverso (Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010), as ressecções cirúrgicas incluindo margem de tecido ósseo clínica e radiograficamente sadio costuma ser a opção terapêutica mais indicada (Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005; Carlson & Marx, 2006; Mendenhall *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Black *et al.*, 2010; Fregnani *et al.*, 2010). O uso de radiografias da peça cirúrgica e de biópsia por congelação são eventualmente empregados e podem indicar margem cirúrgica comprometida (Carlson & Marx, 2006). A osteotomia periférica, a crioterapia e o uso da solução de Carnoy podem ser utilizados na tentativa de eliminar as células tumorais residuais (Mendenhall *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Fregnani *et al.*, 2010) ou minimizar as recorrências (Fregnani *et al.*, 2010).

Apesar de ser uma lesão benigna, o AME pode levar o paciente ao óbito em decorrência do seu crescimento persistente e infiltrativo que pode envolver estruturas de importância clínica, como a órbita e a base de crânio (Nastri *et al.*, 1995; Neville *et al.*, 2009). Além disso, pode apresentar comportamento maligno, como AME metastatizante ou como carcinoma ameloblástico (Sciubba *et al.*, 2005; Mendenhall *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009). As recorrências são relativamente comuns e podem depender do tamanho da lesão, do tipo de tratamento empregado, do padrão de loculação radiográfica, da presença

ou ausência de rompimento cortical (Fregnani *et al.*, 2010) e ocorrer até décadas após o tratamento inicial (Gardner *et al.*, 2005; Carlson & Marx, 2006).

A etiopatogênese do AME ainda não foi completamente elucidada, mas acredita-se que esteja relacionada com alguma alteração nos genes associados ao processo de odontogênese (Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005), envolvendo especialmente as vias de sinalização, que inclui o fator de crescimento fibroblástico, o fator de necrose tumoral, a via do tipo Wntless (Wnt) e as proteínas ósseas morfogenéticas (Gomes *et al.*, 2010; Sukarawan *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011b).

2.3. Tumor odontogênico cístico calcificante

O anteriormente denominado cisto odontogênico calcificante (COC) incluía um grupo de lesões de comportamento clínico e aspecto microscópico amplo e, que embora recebesse a denominação de cisto, desde a classificação da OMS de 1992 tem sido caracterizado como um TO, especialmente por possuir duas contrapartes sólidas, benigna e maligna, bem definidas (Philipsen & Reichart, 2002; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003, Tomich, 2004; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Habibi *et al.*, 2011). A classificação atual da OMS de 2005 desmembrou o grupo de lesões primariamente caracterizadas pela presença de células fantasmas em uma neoplasia benigna cística denominada TOCC, uma neoplasia benigna sólida denominada tumor dentinogênico de células fantasmas e uma neoplasia maligna denominada carcinoma odontogênico de células fantasmas (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005b; Takata & Lu, 2005; Ledesma-Montes *et al.*, 2008).

O TOCC é um TO benigno cístico, que apresenta origem provável na lâmina dentária e seus remanescentes e que se caracteriza pela presença de um epitélio similar ao do AME (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Crivelini *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2011). O seu amplo espectro clinicopatológico permite que seja ainda dividido em quatro tipos distintos: um tipo cístico simples, que é o mais comum e inclui ainda as lesões pigmentadas e contendo células claras (Li & Yu, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Zornosa & Müller,

2010), um tipo associado ao ODT e que também é relativamente frequente (Yoshida *et al.*, 2001; Li & Yu, 2003; Gallana-Alvarez *et al.*, 2005; Ledesma-Montes *et al.*, 2008), um tipo que exibe uma proliferação ameloblastomatosa acentuada, que é raro, costuma ser descrito como relatos de casos isolados e apresenta comportamento clínico ainda incerto com alguns autores sugerindo que seja similar ao TOCC e outros que seja similar ao AME (Aithal *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Kamboj & Juneja, 2007; Ledesma-Montes *et al.*, 2008), e um último tipo associado a outros TO diferentes do ODT, como o tumor odontogênico adenomatóide, o fibroma ameloblástico e o fibro-odontoma ameloblástico (Li & Yu, 2003; Yoon *et al.*, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008). Além disso, existe relato na literatura de um caso que evidencia a presença de um TOCC em um paciente com um TOQ simultâneo, sugerindo que a coincidência destes dois TO císticos em um mesmo paciente possa ser resultado de uma origem genética comum (Basile *et al.*, 2010).

O TOCC pode ocorrer no interior dos ossos gnáticos ou em sua mucosa de recobrimento (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Neville *et al.*, 2009), em que as lesões centrais representam entre 80 e 95% dos casos (Johnson *et al.*, 1997; Moleri *et al.*, 2002; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Habibi *et al.*, 2011). Usualmente afeta pacientes jovens, principalmente entre as 1ª e 3ª décadas de vida, especialmente quando está associado a um dente incluso ou a um ODT, o que pode ser respectivamente observado em cerca de 40% e 84% dos casos (Yoshida *et al.*, 2001; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Habibi *et al.*, 2011). A média de idade das lesões periféricas na literatura é cerca de 10 anos acima quando comparada as lesões centrais (Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2011). Não se observa predileção por sexo (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Neville *et al.*, 2009), embora alguns trabalhos exibam discreta predileção masculina (Fregnani *et al.*, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Habibi *et al.*, 2011) ou feminina (Tomich, 2004).

A região anterior de maxila ou de mandíbula é descrita como o principal sítio de acometimento do TOCC, tanto nos casos intraósseos quanto nos casos extraósseos

(Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a, Neville *et al.*, 2009), embora exista descrição de casuísticas com prevalência de lesões somente em maxila (Yoshida *et al.*, 2001; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Tomich, 2004; Ledesma-Montes *et al.*, 2008) ou somente em mandíbula (Johnson *et al.*, 1997; Tomich, 2004; Habibi *et al.*, 2011). Clinicamente, as lesões centrais manifestam-se, na maioria das vezes, como um aumento de volume lento e indolor (Johnson *et al.*, 1997; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008), mas podem ser identificadas como achados radiográficos de rotina (Li & Yu, 2003; Tomich, 2004) ou estarem associados a dor (Johnson *et al.*, 1997; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003). Podem ainda provocar deslocamento ou reabsorção dentária (Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a). As lesões periféricas, por sua vez, apresentam-se como nódulos gengivais inespecíficos de consistência firme e indolores (Johnson *et al.*, 1997; Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Resende *et al.*, 2011).

Radiograficamente, o TOCC intraósseo é descrito principalmente como uma imagem radiolúcida unilocular bem delimitada contendo pequenos focos de calcificação em cerca de 50% dos casos (Moleri *et al.*, 2002; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008), um achado que costuma ser mais comumente observado nos casos que estão associados a um ODT (Tomich, 2004; Ledesma-Montes *et al.*, 2008). A presença de um dente incluso, particularmente um canino, costuma ser observada principalmente nos casos de TOCC do tipo cístico simples (Johnson *et al.*, 1997; Fregnani *et al.*, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008), e expansão óssea e reabsorção radicular também não são achados infrequentes (Moleri *et al.*, 2002; Li & Yu, 2003; Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a). O exame radiográfico das lesões localizadas exclusivamente na mucosa de recobrimento dos ossos gnáticos pode evidenciar a presença de material calcificado e a erosão no osso alveolar subjacente em cerca de 10% dos casos (Moleri *et al.*, 2002; Resende *et al.*, 2011).

A histopatologia do TOCC revela uma lesão cística revestida por um epitélio que se assemelha ao do AME, incluindo a proliferação de um epitélio caracterizado por células colunares dispostas lado a lado e com núcleo polarizado na camada basal e células

dispostas frouxamente lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte nas camadas mais superficiais. Nas camadas suprabasais, é possível encontrarmos células com citoplasma demarcado, eosinofílico, ausência do núcleo, que são denominadas células fantasmas e representam a característica mais marcante deste grupo de neoplasias (Johnson *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2001; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008). É importante destacar que a presença destas células fantasmas constitui elemento diagnóstico do TOCC, contudo, não patognomônico, visto que proliferação localizada de células fantasmas pode também ser observada em outros TO, tais como o ODT, o AME e o fibro-odontoma ameloblástico (Moleri *et al.*, 2002; Tomich, 2004) e em duas lesões não odontogênicas, o pilomatrixoma, uma neoplasia cutânea de origem folicular, e o craniofaringioma, uma neoplasia da glândula pituitária (Johnson *et al.*, 1997; Lucchese *et al.*, 2007). Pode se observar ainda focos de calcificação distrófica e presença de material dentinóide adjacente à camada basal do revestimento epitelial (Johnson *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2001; Fregnani *et al.*, 2003; Li & Yu, 2003; Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008).

O TOCC, associado ou não a um ODT, costuma ser tratado com sucesso por meio de enucleação, contudo, quando ele está associado a outro TO, o tratamento deve ser compatibilizado com o manejo proposto para este outro TO (Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Neville *et al.*, 2009).

A etiopatogênese do TOCC e das demais lesões do amplo grupo de TO contendo células fantasmas também não foi completamente elucidada, mas estudos incluindo análise imunoistoquímica e molecular têm evidenciado que alterações na via de sinalização Wnt, incluindo mutações nos genes associados à expressão de β -catenina, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e diferenciação do TOCC (Sekine *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2008). A natureza das células fantasmas também tem sido motivo de constante debate e, apesar de ainda não ter sido determinada, as principais hipóteses descritas incluíram as seguintes justificativas: uma forma de queratinização aberrante, uma degeneração celular, uma forma de matriz de esmalte, corpos apoptóticos de

células odontogênicas ou ainda estágio diferente de uma queratinização normal (Takata *et al.*, 2000; Lucchese *et al.*, 2007; Crivelini *et al.*, 2009), que também já teve seu desenvolvimento relacionado a via de sinalização Wnt (Tanaka *et al.*, 2007).

2.4. Via de sinalização Wnt/ β -catenina

As moléculas da via de sinalização parácrina Wnt incluem, na espécie humana, 19 glicoproteínas secretadas e dotadas de funções distintas e sobrepostas, que estão associadas à proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento precoce e a homeostase na vida adulta, e apresentam capacidade de ativar diferentes vias de sinalização intracelular, em especial a via associada à proteína β -catenina, a mais estudada e denominada canônica (Alberts *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Liu & Millar, 2010). As glicoproteínas da família Wnt, uma das mais importantes famílias de moléculas de sinalização durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares, estão distribuídas por todo o tecido por meio de ligação com proteoglicanos de heparan sulfato (Sathi *et al.*, 2007). Tradicionalmente, a família Wnt está dividida em dois grupos de acordo com a sua capacidade de ativar a via de sinalização Wnt/ β -catenina: os membros da classe Wnt1 (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b e Wnt8a) e os membros da classe Wnt5a (Wnt4, Wnt5a e Wnt11), no qual o primeiro grupo exibe maior potencial de ativação da via canônica que o segundo (Liu & Millar, 2010), embora, hoje, se saiba que as glicoproteínas Wnt11 e Wnt5a também tenham capacidade de ativar a via β -catenina diretamente (Sathi *et al.*, 2007; Pukrop & Binder, 2008; Liu & Millar, 2010; Lin *et al.*, 2011). Além disso, a glicoproteína Wnt5a pode ainda atuar como antagonista da via canônica por meio da inibição da glicoproteína Wnt3 (Mikels & Nusse, 2006; Sathi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011), um mecanismo importante de interação entre as vias canônica e não-canônica (Mikels & Nusse, 2006).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina está centrada na estabilização e subsequente acúmulo nuclear de β -catenina (Polakis, 2000; Alberts *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Liu & Millar, 2010), que atuará na expressão de genes associados ao ciclo celular durante a proliferação, citodiferenciação e histodiferenciação no

desenvolvimento embrionário e durante o controle da proliferação e motilidade celulares na vida adulta (Sathi *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008; Tanahashi *et al.*, 2008; Sukarawan *et al.*, 2010), e que pode ser reativada, principalmente, quando associada ao desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias malignas (Morin, 1999; Polakis, 2000; Clevers, 2006). A via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenha também importante papel na odontogênese, sendo ativada no ectomesênquima odontogênico no início do processo de desenvolvimento do dente (Chen *et al.*, 2009) e já foi identificada por imunistoquímica e hibridização *in situ* em vários estágios de desenvolvimento deste órgão (Sarkar & Sharpe, 1999; Obara *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Siriwardena *et al.*, 2009).

A β -catenina é uma proteína citoplasmática ligante de caderina multifuncional, envolvida na adesão celular ao formar uma unidade na membrana celular com a E-caderina, (Obara *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2008; Brigidi & Bamji, 2011), e que funciona como ativadora transcricional no núcleo por meio da família TCF/LEF (Willert & Nusse, 1998; Morin, 1999; Miyake *et al.*, 2006; Sathi *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008; Matsuzawa *et al.*, 2009). Esta proteína, normalmente, é degradada de forma rápida no citoplasma das células epiteliais e mesenquimais quando não está associada à caderina (Alberts *et al.*, 2008). A participação da β -catenina como ativadora transcricional no núcleo ocorre por ativação da via Wnt canônica que vai permitir a estabilização da β -catenina citoplasmática, que acumulada será translocada para o núcleo da célula e ativará fatores de transcrição que irão acelerar a expressão de genes que codificam proteínas associadas ao ciclo celular e a progressão tumoral (Lustig & Behrens, 2003; Chen *et al.*, 2008; Tanahashi *et al.*, 2008; Liu & Millar, 2010).

Em situações de normalidade com células não estimuladas, a proteína *adenomatous polyposis coli* (APC) captura a β -catenina e a conduz para a formação de um complexo com a axina e o glicogênio sintetase quinase 3- β (GSK-3 β), que por sua vez fosforila todas as proteínas do complexo e permite, então, que a β -catenina seja identificada e removida por mecanismos de ubiquitinação e degradada nos proteossomos por intermédio do componente da ligase de ubiquitina β -TRCP (Castro *et al.*, 2000; Polakis, 2000; Van Aken *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). Na presença do sinal Wnt

durante o desenvolvimento por meio da interação entre uma das glicoproteínas da classe Wnt1 com o receptor de superfície celular *Frizzled* (FZ) e o seu co-receptor de proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP), ocorre ativação da proteína sinalizadora citoplasmática denominada *Dishelleved* (DSH), que ao ser fosforilada, atua dissociando e inativando o complexo de degradação da β -catenina, que não é mais degradada e começa a se acumular no citoplasma e, subsequentemente, no núcleo, local no qual exercerá, em associação com outras proteínas, sua função de ativadora transcricional (Polakis, 2000; Lo Muzio, 2001; Clevers, 2006; Alberts *et al.*, 2008; Liu & Millar, 2010). Além da sequência descrita anteriormente, é importante destacar que esta via de sinalização pode ocorrer a partir de SDC-1, que é capaz de ativar diretamente Wnt1 e Wnt5a. Um resumo do funcionamento da via de sinalização Wnt/ β -catenina encontra-se ilustrado sob a forma de um desenho esquemático na figura 1.

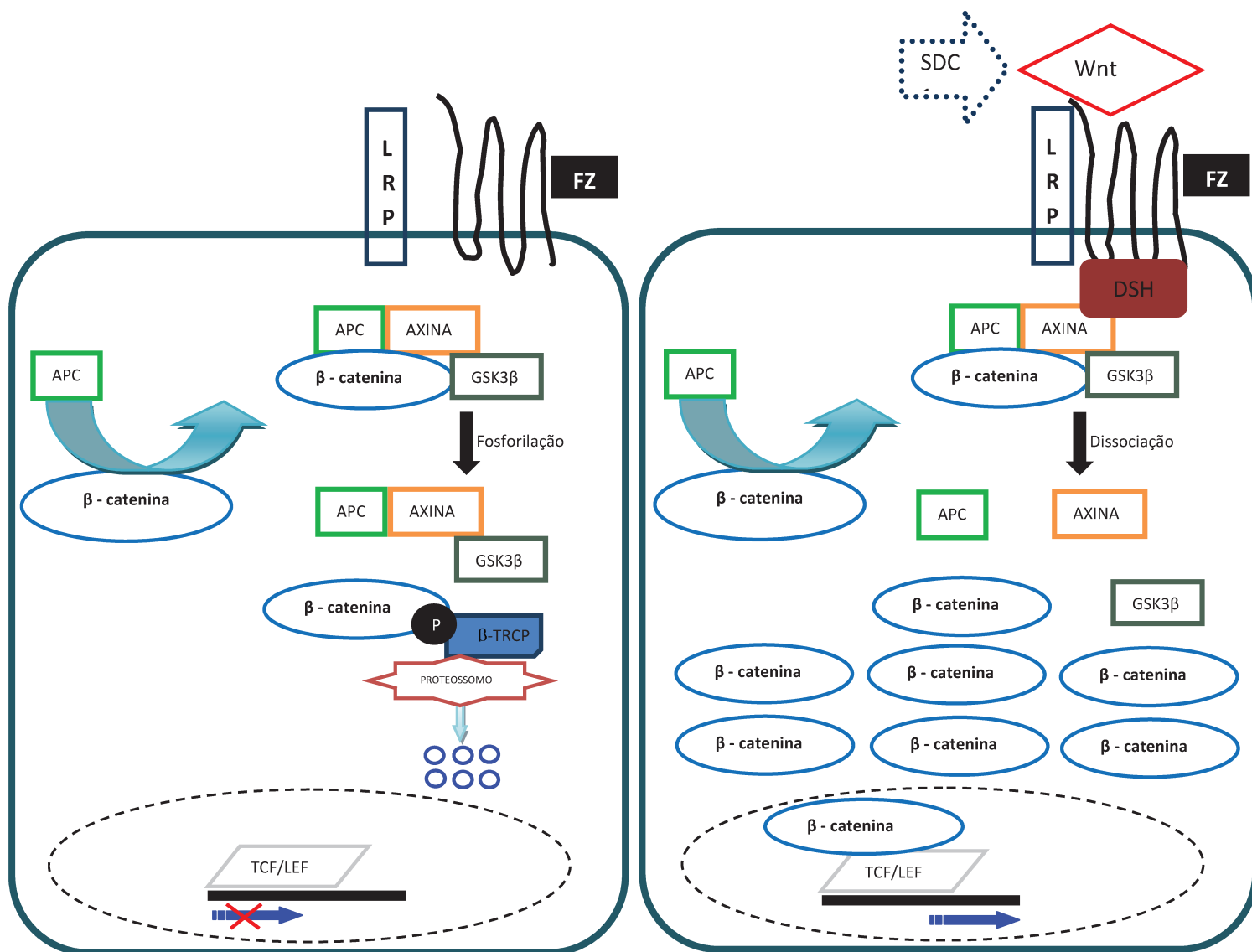


Figura 1. Esquema simplificado e adaptado da via Wnt/β-catenina. À esquerda a via Wnt desativada, na qual a β-catenina é degradada no citoplasma, e à direita a via Wnt/β-catenina ativada, na qual a β-catenina atua como ativadora transcricional no núcleo. Fonte base: Liu & Millar, 2010.

Apesar de nem todos os mecanismos serem completamente elucidados, sabe-se que a via de sinalização Wnt/β-catenina parece ser bem regulada de forma que as características das próprias glicoproteínas da família Wnt, a disponibilidade de seus receptores e a disponibilidade citoplasmática e nuclear de β-catenina funcionam como

componentes ativos deste mecanismo (Kikuchi, 2000; Lustig & Behrens, 2003; Mikels & Nusse, 2006; Pukrop & Binder, 2008).

A glicoproteína Wnt1 foi primeiramente identificada como um oncogene mamário em 1982 (Lo Muzio, 2001; Clevers, 2006), e a sua superexpressão já foi observada em algumas malignidades de baixo grau, incluindo o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular de boca e de esôfago bem diferenciados, o carcinoma de não pequenas células pulmonar e o câncer colorretal bem diferenciado (Lo Muzio, 2001; Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b). Sugere-se que o seu potencial oncogênico seja resultado de um mecanismo antiapoptótico (Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b), embora também seja descrita a possibilidade de uma função de mediador apoptótico (Siar *et al.*, 2011b). É importante destacar que a expressão de Wnt1 também já foi identificada em tumores benignos localmente agressivos, como o AME e o tumor odontogênico queratocístico (Siar *et al.*, 2011b).

Como citado anteriormente, Wnt5a atua de forma contraditória ativando a via de sinalização não-canônica e inibindo a via de sinalização canônica (Clevers, 2006; Liu & Millar, 2010; Siar *et al.*, 2011b), e tem sido descrita associada à odontogênese (Liu & Millar, 2010). Durante o desenvolvimento dentário no estágio de botão, Wnt5a é expressa pelas células mesenquimais adjacentes ao epitélio dentário, e se mantém fortemente expressa no ectomesênquima da papila dentária durante o estágio de capuz, e provavelmente está associada a uma regulação positiva de inibidores de Wnt nas células ectomesenquimais durante este período de desenvolvimento do dente (Liu & Millar, 2010). A produção de Wnt5a por células tumorais ou pelas células do estroma pode diferenciar o seu potencial de ser supressora ou promotora de tumor (Pukrop & Binder, 2008). Além disso, esta glicoproteína tem sido recentemente associada à invasão tumoral e a metástase em casos de melanoma sem associação com a via canônica e o acúmulo nuclear de β -catenina (Lustig & Behrens, 2003; O'Connel *et al.*, 2009), mas potencializado por proteoglicanos de heparan-sulfato, como o SDC-1 e o syndecan-4 (O'Connel *et al.*, 2009).

O SDC-1, também denominado CD138, é um proteoglicano de heparan sulfato transmembrana, identificado em células epiteliais, endoteliais e mesenquimais (Leocata *et*

al., 2007; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2012) e que, nas células epiteliais maduras se liga a proteínas da matriz extracelular (MEC), modulando a interação entre epitélio e tecido conjuntivo, a proliferação e a diferenciação celular e, o controle da arquitetura celular (Leocata *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2012). É transitoriamente expresso nas células mesenquimais e nos ameloblastos do germe dentário durante o processo de odontogênese como um receptor regulador de fatores de crescimento e de moléculas transdutoras de sinais e, pode ativar diretamente Wnt1 (Leocata *et al.*, 2007) e Wnt5a (O'Connell *et al.*, 2009), aumentando a via de sinalização Wnt/ β -catenina (Liu & Millar, 2010; Teng *et al.*, 2012). O padrão de expressão de SDC-1 é pleiotrópico e está diretamente relacionado com o seu potencial de supressão ou promoção tumoral dependente do tipo de célula em que está expresso (Davies *et al.*, 2004; Mennerich *et al.*, 2004; Baba *et al.*, 2006), no qual a expressão em células epiteliais está relacionada com a função supressora e a expressão em células estromais com a função promotora (Davies *et al.*, 2004). Além disso, há evidências de que SDC-1 possa modular a via de sinalização Wnt, e é fundamental na tumorigênese de Wnt1 induzida em glândulas mamárias de camundongos (Alexander *et al.*, 2000). Por conseguinte, pelo papel que desempenha na via de sinalização Wnt/ β -catenina durante a odontogênese e pela transferência de expressão de SDC-1 das células epiteliais para as células estromais e MEC em neoplasias malignas (Leocata *et al.*, 2007), como o câncer de cabeça e pescoço, de ovário, de próstata, de pâncreas e de pulmão (Teng *et al.*, 2012), é de se esperar que este proteoglicano esteja também envolvido no desenvolvimento de TO (Leocata *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo as glicoproteínas Wnt sugerem que elas tenham participação na carcinogênese humana por meio de alteração na distribuição de β -catenina e indução da transcrição de genes relacionados à proliferação celular de forma a levar a um desequilíbrio entre as taxas de apoptose e replicação (Polakis, 2000; Lo Muzio, 2001; Lustig & Behrens, 2003). Dessa forma, a ativação aberrante da via de sinalização Wnt/ β -catenina na vida adulta leva a translocação nuclear de β -catenina e está associada, na maioria das vezes, ao desenvolvimento e progressão tumoral de vários tipos de neoplasias malignas, como o melanoma e o meduloblastoma, e alguns tipos de cânceres de estômago, fígado, cólon, pulmão, próstata, ovário, endométrio, glândulas salivares e do sistema

hematopoiético (Morin, 1999; Polakis, 2000; Clevers, 2006; Sathi *et al.*, 2007; Siriwardena *et al.*, 2009; Liu & Millar, 2010; Sukarawan *et al.*, 2010), mas também pode estar associada a alguns tipos de neoplasias benignas, como o pilomatrixoma e o craniofaringioma (Hassanein *et al.*, 2003; Clevers, 2006) e também de origem em glândula salivar (Liu & Millar, 2010). Esta translocação foi demonstrada por meio da expressão imunoistoquímica nuclear da β -catenina em diferentes tumores (Castro *et al.*, 2000; Van Aken, 2001; Saldanha *et al.*, 2004), mas, apesar da recente identificação em modelos experimentais e da possibilidade de ativação pela exposição à proteína de esmalte amelogenina (Matsuzawa *et al.*, 2009), pouco ainda se sabe sobre o seu papel nas lesões odontogênicas (Gomes *et al.*, 2010).

2.5. Papel da via de sinalização Wnt/ β -catenina no AME e no TOCC

O AME é uma neoplasia epitelial benigna, de crescimento lento e localmente invasivo, na qual existe uma interação entre as células epiteliais tumorais e as células denominadas ectomesenquimais e a matriz extracelular (MEC) (Leocata *et al.*, 2007) e, por isso, alguns estudos recentes têm sido realizados na tentativa de identificar o papel das moléculas sinalizadoras responsáveis por esta interação no seu desenvolvimento (Sekine *et al.*, 2003; Leocata *et al.*, 2007; Sathi *et al.*, 2007; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Tanahashi *et al.*, 2008; Siriwardena *et al.*, 2009; Sukarawan *et al.*, 2010).

Moléculas sinalizadoras da via Wnt canônica, como a β -catenina já foram identificadas na membrana, no citoplasma e no núcleo das células neoplásicas de AME sólido (Kumamoto & Ooya, 2005; Tanahashi *et al.*, 2008; Alves Pereira *et al.*, 2010), de forma semelhante ao observado no epitélio dentário interno e externo e nas células do retículo estrelado do órgão dentário durante a amelogênese (Tanahashi *et al.*, 2008; Liu & Millar, 2010), num processo que pode ser ativado pela amelogenina, que como demonstrado em estudos experimentais *in vivo*, leva a superexpressão de β -catenina por modificação ou suplementação da via Wnt/ β -catenina (Matsuzawa *et al.*, 2009). Dessa forma, a superexpressão nuclear de β -catenina identificada em AME e não em germes dentários por estudos imunoistoquímicos (Kumamoto & Ooya, 2005; Tanahashi *et al.*,

2008; Siriwardena *et al.*, 2009), parece ter relação com o seu processo de tumorigênese, especialmente pela identificação concomitante de aumento da proliferação celular na superexpressão da proteína Ki-67 (Tanahashi *et al.*, 2008).

Em AME, o padrão de expressão de β -catenina parece ser variável de acordo com o tipo histopatológico, podendo apresentar superexpressão nuclear em AME folicular e acantomatoso, superexpressão de membrana em AME plexiforme (Sekine *et al.*, 2003; Kumamoto & Ooya, 2005; Miyake *et al.*, 2006), expressão forte nas células granulares centrais e expressão fraca nas células cuboidais periféricas no AME de células granulares (Sathi *et al.*, 2007), reforçando o seu possível papel no processo de citodiferenciação das células neoplásicas dos AME (Kumamoto & Ooya, 2005). Ainda assim, é importante destacar que os níveis transcricionais e a dosagem da proteína β -catenina ainda não foram identificados (Gomes *et al.*, 2010) e que esta superexpressão de β -catenina parece não estar relacionada com uma mutação no gene que codifica esta proteína (Sekine *et al.*, 2003; Miyake *et al.*, 2006; Tanahashi *et al.*, 2008; Siriwardena *et al.*, 2009), característica, ao contrário, observada nos TOCC (Sekine *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2008), que também exibiram positividade imunoistoquímica nuclear e citoplasmática de β -catenina somente nas células epiteliais (Hassanein *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos avaliaram a expressão imunoistoquímica de Wnt1 em AME (Leocata *et al.*, 2007; Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b), e de um modo geral, a maioria dos casos exibiu positividade numa proporção que variou entre cerca de 70% e 90% (Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b), com destaque para o fato das lesões primárias de AME sólido plexiforme exibirem forte positividade com maior frequência que suas lesões recorrentes e que o inverso aconteceu nos casos de AME unicístico (Chuah *et al.*, 2009). Além disso, em estudo avaliando a expressão das diferentes moléculas de Wnt associadas à via canônica e a via não-canônica, foi possível observar que, independente do subtipo histopatológico, a imunoexpressão mais representativa foi a de Wnt1 (Siar *et al.*, 2011b), um achado que não foi reproduzido em outro estudo que observou uma menor positividade de Wnt1 nas variantes desmoplásica e plexiforme de AME (Leocata *et al.*, 2007). Contudo, levando em consideração a arquitetura complexa do AME, a positividade para Wnt1 é

descrita nas células da periferia e da porção central de aspecto similar ao retículo estrelado do órgão dentário (Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011), bem como nas áreas de queratinização da metaplasia escamosa e de células granulares (Chuah *et al.*, 2009), e eventualmente nas células estromais e na MEC associadas (Leocata *et al.*, 2007). A presença de quantidade significativa de casos Wnt1 negativos observados na série de AME publicada por Leocata *et al.* (2007), pode ser justificada pela probabilidade de participação de outros membros da família sinalizadora Wnt, como a Wnt5a, no desenvolvimento do AME (Leocata *et al.*, 2007; Sathi *et al.*, 2007; Sukarawan *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011b).

A expressão de Wnt5a, molécula de sinalização da via Wnt não-canônica capaz de regular o crescimento, a padronização e a diferenciação do desenvolvimento dentário (Lin *et al.*, 2011), foi observada nas células epiteliais de AME, incluindo as células granulares (Sathi *et al.*, 2007; Sukarawan *et al.*, 2010), enquanto foi observada somente nas células mesenquimais nos estágios iniciais do desenvolvimento do dente (Liu & Millar, 2010) com expressão fraca nas células mesenquimais e forte nas células do epitélio dentário interno e externo do órgão dentário, além de ser também expressa em ameloblastos pré-secretores (Sukarawan *et al.*, 2010). Estudos experimentais identificaram ainda que a superexpressão de Wnt5a em linhagem de células de AME foi capaz de promover a sobrevida da célula com perda de inibição de contato, perda de ancoragem dependente e aumento da formação tumoral, justificando assim o seu possível papel no desenvolvimento e invasividade dos AME, podendo posteriormente ser inibida e servir como uma abordagem terapêutica futura na tentativa de evitar as grandes cirurgias para a cura do AME (Sukarawan *et al.*, 2010). Contudo, estudo avaliando as vias canônicas e não-canônica de Wnt em 72 casos de AME, não identificou positividade para Wnt5a em nenhum dos seus casos (Siar *et al.*, 2011b).

Finalmente, alguns trabalhos avaliaram a expressão comparativa de SCD-1, proteoglicano capaz de ativar a via de sinalização Wnt/ β -catenina por meio de Wnt1 e Wnt5a, em AME e germes dentários (Leocata *et al.*, 2007; Sathi *et al.*, 2007; Sukarawan *et al.*, 2010). Nos germes dentários, a expressão de SCD-1 foi observada em 100% das células estromais e na MEC, em cerca de 70% das células epiteliais e em alguns ameloblastos,

enquanto que no AME, esta expressão foi observada em cerca de 50% das células estromais, 70% da MEC e 20% das células epiteliais, achados que corroboram com a função esperada para este proteoglicano na interação ectomesenquimal dos germes dentários e com o possível envolvimento no processo tumorigênico dos AME ao substituir a expressão epitelial pela expressão estromal (Leocata *et al.*, 2007), o que é ainda mais reforçado pela menor expressão de SDC-1 observada em carcinomas ameloblásticos quando comparado a algumas variantes de AME (Bologna-Molina *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a redução na expressão de SDC-1 nas células epiteliais de AME, observada também por Bologna-Molina *et al.* (2008), e a sua concomitante transferência para as células estromais, tem sido descrita em neoplasias malignas e pré-malignas em suas progressões tumorais e desenvolvimento de metástases (Leocata *et al.*, 2007). Além disso, a manutenção da expressão de SDC-1 nos folículos dentários parece ter relação com a manutenção da movimentação e proliferação das células no processo de erupção dos dentes (Shibata *et al.*, 2007). E, finalmente, sabe-se que a ativação da via de sinalização Wnt acarreta em aumento de proteoglicanos de heparan sulfato, como SDC-1 (Leocata *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008; Liu & Millar, 2010).

3. Proposição

3.1. Objetivo geral

Avaliar de forma comparativa a expressão imunoistoquímica de marcadores associados direta ou indiretamente à via de sinalização Wnt/ β -catenina no desenvolvimento do AME sólido e do TOCC.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão imunoistoquímica das glicoproteínas de sinalização da família Wnt canônica (Wnt1) e não-canônica (Wnt5a) em AME sólidos e TOCC.

2. Avaliar a expressão imunoistoquímica citoplasmática e nuclear da proteína β -catenina em AME sólidos e TOCC.

3. Avaliar a expressão imunoistoquímica do proteoglicano de heparan-sulfato SDC-1 em AME sólidos e TOCC.

4. Comparar a expressão imunoistoquímica dos marcadores associados a via de sinalização Wnt/ β -catenina entre as lesões de AME e TOCC.

4. Material e métodos

4.1. Seleção da amostra

A seleção dos casos foi feita a partir do arquivo de lâminas da tese de doutorado intitulada “Estudo demográfico e clinicopatológico retrospectivo de tumores odontogênicos de uma casuística da cidade do Rio de Janeiro” aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP) sob o número 133/2008 (Anexo 1).

Foram avaliados 34 casos de AME e 6 casos de TOCC do arquivo do Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO/UERJ), no qual os critérios de inclusão foram: quantidade suficiente de material para a realização das reações imunoistoquímicas e a disponibilidade dos blocos de parafina.

Após a seleção inicial, os blocos de parafina provenientes de biópsias representativas e de peça cirúrgica de 18 casos de AME e 6 casos de TOCC foram selecionados e incluídos neste estudo.

4.2. Análise dos dados demográficos, clínicos e radiográficos

Os dados referentes às características demográficas (idade e sexo dos pacientes), clínicas (localização das lesões e presença de sintomas) e radiográficas (tipo de imagem radiográfica) foram obtidos a partir das informações do arquivo da tese de doutorado intitulada “Estudo demográfico e clinicopatológico retrospectivo de tumores odontogênicos de uma casuística da cidade do Rio de Janeiro”. Para a descrição da localização anatômica das lesões, a maxila e a mandíbula foram divididas em três diferentes regiões: anterior (incisivos e caninos), intermediária (pré-molares) e posterior (a partir dos molares, incluindo ângulo e ramo na mandíbula e tuberosidade na maxila). As informações sobre a evolução dos casos não estavam disponíveis, pois todos os dados do arquivo da tese foram obtidos a partir da ficha de requisição laboratorial.

4.3. Análise histopatológica

A partir dos blocos de parafina selecionados, cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina, com espessura de 5µm foram confeccionados para todos os casos e reavaliados sob microscopia óptica no Laboratório de Patologia oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense de Nova Friburgo (FOUFF/NF).

A avaliação microscópica foi realizada pelo pesquisador responsável e seu orientador, e a confirmação do diagnóstico final foi baseada nos critérios propostos pela OMS para a Classificação dos TO (Barnes *et al.*, 2005).

4.4. Análise imunoistoquímica

Os cortes histológicos de 3µm em lâminas silanizadas foram realizados no Laboratório de Patologia Oral da FOUFF/NF e as reações imunoistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá do Rio de Janeiro (FO/UNESA).

As reações imunoistoquímicas foram realizadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica da FO/UNESA da seguinte forma: os cortes histológicos foram desparafinizados em um xilol a 50° C por 20 minutos e em outro xilol a temperatura ambiente por cinco minutos, hidratados em soluções de álcool em concentrações decrescentes (absoluto, 90°, 70° e 50°) e lavados em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada com uma solução de ácido cítrico monohidratado (10mM, pH 6,0, 25°C) e incubados em dois ciclos de 12 minutos aquecidos em forno de microondas. Após resfriamento do líquido, por um período de 20 minutos em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água corrente durante cinco minutos, e posteriormente, mergulhados em solução de peróxido de hidrogênio a 20 volumes em cinco banhos de cinco minutos cada, com o intuito de inibir a ação da peroxidase endógena, e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, os cortes foram deixados por cinco minutos no leite, lavados em água corrente e colocados em solução de PBS (phosphate-buffered saline) de pH 7,4. Os

cortes foram incubados separadamente com anticorpos monoclonais primários, diluídos em albumina bovina sérica a 1% (BSA), em câmara úmida ao longo de toda a noite na temperatura de 4° C (tabela 3). Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram tratados com os anticorpos secundários do sistema ADVANCE (Dako) e a revelação feita por meio do cromógeno Diaminobenzidina (SIGMA) para visualizar a atividade da peroxidase. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Os controles positivos, usados em todas as reações, estão descritos na tabela 3. E não foi utilizado controle negativo. Os casos que apresentaram imunomarcção negativa foram repetidos para confirmar esse resultado e um caso de AME que apresentou negatividade para todos os anticorpos foi excluído desse estudo.

Tabela 3 – Anticorpos primários, clones, fabricantes, diluições e controles positivos empregados na análise imunoistoquímica dos casos de AME e TOCC.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Controle positivo</i>
Wnt1	Policlonal purificado	R&D SYSTEMS	1:100	Carcinoma de mama
Wnt5a	442625	R&D SYSTEMS	1:50	Intestino delgado de rato
β -catenina	17 C 2	NOVOCASTRA	1:100	Hiperplasia fibrosa
SDC-1 (CD138)	MI15	DAKO	1:100	Hiperplasia fibrosa

A expressão dos marcadores imunoistoquímicos foi avaliada quanto à localização e porcentagem de células marcadas, em que a expressão de Wnt1 e Wnt5a foi avaliada no citoplasma das células epiteliais, a expressão de SDC-1 foi avaliada na membrana e citoplasma das células epiteliais e no estroma. A avaliação da porcentagem positiva de Wnt1, Wnt5a e SDC-1 foi classificada em: indetectável; detectável em menos de 50% das células; e detectável em 50% das células ou mais. Com relação ao marcador β -

catenina, a análise foi classificada em negativa; presente na membrana; na membrana e no citoplasma; no citoplasma; ou no citoplasma e no núcleo, sem levar em consideração o percentual de células marcadas. As análises foram realizadas pelo pesquisador responsável e seu orientador de forma independente e conjunta até que se obtivesse um consenso na marcação.

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e aprovada. O certificado da resolução está anexado ao final desta dissertação (Anexo 2).

5. Resultados

5.1. Características clínicas

Um total de 24 lesões, sendo 17 casos de AME e seis casos de TOCC foi incluído no estudo final e a coleta das informações clínicas foram realizadas com o intuito de situar os casos com o perfil da literatura.

As informações clínicas dos casos de AME selecionados incluíram 14 casos envolvendo a mandíbula (82,3%), principalmente na região intermediária e/ou posterior, um caso envolvendo a maxila (5,8%), e dois casos não tinham esta informação disponível. Quatro casos envolveram concomitantemente as regiões intermediária e posterior da mandíbula. O sexo masculino foi afetado em 10 casos (58,8%), o sexo feminino em seis casos (35,3%), e em um caso esta informação estava indisponível. A idade no momento do diagnóstico variou entre 12 e 72 anos, com uma média de 33,9 anos de idade. O aspecto radiográfico descrito nas fichas de requisição incluiu cinco casos como imagem radiolúcida (29,4%), três deles especificadas como uniloculares (17,6%), quatro como multiloculares (23,5%) e cinco sem informação sobre loculação disponível (29,4%). Seis casos foram descritos como assintomáticos (85,7%), um caso apresentou sintoma (14,3%), e em 10 casos esta informação estava indisponível.

Nos casos de TOCC, três casos envolveram a mandíbula, dois casos envolveram a maxila e um caso não tinha esta informação disponível, sendo cinco pacientes do sexo feminino e um caso sem informação sobre o sexo do pacientes. As idades variaram entre 10 e 28 anos no momento do diagnóstico e a idade média foi de 17 anos. Três casos estavam descritos como assintomáticos e os demais não apresentavam esta informação disponível.

A distribuição das informações clínicas dos casos de AME e TOCC avaliados encontra-se descrita nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Distribuição das características demográficas, clínicas e radiográficas dos 17 casos de AME avaliados.

<i>Caso</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Aspecto radiográfico</i>	<i>Local</i>	<i>Sintoma</i>
1	28	M	ND	MANp	N
2	48	M	RL	MAN	ND
3	18	M	RLU	MANp	N
4	43	M	RLM	MANp	N
5	26	M	RLU	MANip	ND
6	22	F	RL	MAXp	ND
7	31	F	RLM	MANip	ND
8	40	F	RLM	MANip	N
9	29	F	ND	ND	ND
10	32	F	RLM	MANip	S
11	ND	M	ND	MANa	ND
12	35	M	RL	MAN	ND
13	12	M	RLU	MANa	N
14	55	M	ND	MANa	ND
15	17	F	RL	MAN	N
16	ND	ND	ND	ND	ND
17	72	M	RL	MANa	ND

Legendas utilizadas: M = masculino; F = feminino; RL = radiolúcida; RLM = radiolúcida multilocular; RLU = radiolúcida unilocular; MAN = mandíbula; MANp = mandíbula posterior; MANip = mandíbula intermediária posterior; MANa = mandíbula anterior; MAXp = maxila posterior; S = sim; N = não; ND = não disponível.

Tabela 5 – Distribuição das características demográficas, clínicas e radiográficas dos seis casos de TOCC avaliados.

<i>Caso</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Aspecto radiográfico</i>	<i>Local</i>	<i>Sintoma</i>
1	28	F	RLU	MAXaip	N
2	15	F	RLM	MANp	N
3	11	F	MIS	ND	ND
4	10	F	RLU	MANai	N
5	22	ND	MIS	MAXp	ND
6	16	F	RL	MANp	ND

Legendas utilizadas: F = feminino; RLU = radiolúcida unilocular; RLM = radiolúcida multilocular; MIS = radiolúcida com áreas radiopacas (mista); MAXaip = maxila anterior intermediária posterior; MANai = mandíbula anterior intermediária ; MANp = mandíbula posterior; ND = não disponível.

5.2. Características histopatológicas

Os casos de AME exibiam as características microscópicas clássicas com proliferação epitelial de células colunares exibindo núcleo polarizado lembrando ameloblastos e de áreas com arranjo frouxo lembrando o retículo estrelado do órgão dentário, em que sete casos exibiam padrão plexiforme, quatro casos exibiam padrão folicular e um caso exibia padrão acantomatoso. Além disso, cinco casos exibiam um padrão híbrido com a presença de mais de uma variante microscópica e um dos casos do tipo plexiforme apresentava ainda um aspecto hemangiomaso (figuras 2, 3, 4 e 5 e tabela 8).

Os casos de TOCC também exibiam as características microscópicas clássicas, incluindo a presença de cavidade cística revestida por epitélio ameloblastomatoso com formação de células fantasmas, e dois casos exibiam ainda presença de material calcificado (figura 6).

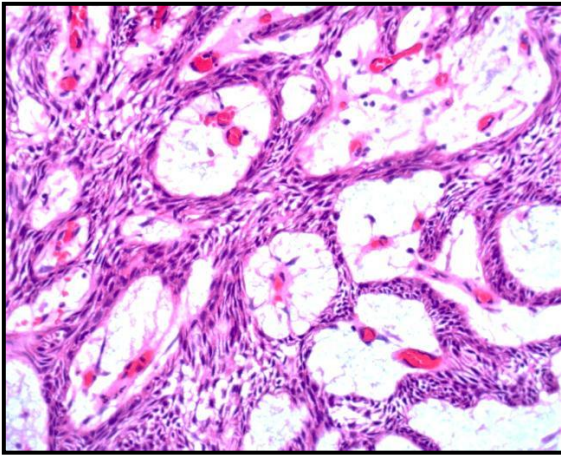


Figura 2 - AME plexiforme
(hematoxilina e eosina, aumento original 200x)

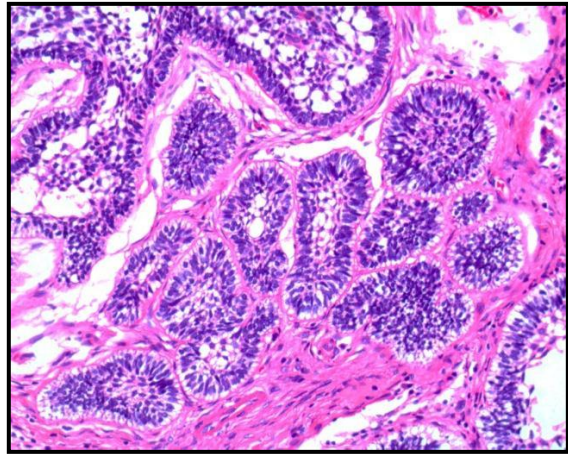


Figura 3 - AME folicular
(hematoxilina e eosina, aumento original 200x)

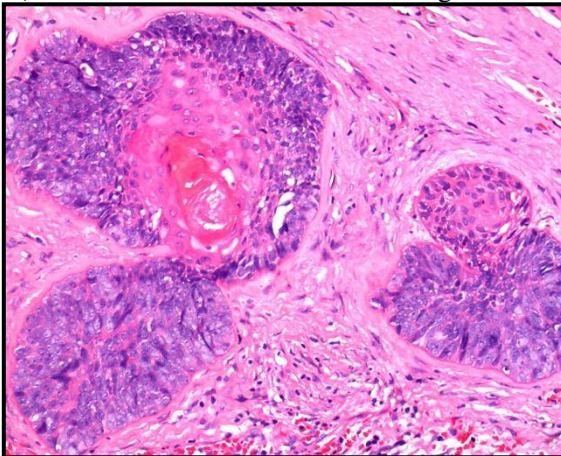


Figura 4 - AME acantomatoso
(hematoxilina e eosina, aumento original 200x)

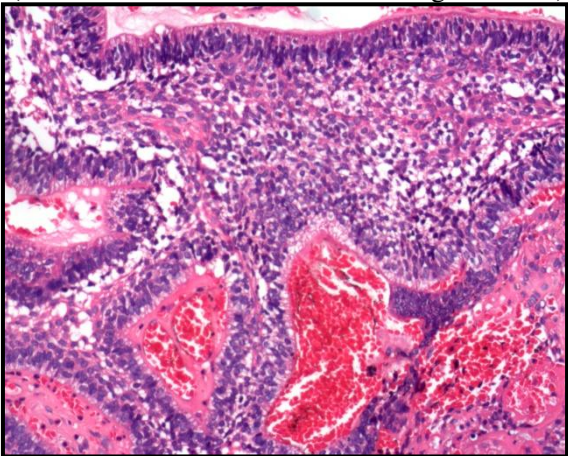


Figura 5 - AME com aspecto hemangiomatico
(hematoxilina e eosina, aumento original 200x)

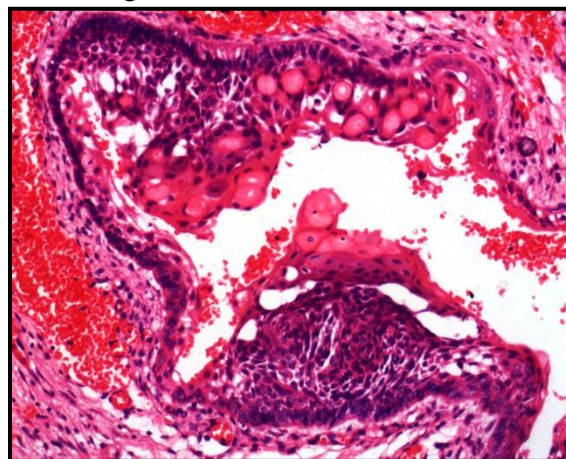


Figura 6 - TOCC
(hematoxilina e eosina, aumento original 200x)

5.3 Características imunoistoquímicas

Os casos de AME exibiram positividade imunoistoquímica para pelo menos um dos marcadores utilizados, contudo, a análise individual revelou algumas variações gerais e de acordo com o padrão histopatológico e encontra-se descrita na tabela 6. O anticorpo Wnt1 foi positivo em 64,5% dos casos, sendo positivo em menos de 50% das células tumorais em nove casos (52,9%), positivo em 50% ou mais das células tumorais em três casos (11,6%) e indetectável em cinco casos (29,4%) (tabela 7 e figura 7). O anticorpo Wnt5a foi positivo em nove casos (53%), todos eles com padrão de positividade em menos de 50% das células tumorais, e em oito casos (47%) sua expressão foi indetectável (tabela 8 e figura 8). O anticorpo SDC-1 foi positivo em todos os casos, sendo identificado em 50% ou mais das células tumorais em 12 casos (70,6%), e positivo em menos de 50% das células epiteliais em cinco casos (29,4%). Além disso, marcação positiva para o SDC-1 foi observada no estroma das lesões em sete casos (41,2%) (tabela 9 e figura 9). A avaliação da β -catenina mostrou positividade em 14 casos (82,4%), em que se observou marcação citoplasmática em 12 casos (70,6%), marcação em citoplasma e membrana em dois casos (11,8%) e com expressão indetectável em três casos (17,6%) (tabela 10 e figura 10).

Nos casos dos TOCC, todos os casos exibiram positividade imunoistoquímica para pelo menos um dos marcadores utilizados, e de forma similar ao que se observou no AME, a análise individual revelou algumas variações (tabela 11). O anticorpo Wnt1 foi positivo em todos os casos, sendo identificado em menos de 50% das células tumorais em quatro casos (66,7%) e em 50% ou mais das células tumorais em dois casos (33,3%). A marcação nas células fantasmas foi observada em cinco casos (83,3%) (tabela 12 e figura 11). O anticorpo Wnt5a também foi positivo em todos os casos, sendo identificada uma distribuição igualitária no percentual de células marcadas, com três casos (50%) exibindo positividade em menos de 50% das células tumorais e três casos (50%) exibindo positividade em 50% ou mais das células tumorais. A marcação nas células fantasmas foi observada em todos os casos (tabela 13 e figura 12). O anticorpo SDC-1 também foi positivo nos seis casos, sendo identificado em menos de 50% das células em todos (83,3%). Sua expressão ocorreu no epitélio ameloblastomatoso do revestimento cístico nas células

que lembram o retículo estrelado do órgão de esmalte, mas foi positivo nas células fantasmas somente em dois casos (33,3%) (tabela 14 e figura 13). A análise da β -catenina revelou marcação positiva em cinco casos (83,3%), todos eles com marcação em citoplasma e núcleo das células epiteliais. A marcação foi negativa nas células fantasmas (tabela 15 e figura 14).

Tabela 6 – Distribuição detalhada da marcação imunoistoquímica dos anticorpos Wnt1, Wnt5a, SDC-1 e β -catenina nos 17 casos de AME.

<i>Caso</i>	<i>Wnt1</i>	<i>Wnt5a</i>	<i>SDC-1</i>	<i>β-catenina</i>	<i>Padrão histopatológico</i>
1	2	1	2	4	Híbrido
2	1	0	2	4	Folicular
3	0	0	1	4	Plexiforme
4	0	0	2	3	Plexiforme
5	0	0	2	4	Acantomatoso
6	1	1	1	0	Híbrido
7	2	1	2	4	Plexiforme
8	1	0	2	4	Folicular
9	2	0	2	4	Plexiforme
10	0	1	1	0	Híbrido
11	1	1	1	4	Híbrido
12	0	1	2	4	Híbrido
13	1	1	2	3	Plexiforme
14	1	0	2	0	Plexiforme
15	1	1	2	4	Folicular
16	1	0	1	4	Plexiforme
17	1	1	2	4	Híbrido

Legendas utilizadas: 0 = indetectável; 1 = detectável em menos de 50% das células; 2 = detectável em 50% ou mais das células; 3 = positivo em membrana e citoplasma; 4 = positivo no citoplasma; 5 = positivo no citoplasma e no núcleo. Fontes: Ogburek *et al.* (2007) e Kotsinas *et al.* (2002) modificados.

Tabela 7 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de Wnt1 nos 17 casos de AME.

<i>Wnt1</i>			
Detectável 50% ou mais das células	3 casos	11,6 %	64,5%
Detectável menos de 50% das células	9 casos	52,9%	
Indetectável	5 casos	29,4%	29,4%

Tabela 8 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de Wnt5a nos 17 casos de AME.

<i>Wnt5a</i>			
Detectável 50% ou mais das células	0	0%	53%
Detectável menos de 50% das células	9 casos	53%	
Indetectável	8 casos	47%	47%

Tabela 9 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de SDC-1 nos 17 casos de AME.

<i>SDC-1</i>			
Detectável 50% ou mais das células	12 casos	70,6%	100%
Detectável menos de 50% das células	5 casos	29,4%	

Tabela 10 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcção de β -catenina nos 17 casos de AME.

<i>β – catenina</i>			
Presente no citoplasma	12 casos	70,6%	82,4%
Presente na membrana e no citoplasma	2 casos	11,8%	
Negativa	3 casos	17,6%	17,6%

Tabela 11 – Distribuição detalhada da marcação imunoistoquímica dos anticorpos Wnt1, Wnt5a, SDC-1 e β -catenina nos 6 casos de TOCC.

<i>Caso</i>	<i>Wnt1</i>	<i>Wnt5a</i>	<i>SDC-1</i>	<i>β-catenina</i>
1	1	2	1	5
2	1	2	1	5
3	2	2	1	5
4	2	1	1	5
5	1	1	1	5
6	1	1	1	0

Legendas utilizadas: 0 = indetectável; 1 = detectável, mas em menos de 50% das células; 2 = detectável em pelo menos 50% das células; 3 = positivo em membrana e citoplasma; 4 = positivo no citoplasma; 5 = positivo no citoplasma e no núcleo. Fontes: Ogburek *et al.* (2007) e Kotsinas *et al.* (2002) modificados.

Tabela 12 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcção de Wnt1 nos 6 casos de TOCC.

<i>Wnt1</i>			
Detectável 50% ou mais das células	2 casos	33,3 %	100%
Detectável menos de 50% das células	4 casos	66,7%	
Indetectável	0	0%	0%

Tabela 13 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de Wnt5a nos 6 casos de TOCC.

<i>Wnt5a</i>			
Detectável 50% ou mais das células	3 casos	50%	100%
Detectável menos de 50% das células	3 casos	50%	
Indetectável	0	0%	0%

Tabela 14 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de SDC-1 nos 6 casos de TOCC.

<i>SDC-1</i>			
Detectável 50% ou mais das células	0	0%	83,3%
Detectável menos de 50% das células	5 casos	83,3%	
Indetectável	1 caso	16,6%	16,6%

Tabela 15 – Resumo da distribuição do padrão de imunomarcação de β -catenina nos 6 casos de TOCC.

<i>β – catenina</i>			
Presente no citoplasma e no núcleo	5 casos	83,3%	100%
Negativa	1 caso	16,6%	

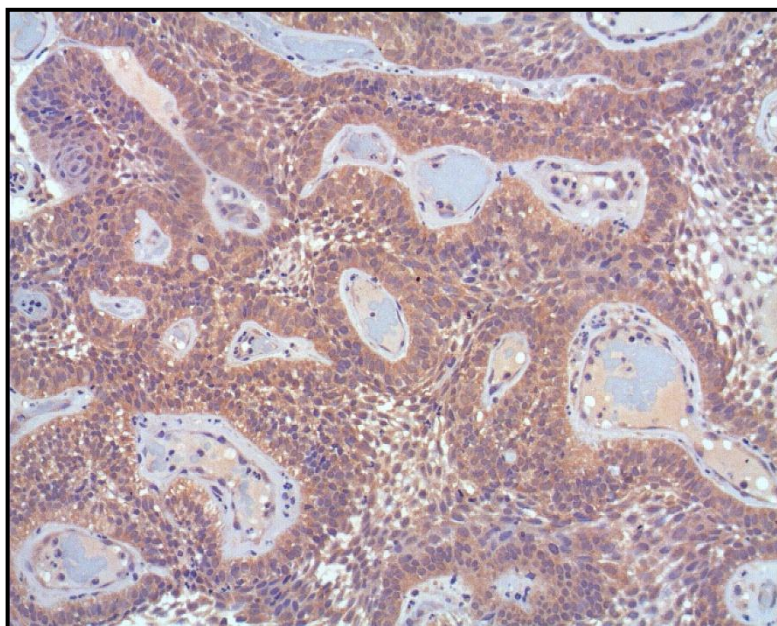


Figura 7 - Expressão imunoistoquímica de Wnt1 no citoplasma das células epiteliais de AME (imunoperoxidase, aumento original 200x).

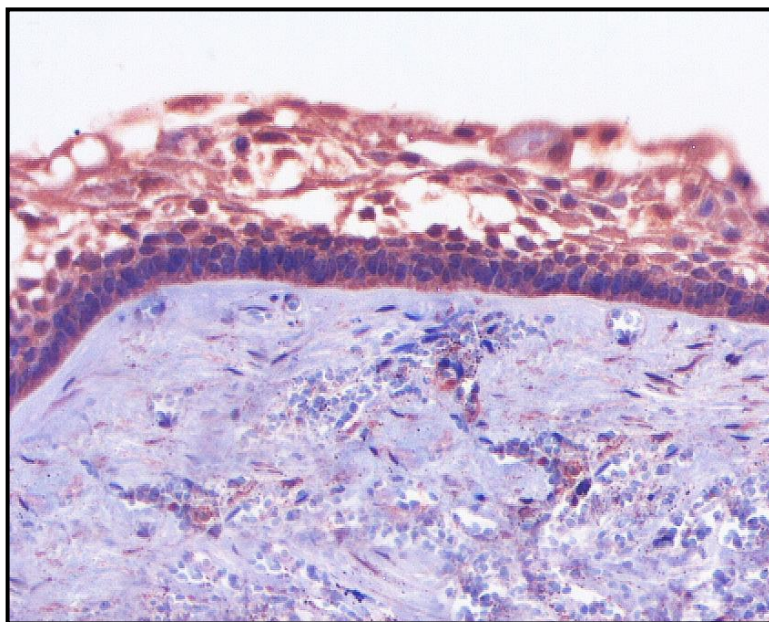


Figura 8 - Expressão imunoistoquímica de Wnt5a no citoplasma das células epiteliais de AME em uma área cística (imunoperoxidase, aumento original 200x).

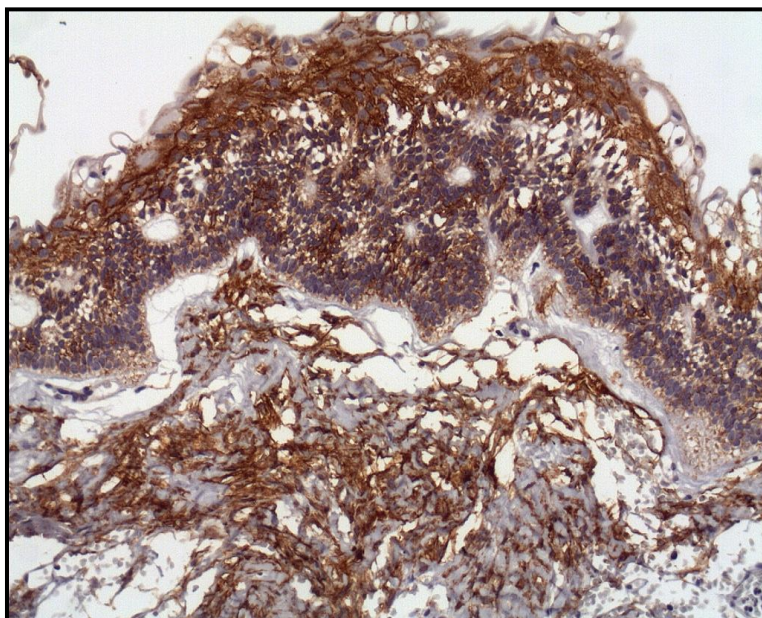


Figura 9 - Expressão imunoistoquímica de SDC-1 na membrana e citoplasma das células epiteliais e no estroma do AME.
(imunoperoxidase, aumento original 200x).

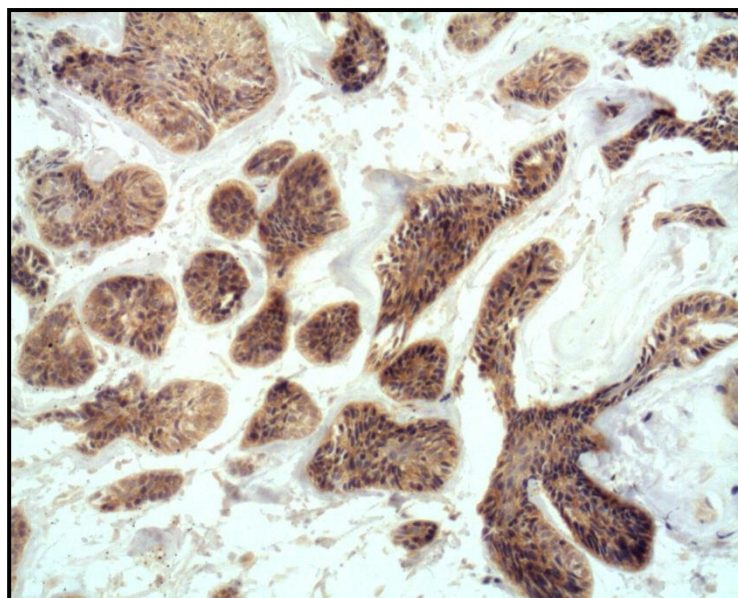


Figura 10 - Expressão imunoistoquímica de β -catenina no citoplasma das células epiteliais de AME (imunoperoxidase, aumento original 200x).

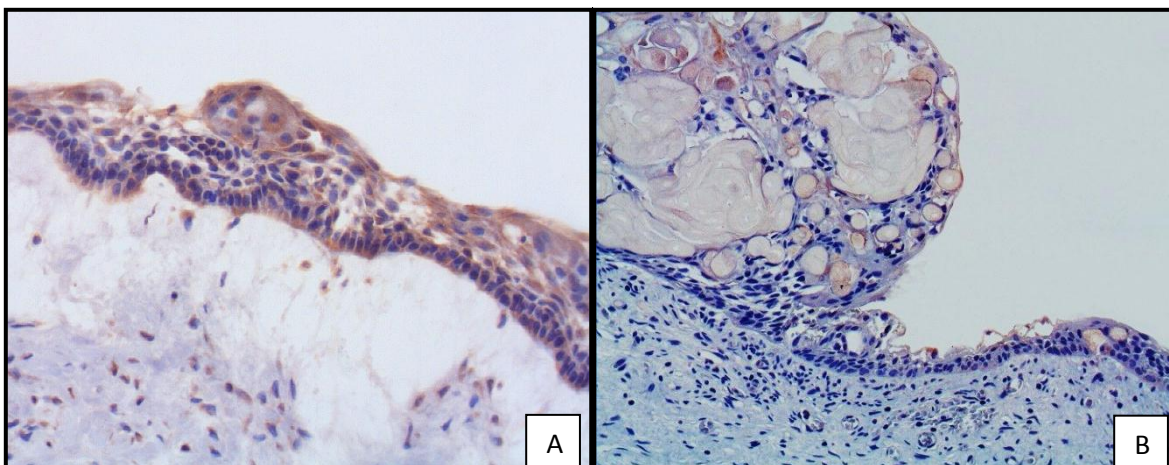


Figura 11 - Expressão imunoistoquímica de Wnt1 no citoplasma de células epiteliais (A) e nas células fantasmas (B) do TOCC (imunoperoxidase, aumento original 200x).

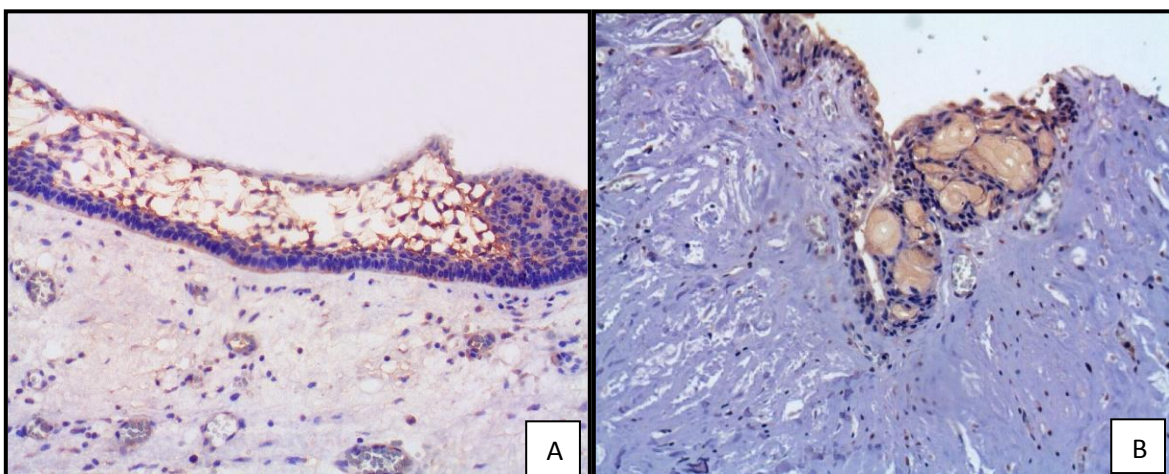


Figura 12 - Expressão imunoistoquímica de Wnt5a no citoplasma das células epiteliais (A) e nas células fantasmas (B) do TOCC (imunoperoxidase, aumento original 200x).

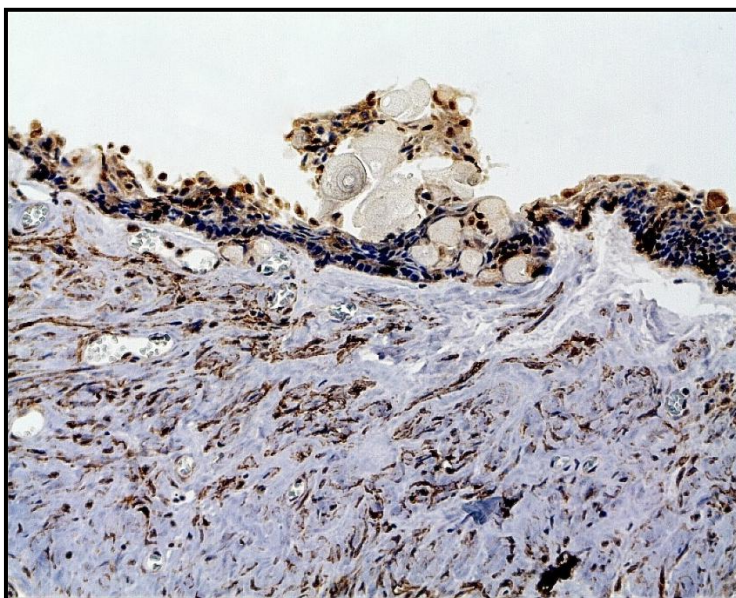


Figura 13 – Expressão imunoistoquímica de SDC-1 nas células epiteliais e estromais do TOCC. As células fantasmas foram negativas (imunoperoxidase, aumento original 200x).

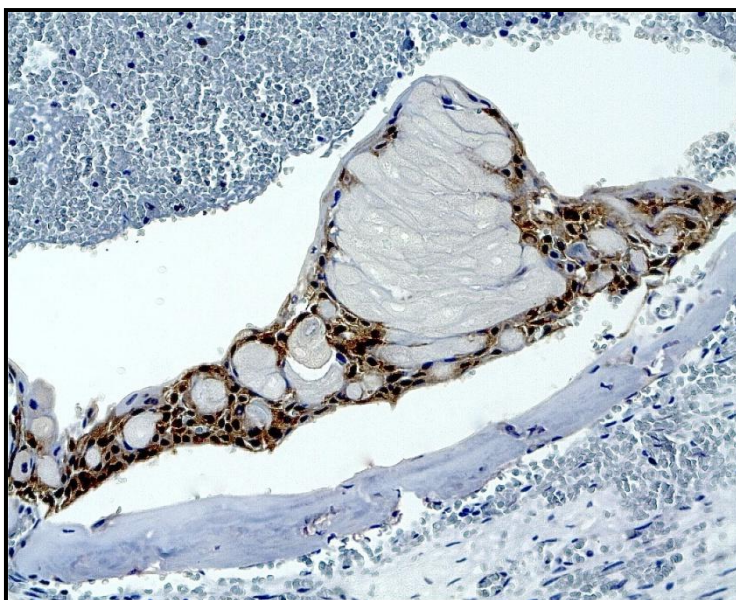


Figura14 - Expressão imunoistoquímica de β -catenina a no citoplasma e no núcleo das células epiteliais do TOCC. As células fantasmas foram negativas (imunoperoxidase, aumento original 200x).

6. Discussão

O AME, que representa aproximadamente 40% dos TO em todo o Mundo (Avelar *et al.*, 2011), tem sido base para o desenvolvimento de diferentes estudos utilizando a técnica de imunoistoquímica com o objetivo de esclarecer a sua histogênese e, principalmente, sua biologia tumoral (Gardner *et al.*, 2005; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Alves Pereira *et al.*, 2010) e, assim, este estudo foi realizado com o intuito de estender o conhecimento acerca do padrão de expressão imunoistoquímica de alguns marcadores associados direta ou indiretamente à via de sinalização Wnt/ β -catenina, que está relacionada à proliferação celular e, que pode contribuir para o desenvolvimento do AME, assim como de outros TO, como o TOCC, uma lesão com similaridades microscópicas com AME e comportamento clínico distinto.

De um modo geral, apesar do número limitado de casos, o grupo de AME analisados nesta pesquisa se enquadra no perfil clínico e demográfico descrito na literatura (Reichart *et al.*, 1995; Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005) com cerca de 80% das lesões localizadas em mandíbula, uma grande parte na região de molares como uma lesão assintomática (Avelar *et al.*, 2008; Fulco *et al.*, 2010). Contudo, apesar de não haver uma prevalência significativa por nenhum dos sexos (Kessler, 2004; Gardner *et al.*, 2005), a nossa casuística evidenciou uma prevalência pelo sexo masculino numa proporção de uma mulher para 1,6 homens. A maioria dos casos de AME deste estudo, foi diagnosticada na terceira década de vida, de forma similar a casuística descrita por Reichart *et al.* (1995), mas um pouco acima da segunda década de vida descrita nas casuísticas de Adebisi *et al.* (2006) e Siar *et al.* (2011a). Radiograficamente, o padrão radiolúcido multilocular descrito como mais frequente também foi observado neste estudo (Reichart *et al.*, 1995; Kessler, 2004; Ghandi *et al.*, 2006), assim como microscopicamente, o padrão plexiforme também foi o padrão individualmente mais observado (Reichart *et al.*, 1995; Neville *et al.*, 2009; Fulco *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011a).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina e seus componentes têm sido estudados em processos fisiológicos como a odontogênese e também em processos patológicos como as neoplasias benignas e malignas (Sarkar & Sharpe, 1999; Lo Muzio, 2001; Hassanein *et al.*,

2003; Ro *et al.*, 2006; Leocata *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Liu & Millar, 2010) e, dentre os seus componentes a Wnt1, a Wnt5a e a β -catenina já foram identificadas em AME (Leocata *et al.*, 2007; Kumamoto & Ooya, 2005; Chuah *et al.*, 2009; Sukarawan *et al.*, 2010; Siar *et al.*, 2011b).

A expressão positiva da glicoproteína Wnt1 em AME variou entre 68% e 100% das lesões (Leocata *et al.*, 2007; Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b), variação que não inclui os nossos achados de 64,5% dos casos de AME positivos para a Wnt1, mas que é similar aos resultados de Leocata *et al.* (2007), que observou esta positividade em 68% dos seus casos. Neste estudo não foi observada uma relação positiva entre a expressão de Wnt1 e o subtipo histopatológico do AME sólido, resultado que também foi encontrado no estudo desenvolvido por Siar *et al.* (2011b). Assim, esta expressão de Wnt1, que é o indutor da via canônica mais reconhecido, pode indicar a possível importância desta glicoproteína no processo tumorigênico dos AME (Siar *et al.*, 2011b), e uma das possíveis causas para essa variação de positividade nos resultados pode ser o envolvimento de outros membros indutores da família Wnt (Leocata *et al.*, 2007; Siar *et al.*, 2011b).

A glicoproteína Wnt5a é conhecida como inibidora da via canônica, mas seu potencial de ativar a sinalização de β -catenina também tem sido descrito (Mikels & Nusse, 2006; Pukrop & Binder, 2008; Siar *et al.*, 2011b). Em AME, a Wnt5a foi primeiramente descrita em AME granular por Sathi *et al.* (2007) e, posteriormente observada em cerca de 90% dos casos avaliados por Sukarawan *et al.* (2010). No entanto, estudo avaliando 35 casos de AME e 14 das glicoproteínas da via Wnt/ β -catenina, não encontrou expressão imunoistoquímica positiva para Wnt5a em nenhum dos casos (Siar *et al.*, 2011b). O nosso trabalho evidenciou positividade para Wnt5a de 53% nos casos de AME. Esta variação de resultados pode ocorrer por uma ativação e/ou inativação das vias canônica e não-canônicas de acordo com o grau de diferenciação da célula tumoral (Siar *et al.*, 2011b) e, no caso específico de Wnt5a, esta variação ocorre também pelo papel dicotômico dessa molécula na progressão tumoral, podendo inibir a via canônica ou ativá-la dependendo da disponibilidade dos receptores (Mikels & Nusse, 2006; Pukrop & Binder, 2008; Siar *et al.*, 2011b).

Dentre os componentes associados à via de sinalização Wnt/ β -catenina, pode-se incluir os proteoglicanos de heparan sulfato, moléculas que já foram descritas em processos tumorais (Davies *et al.*, 2004). Em nosso estudo, utilizamos SCD-1, um dos membros da família que melhor tem sido estudado e com expressão frequentemente alterada em tumores malignos (Blackhall *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2004; Mennerich *et al.*, 2004; Baba *et al.*, 2006; Ro *et al.*, 2006) e nos AME (Leocata *et al.*, 2007; Bologna-Molina *et al.*, 2008). Localiza-se na superfície celular e apresenta múltiplas funções, como adesão celular, interação entre a célula e a MEC, e modulação no processo de proliferação celular (Mennerich *et al.*, 2004; Leocata *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

Alguns estudos sobre o papel de SCD-1 nos AME observaram uma diminuição da expressão de SCD-1 nos AME sólidos comparados aos germes dentários e aos AME unicísticos (Leocata *et al.*, 2007; Bologna-Molina *et al.*, 2008), resultados que são reforçados por estudo que identifica a perda de expressão em carcinomas ameloblásticos comparados aos AME periféricos e desmoplásicos (Bologna-Molina *et al.*, 2009). É importante destacar ainda que uma avaliação entre os diferentes subtipos histopatológicos de AME sólido não observou diferença significativa na expressão de SCD-1 entre eles (Bologna-Molina *et al.*, 2008), resultado similar ao observado em nosso estudo e detalhado na tabela 8. Apesar de exibirem pelo menos uma área detectável para SCD-1 em todos os casos, os AME avaliados na presente dissertação, apresentaram uma provável perda de expressão ao exibir uma positividade de no máximo 50% das células tumorais em cerca de 30% dos casos. Tal perda pode estar associada a um aumento da proliferação celular, como já identificado em carcinoma de mama em estudo realizado por Baba *et al.* (2006), que mostrou significante relação entre a diminuição de expressão de SCD-1 e o aumento da expressão de Ki-67, reconhecido marcador de proliferação celular. Contudo, esta correlação positiva ainda não foi confirmada em estudos incluindo AME, mas vale ressaltar que, dois estudos realizados pelo mesmo grupo de autores observaram que os AME desmoplásicos exibiam os menores níveis de expressão de Ki-67 e os maiores níveis de SCD-1 nas células tumorais (Bologna-Molina *et al.*, 2008; Bologna-Molina *et al.*, 2009).

Além disso, nossos resultados revelaram a identificação de SDC-1 no estroma da lesão em cerca de 40% dos casos de AME, o que pode ser justificado a partir dos achados em um estudo avaliando carcinoma de ovário, que identificou a expressão estromal de SDC-1 nas áreas mais invasivas do tumor (Davies *et al.*, 2004), ou de outro estudo que observou um aumento da expressão de SDC-1 no estroma próximo as células tumorais de carcinomas de mama, pulmão, cólon e bexiga (Mennerich *et al.*, 2004). Tal alteração na expressão estromal de SDC-1 pode tornar as células tumorais mais propensas ao fenótipo de invasividade e migração, bem como aumentar o papel promotor de tumor deste proteoglicano (Davies *et al.*, 2004; Mennerich *et al.*, 2004), aspecto que também pode ocorrer em AME, que além de exibirem uma redução da expressão de SDC-1 comparados aos germes dentários, foi identificado uma expressão de SDC-1 em localização estromal em alguns destes casos de AME (Leocata *et al.*, 2007). E, ao avaliar a relação da expressão de SDC-1 e de Wnt1 em 29 casos de AME, o mesmo grupo de autores mencionados na frase anterior sugeriu que o SDC-1 possa representar um fator importante na carcinogênese induzida pela via Wnt em epitélio odontogênico (Leocata *et al.*, 2007), uma relação que já havia sido evidenciada em tumores de mama em rato (Alexander *et al.*, 2000). Os resultados do nosso trabalho também mostraram uma positividade concomitante de SDC-1 e Wnt1 em 12 casos (70,6%), o que pode evidenciar a relação entre essas moléculas.

A β -catenina é uma proteína com participação em dois processos independentes, o de adesão celular e de transcrição nuclear por meio do seu acúmulo no citoplasma e posterior entrada no núcleo por estimulação da via Wnt/ β -catenina (Castro *et al.*, 2000; Van Aken *et al.*, 2001). Essa é um componente essencial da via Wnt, e assim, uma alteração na própria β -catenina, bem como de outros componentes dessa via, pode gerar a instabilidade citoplasmática desta proteína, consequentemente, contribuindo para processos relacionados à proliferação celular, como já demonstrado em alguns tipos de cânceres humanos (Willert & Nusse, 1998; Polakis, 2000). É importante salientar que a mutação direta da β -catenina nem sempre é encontrada simultaneamente ao seu acúmulo na célula, como foi evidenciado em alguns TO, incluindo o AME (Miyake *et al.*, 2006; Tanahashi *et al.*, 2008). Portanto, nestes casos, é provável que outros processos estejam

envolvidos, e, dentre eles, devemos considerar a ativação aberrante da via Wnt, que vai permitir o acúmulo de β -catenina, que poderá contribuir na tumorigênese do AME.

A expressão de β -catenina em mucosa normal, como a oral e a esofágica costuma ser em membrana celular (Castro *et al.*, 2000; Lo Muzio, 2001), mas em casos de neoplasias malignas, incluindo o carcinoma espinocelular esofágico, é possível observar a perda desta expressão (Takayama *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2000). No grupo de casos de AME de nosso estudo, a perda de expressão β -catenina na membrana ocorreu em 15 dos 17 casos analisados (88,2%) e, considerando a função da β -catenina na adesão celular, o seu rompimento com a E-caderina pode gerar falha de adesão e desorganização tecidual (Castro *et al.*, 2000). Outra alteração importante na expressão de β -catenina observada em neoplasias é a marcação nuclear, que pode ser identificada em cerca de 20% dos casos de carcinoma de células basais (Saldanha *et al.*, 2004), o que não foi observado em nenhum dos nossos casos de AME, embora a marcação citoplasmática, que evolutivamente poderá levar a marcação nuclear, tenha sido observada em cerca de 80% dos nossos achados. De forma similar, estudos incluindo AME identificaram uma marcação nuclear variando de focal a moderada quase que na totalidade dos casos avaliados (Miyake *et al.*, 2006; Siriwardena *et al.*, 2009), mas alguns outros estudos identificaram percentual de marcação nuclear em AME menor em torno de 20% e de 60% (Kumamoto & Ooya, 2005; Tanahashi *et al.*, 2008; Alves Pereira *et al.*, 2010). Em nosso estudo não foi observada a expressão nuclear da β -catenina em AME, o que pode ser resultado da menor casuística ou do papel de Wnt5a, marcador constantemente positivo em nosso estudo e capaz de inibir a via Wnt/ β -catenina, o que conseqüentemente, promoveria um menor acúmulo nuclear de β -catenina. É importante destacar que a superexpressão da β -catenina não tem sido relacionada à mutação do gene dessa proteína em AME (Sekine *et al.*, 2003; Miyake *et al.*, 2006; Tanahashi *et al.*, 2008; Siriwardena *et al.*, 2009). Ainda assim, a imunopositividade citoplasmática de β -catenina não esperada e observada na maioria dos nossos casos de AME, pode reforçar o provável envolvimento da via de sinalização Wnt/ β -catenina no processo de tumorigênese desta lesão.

O TOCC é uma lesão menos frequente que o AME, mas que geralmente figura entre os cinco TO mais frequentes e que pode representar até e 7,2% dos casos nos estudos epidemiológicos envolvendo TO oriundos de diferentes regiões, como ilustrado nas tabelas 1 e 2 da revisão da literatura. A primeira descrição deste tumor foi feita por Gorlin *et al.* (1962), que o denominou cisto odontogênico calcificante, mas, este tumor foi recentemente renomeado para melhor classificar as grandes variações clínicas e patológicas que ele pode exibir (Tomich, 2004; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008). Com relação ao perfil clínico e demográfico, os casos analisados reproduziram, em sua maior parte, o perfil descrito na literatura ao se apresentarem como uma lesão radiolúcida, que estava associada a áreas radiopacas em 33,3% dos casos, em pacientes entre a 2ª e 3ª décadas de vida foi a mais afetada (Li & Yu, 2003; Fregnani *et al.*, 2003; Ledesma-Montes *et al.*, 2008). Houve uma predileção pelo sexo feminino como descrito por Tomich (2004), mas distinto da maioria dos trabalhos que descrevem o sexo masculino ou a ausência de predileção por sexo (Fregnani *et al.*, 2003; Praetorius & Ledesma-Montes, 2005a; Ledesma-Montes *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2011). Os resultados conflitantes observados neste estudo podem ser justificados pela amostra limitada de TOCC utilizados.

A avaliação de Wnt em epitélio odontogênico com diferentes técnicas tem evidenciado a importância da via Wnt/ β -catenina no desenvolvimento dentário (Liu *et al.*, 2008) e, por isso, alguns pesquisadores têm investigado a participação dos membros da família Wnt em lesões de origem odontogênica, como o AME (Leocata *et al.*, 2007; Sukarawan *et al.*, 2010). Contudo, estudos avaliando a associação de TOCC com a via Wnt/ β -catenina são escassos na literatura e geralmente incluem somente a avaliação de β -catenina (Hassanein *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2011).

A análise de Wnt1 nos TOCC de nosso estudo revelou positividade no epitélio ameloblastomatoso em todos os casos, mas em graus variados em cada um destes casos e nas células fantasmas na maioria dos casos. A presença de Wnt1 nas células do epitélio pode contribuir para a proliferação e invasividade (Polakis, 2000; Lo Muzio, 2001), mas neste caso talvez possa ter algum papel no desenvolvimento das células fantasmas, de

forma similar ao observado e sugerido por Tanaka *et al.* (2007), que avaliaram as células fantasmas presentes e associadas a ODT.

Já o padrão de imunomarcção de Wnt5a em nossos casos de TOCC revelou positividade para todos os casos de forma variável tanto nas células do epitélio de revestimento quanto nas células fantasmas e, apesar do número limitado de casos podemos sugerir um papel inibidor nas lesões de TOCC, considerando que os nossos resultados evidenciaram uma maior expressão desta glicoproteína em TOCC do que em AME, uma lesão de comportamento clínico sabidamente mais agressivo, corroborando, assim, com o potencial de Wnt5a em atuar como supressor, que já foi descrito na literatura (Pukrop & Binder, 2008; Siar *et al.*, 2011b).

Como demonstrado em nosso estudo, a expressão de Wnt1 e Wnt5a nos TOCC foi positiva em todos os casos num padrão diferente do que foi observado nos AME, que apresentaram cerca de 30% dos casos negativos para Wnt1 e cerca de 50% dos casos negativos para Wnt5a. Estes resultados ampliam um pouco o conhecimento geral acerca do padrão imunoistoquímico das glicoproteínas Wnt nestes TO e evidenciam a complexidade do estudo de vias de sinalização, considerando a similaridade, mas também a diversidade dos resultados encontrados em relação à literatura (Leocata *et al.*, 2007; Chuah *et al.*, 2009; Siar *et al.*, 2011b). Com relação aos resultados referentes ao TOCC, este estudo é pioneiro na avaliação destas glicoproteínas e os resultados podem sugerir uma participação da via de sinalização Wnt/ β -catenina no desenvolvimento destes tumores de forma mais evidente do que nos AME, especialmente no que se refere a histodiferenciação das células fantasmas.

Com relação ao SDC-1, os TOCC apresentaram positividade nas células do epitélio ameloblastomatoso de todos os casos negatividade nas células fantasmas na maioria dos casos. A presença de SDC-1 no estroma foi evidente somente em um caso, o que pode estar relacionado à menor invasividade desta lesão em contraposição às lesões de AME, que apesar de benignas são mais agressivas, e principalmente, em contraposição as neoplasias malignas, que podem apresentar marcação estromal mais significativa (Davies *et al.*, 2004; Mennerich *et al.*, 2004; Ro *et al.*, 2006; Leocata *et al.*, 2007).

O único componente da via Wnt/ β -catenina já avaliado anteriormente em TOCC foi a β -catenina, que foi descrita com positividade citoplasmática e nuclear frequentes (Hassanein *et al.*, 2003; Sekine *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2008), de forma similar aos nossos resultados que revelaram que cinco dos seis casos de TOCC exibiam marcação imunoistoquímica no citoplasma e núcleo das células epiteliais (83,3%). Mutações associadas ao gene da proteína β -catenina também já foram identificadas em TOCC, sugerindo que talvez esta alteração na via de sinalização Wnt/ β -catenina possa influenciar o desenvolvimento e a diferenciação do epitélio odontogênico nos TOCC (Sekine *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2008).

Este trabalho evidenciou que o estudo de vias de sinalização, incluindo a via Wnt/ β -catenina em TO é importante para ampliar o conhecimento das suas biologias tumorais, e talvez, possibilitar no futuro o emprego de novas estratégias de tratamento que incluam a possibilidade de uso dos componentes destas vias como alvos terapêuticos (Siar *et al.*, 2011b; Teng *et al.*, 2012). Além disso, é importante destacar que a investigação de outros componentes desta via de sinalização associada à utilização de técnicas que demonstrem o funcionamento destas moléculas considerando as limitações da imunoistoquímica pode contribuir para a elucidação da etiopatogênese do AME e do TOCC, assim como de outros TO.

7. Conclusões

Os nossos resultados evidenciam uma possível participação da via Wnt/ β -catenina no processo biológico dos AME e TOCC por mecanismos distintos.

A expressão de Wnt1 e Wnt5a pode indicar que estas glicoproteínas participam mais no desenvolvimento dos TOCC do que nos AME.

A expressão de Wnt1 e de Wnt5a nas células fantasmas do TOCC reforça o provável papel destas glicoproteínas na histogênese e diferenciação destas células.

A positividade citoplasmática da β -catenina nos AME e nos TOCC, que apresentaram também positividade nuclear, reforçam a provável participação desta proteína no desenvolvimento dessas lesões.

A superexpressão de SDC-1 e sua localização estromal nos AME parecem contribuir para o desenvolvimento destas lesões, mas não dos TOCC.

Referências*

Adebayo ET, Ajike SO, Adekeye EO. A review of 318 odontogenic tumors in Kaduna, Nigeria. J Oral Maxillofac Surg. 2005 Jun; 63(6): 811-9.

Adebiyi KE, Ugboko VI, Omoniyi-Esan GO, Ndukwe KC, Oginni FO. Clinicopathological analysis of histological variants of ameloblastoma in a suburban Nigerian population. Head Face Med. 2006; 2: 42.

Ahn SG, Kim SA, Kim SG, Lee SH, Kim J, Yoon JH. Beta-catenin gene alterations in a variety of so-called calcifying odontogenic cysts. APMIS. 2008 Mar; 116(3): 206-11.

Aithal D, Reddy BS, Mahajan S, Boaz K, Kamboj M. Ameloblastomatous calcifying odontogenic cyst: a rare histologic variant. J Oral Pathol Med. 2003 Jul; 32(6): 376-8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Mechanisms of cell communication. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular Biology of The Cell. 5th ed. Garland Science Taylor & Francis Group: New York; 2008. p. 879-964.

Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, *et al.* Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. Nat Genet. 2000 Jul; 25(3): 329-32.

Alves Pereira KM, do Amaral BA, dos Santos BR, Galvao HC, Freitas R de A, de Souza LB. Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in ameloblastomas and tooth germs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar; 109(3): 425-31.

*De acordo com a Norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.
--

Avelar RL, Antunes AA, Santos T de S, Andrade ES, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008 Sep-Oct; 74(5): 668-73.

Avelar RL, Primo BT, Pinheiro-Nogueira CB, Studart-Soares EC, de Oliveira RB, Romulo de Medeiros J, *et al*. Worldwide incidence of odontogenic tumors. *J Craniofac Surg*. 2011 Nov; 22(6): 2118-23.

Azevedo, RS. Estudo demográfico e clínico-patológico retrospectivo de tumores odontogênicos de uma casuística da cidade do Rio de Janeiro [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.

Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W, *et al*. Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Jul; 98(1): 91-8.

Bachmann AM, Linfesty RL. Ameloblastoma, solid/multicystic type. *Head Neck Pathol*. 2009 Dec; 3(4): 307-9.

Bansal M, Chaturvedi TP, Bansal R, Kumar M. Acanthomatous ameloblastoma of anterior maxilla. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010 Jul-Sep; 28(3): 209-11.

Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon; 2005.

Basile JR, Klene C, Lin YL. Calcifying odontogenic cyst with odontogenic keratocyst: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Apr; 109(4): e40-5.

Black CC, Addante RR, Mohila CA. Intraosseous ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Nov; 110(5): 585-92.

Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC. Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br J Cancer*. 2001 Oct 19; 85(8): 1094-8.

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 Aug; 44(8): 805-11.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, de Almeida OP, Carrasco-Daza D, Farfan-Morales JE, *et al*. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathol Int*. 2009 Apr; 59(4): 229-33.

Brigidi GS, Bamji SX. Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Apr; 21(2): 208-14.

Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Sep; 64(9): 1343-52.

Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar; 64(3): 484-94.

Castro J, Gamallo C, Palacios J, Moreno-Bueno G, Rodriguez N, Feliu J, *et al*. beta-catenin expression pattern in primary oesophageal squamous cell carcinoma. Relationship with clinicopathologic features and clinical outcome. *Virchows Arch*. 2000 Dec; 437(6): 599-604.

Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Jul; 40(7): 577-94.

Chen J, Lan Y, Baek JA, Gao Y, Jiang R. Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol*. 2009 Oct 1; 334(1): 174-85.

Chidzonga MM, Lopez Perez VM, Portilla Alvarez AL. Ameloblastoma: the Zimbabwean experience over 10 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jul; 82(1): 38-41.

Chuah KS, Siar CH, Nakano K, Nagatsuka H, Khoo SP, Ng KH, Kawakami T. Wingless-type Protein-1 (Wnt-1) Expression in Primary Conventional and Unicystic Ameloblastomas and Their Recurrent Tumors . *J. Hard Tissue Biology*. 2009; 18: 63-70.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3; 127(3): 469-80.

Costa DO, Mauricio AS, Faria PA, Silva LE, Mosqueda-Taylor A, Lourenco SQ. Odontogenic tumors: A retrospective study of four Brazilian diagnostic pathology centers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Dec 6.

Crivelini MM, Felipini RC, Coclete GA, Soubhia AM. Immunoexpression of keratins in the calcifying cystic odontogenic tumor epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2009 Apr; 38(4): 393-6.

Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, *et al*. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 1; 10(15): 5178-86.

El-Gehani R, Orafi M, Elarbi M, Subhashraj K. Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: a study of 405 cases. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009 Oct; 37(7): 370-5.

Fernandes AM, Duarte EC, Pimenta FJ, Souza LN, Santos VR, Mesquita RA, *et al*. Odontogenic tumors: a study of 340 cases in a Brazilian population. *J Oral Pathol Med*. 2005 Nov; 34(10): 583-7.

Fregnani ER, Fillipi RZ, Oliveira CR, Vargas PA, Almeida OP. Odontomas and ameloblastomas: variable prevalences around the world? *Oral Oncol*. 2002 Dec; 38(8): 807-8.

Fregnani ER, Pires FR, Quezada RD, Shih Ie M, Vargas PA, de Almeida OP. Calcifying odontogenic cyst: clinicopathological features and immunohistochemical profile of 10 cases. *J Oral Pathol Med*. 2003 Mar; 32(3): 163-70.

Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Feb; 39(2): 145-9.

Fulco GM, Nonaka CF, Souza LB, Miguel MC, Pinto LP. Solid ameloblastomas - Retrospective clinical and histopathologic study of 54 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010 Mar-Apr; 76(2): 172-7.

Gallana-Alvarez S, Mayorga-Jimenez F, Torres-Gomez FJ, Avella-Vecino FJ, Salazar-Fernandez C. Calcifying odontogenic cyst associated with complex odontoma: case report and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 May-Jul; 10(3): 243-7.

Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H. Ameloblastomas. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon; 2005. p. 296-300.

Ghandhi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF. Ameloblastoma: a surgeon's dilemma. J Oral Maxillofac Surg. 2006 Jul; 64(7): 1010-4.

Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. J Oral Pathol Med. 2010 Sep; 39(8): 585-91.

Gorlin RJ, Pindborg JJ, Odont, Clausen FP, Vickers RA. The calcifying odontogenic cyst -- a possible analogue of the cutaneous calcifying epithelioma of Malherbe. An analysis of fifteen cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1962 Oct; 15: 1235-43.

Gupta B, Ponniah I. The pattern of odontogenic tumors in a government teaching hospital in the southern Indian state of Tamil Nadu. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Jul; 110(1): e32-9.

Habibi A, Saghravanian N, Salehinejad J, Jafarzadeh H. Thirty years clinicopathological study of 60 calcifying cystic odontogenic tumors in Iranian population. J Contemp Dent Pract. 2011; 12(3): 171-3.

Hassanein AM, Glanz SM, Kessler HP, Eskin TA, Liu C. beta-Catenin is expressed aberrantly in tumors expressing shadow cells. Pilomatricoma, craniopharyngioma, and calcifying odontogenic cyst. Am J Clin Pathol. 2003 Nov; 120(5): 732-6.

Ide F, Mishima K, Yamada H, Horie N, Saito I, Shimoyama T, *et al.* Unsuspected small ameloblastoma in the alveolar bone: a collaborative study of 14 cases with discussion of their cellular sources. J Oral Pathol Med. 2008 Apr; 37(4): 221-7.

Jing W, Xuan M, Lin Y, Wu L, Liu L, Zheng X, *et al.* Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Jan; 36(1): 20-5.

Johnson A 3rd, Fletcher M, Gold L, Chen SY. Calcifying odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 57 cases with immunohistochemical evaluation for cytokeratin. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Jul; 55(7): 679-83.

Jones AV, Franklin CD. An analysis of oral and maxillofacial pathology found in adults over a 30-year period. *J Oral Pathol Med.* 2006 Aug; 35(7): 392-401.

Kamboj M, Juneja M. Ameloblastomatous Gorlin's cyst. *J Oral Sci.* 2007 Dec; 49(4): 319-23.

Kessler HP. Intraosseous ameloblastoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2004 Aug; 16(3): 309-22.

Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 16; 268(2): 243-8.

Kotsinas A, Evangelou K, Zacharatos P, Kittas C, Gorgoulis VG. Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct beta-catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli and G(1)-to S-phase cell-cycle regulators. *Am J Pathol.* 2002 Nov; 161(5): 1619-34.

Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M: *Histological Typing of Odontogenic Tumours.* 2 ed. New York, NY;1992 Springer-Verlag.

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

Ladeinde AL, Ajayi OF, Ogunlewe MO, Adeyemo WL, Arotiba GT, Bamgbose BO, *et al.* Odontogenic tumors: a review of 319 cases in a Nigerian teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Feb; 99(2): 191-5.

Lawall MA. Estudo retrospectivo de Tumores Odontogênicos em dois centros de estudo no Brasil e três no México [tese]. Bauru: USP/FOB; 2009

Ledesma-Montes C, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, de Leon ER, Palma-Guzman JM, Paez-Valencia C, *et al.* Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. *Oral Dis.* 2007 May;13(3): 303-7.

Ledesma-Montes C, Gorlin RJ, Shear M, Prae Torius F, Mosqueda-Taylor A, Altini M, *et al.* International collaborative study on ghost cell odontogenic tumours: calcifying cystic odontogenic tumour, dentinogenic ghost cell tumour and ghost cell odontogenic carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2008 May; 37(5): 302-8.

Leocata P, Villari D, Fazzari C, Lentini M, Fortunato C, Nicotina PA. Syndecan-1 and Wntless-type protein-1 in human ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2007 Aug; 36(7): 394-9.

Li TJ, Yu SF. Clinicopathologic spectrum of the so-called calcifying odontogenic cysts: a study of 21 intraosseous cases with reconsideration of the terminology and classification. *Am J Surg Pathol.* 2003 Mar; 27(3): 372-84.

Lin M, Li L, Liu C, Liu H, He F, Yan F, *et al.* Wnt5a regulates growth, patterning, and odontoblast differentiation of developing mouse tooth. *Dev Dyn.* 2011 Feb; 240(2): 432-40.

Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2008 Jan 1; 313(1): 210-24.

Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res*. 2010 Apr; 89(4): 318-30.

Lo Muzio L. A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(2): 152-65.

Lucchese A, Scivetti M, Pilolli GP, Favia G. Analysis of ghost cells in calcifying cystic odontogenic tumors by confocal laser scanning microscopy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Sep; 104(3): 391-4.

Luo HY, Li TJ. Odontogenic tumors: A study of 1309 cases in a Chinese population. *Oral Oncol*. 2009 Aug; 45(8): 706-11.

Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Apr; 129(4): 199-221.

Matsuzawa M, Sheu TJ, Lee YJ, Chen M, Li TF, Huang CT, *et al*. Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/beta-catenin pathway. *J Periodontal Res*. 2009 Jun; 44(3): 289-96.

Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol*. 2007 Dec; 30(6): 645-8.

Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, *et al*. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*. 2004 Jun; 40(9): 1373-82.

Mikels AJ, Nusse R Purified Wnt5a protein activates or inhibits b-catenin–TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* . 2006; 4(4): e115.

Miyake T, Tanaka Y, Kato K, Tanaka M, Sato Y, Ijiri R, *et al.* Gene mutation analysis and immunohistochemical study of beta-catenin in odontogenic tumors. *Pathol Int.* 2006 Dec; 56(12): 732-7.

Moleri AB, Moreira LC, Carvalho JJ. Comparative morphology of 7 new cases of calcifying odontogenic cysts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Jun; 60(6): 689-96.

Morin PJ. β -catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999 Dec; 21(12): 1021-30.

Mosqueda-Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Sep; 13(9): E555-8.

Nastri AL, Wiesenfeld D, Radden BG, Eveson J, Scully C. Maxillary ameloblastoma: a retrospective study of 13 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Feb; 33(1): 28-32.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 3^a ed. W.B. Saunders: Philadelphia, 2009.

Obara N, Suzuki Y, Takeda M. Gene expression of beta-catenin is up-regulated in inner dental epithelium and enamel knots during molar tooth morphogenesis in the mouse. *Cell Tissue Res.* 2006 Jul; 325(1): 197-201.

Ochsenius G, Ortega A, Godoy L, Penafiel C, Escobar E. Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. *J Oral Pathol Med.* 2002 Aug; 31(7): 415-20.

O'Connell MP, Fiori JL, Kershner EK, Frank BP, Indig FE, Taub DD, *et al.* Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16; 284(42): 28704-12.

Ogbureke KU, Nikitakis NG, Warburton G, Ord RA, Sauk JJ, Waller JL, *et al.* Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Oct; 43(9): 920-32.

Okada H, Yamamoto H, Tilakaratne WM. Odontogenic tumors in Sri Lanka: analysis of 226 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 May; 65(5): 875-82.

Olgac V, Koseoglu BG, Aksakallı N. Odontogenic tumours in Istanbul: 527 cases. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2006; 44: 386–388.

Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Apr; 111(4): 474-81.

Philipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med.* 2002 May; 31(5): 253-8.

Philipsen HP, Reichart RA, Slootweg PJ, Slater LJ. Neoplasms and tumor-like lesions arising from the odontogenic apparatus and maxillofacial skeleton: Introduction. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours.* IARC Press: Lyon; 2005. p. 285-6.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000 Aug 1; 14(15): 1837-51.

Praetorius F, Ledesma-Montes C. Calcifying cystic odontogenic tumour. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours.* IARC Press: Lyon; 2005a. p.313.

Praetorius F, Ledesma-Montes C. Dentinogenic ghost cell tumour. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon; 2005b. p.314.

Pukrop T, Binder C. The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. J Mol Med (Berl). 2008 Mar; 86(3): 259-66.

Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1995 Mar; 31B(2): 86-99.

Resende RG, Brito JA, Souza LN, Gomez RS, Mesquita RA. Peripheral calcifying odontogenic cyst: a case report and review of the literature. Head Neck Pathol. 2011 Mar; 5(1): 76-80.

Ro Y, Muramatsu T, Shima K, Yajima Y, Shibahara T, Noma H, Shimono M. Correlation between reduction of syndecan-1 expression and clinico-pathological parameters in squamous cell carcinoma of tongue. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2006; 35: 252–7.

Saghravanian N, Jafarzadeh H, Bashardoost N, Pahlavan N, Shirinbak I. Odontogenic tumors in an Iranian population: a 30-year evaluation. J Oral Sci. 2010 Sep; 52(3): 391-6.

Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear b-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. British Journal of Dermatology. 2004; 151: 157–64.

Santos JN, Pinto LP, de Figueredo CR, de Souza LB. Odontogenic tumors: analysis of 127 cases. Pesqui Odontol Bras. 2001 Oct-Dec; 15(4): 308-13.

Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. Mech Dev 1999; 85(1–2): 197–200.

Sathi GS, Han PP, Tamamura R, Nagatsuka H, Hu H, Katase N, *et al.* Immunolocalization of cell signaling molecules in the granular cell ameloblastoma. J Oral Pathol Med. 2007 Nov; 36(10): 609-14.

Sciubba JJ, Eversole LR, Slootweg PJ. Odontogenic/ ameloblastic carcinoma. Ameloblastomas. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon; 2005. p.287-89.

Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, *et al.* Beta-catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cysts, but rare in ameloblastomas. Am J Pathol. 2003 Nov; 163(5): 1707-12.

Shibata S, Dias RA, Hashimoto-Uoshima M, Abe T, Yanagishita M. Immunohistochemical localization of syndecan-1 in the dental follicle of postnatal mouse teeth. J Periodontol. 2007 Jul; 78(7): 1322-8.

Siar CH, Lau SH, Ng KH. Ameloblastoma of the Jaws: A Retrospective Analysis of 340 Cases in a Malaysian Population. J Oral Maxillofac Surg. 2011a Jul 2.

Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, *et al.* Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. J Oral Pathol Med. 2011b Nov 14.

Simon EN, Stoelinga PJ, Vuhahula E, Ngassapa D. Odontogenic tumours and tumour-like lesions in Tanzania. East Afr Med J. 2002 Jan; 79(1): 3-7.

Simon EN, Merks MA, Vuhahula E, Ngassapa D, Stoelinga PJ. A 4-year prospective study on epidemiology and clinicopathological presentation of odontogenic tumors in Tanzania. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 May; 99(5): 598-602.

Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Tilakaratne WM, Takata T. Aberrant beta-catenin expression and adenomatous polyposis coli gene mutation in ameloblastoma and odontogenic carcinoma. *Oral Oncol.* 2009 Feb; 45(2): 103-8.

Sriram G, Shetty RP. Odontogenic tumors: a study of 250 cases in an Indian teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jun; 105(6): e14-21.

Sukarawan W, Simmons D, Suggs C, Long K, Wright JT. WNT5A expression in ameloblastoma and its roles in regulating enamel epithelium tumorigenic behaviors. *Am J Pathol.* 2010 Jan; 176(1): 461-71.

Takata T, Lu Y. Ghost cell odontogenic carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics – Head and Neck Tumours.* IARC Press: Lyon; 2005. p.293.

Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S, *et al.* Beta-catenin expression in human cancers. *Am J Pathol.* 1996 Jan; 148(1): 39-46.

Tamgadge AP, Sirur DG , Bhalerao SS , Pariera T 4, Tamgadge SA. Hemangiomatous Ameloblastoma: A Case Report of a Rare Variant of Ameloblastoma. *Int. Journal of Contemporary Dentistry.* 2010 Nov; 1(2): 16-9.

Tanahashi J, Daa T, Yada N, Kashima K, Kondoh Y, Yokoyama S. Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of beta-catenin. *J Oral Pathol Med.* 2008 Oct; 37(9): 565-70.

Tanaka A, Okamoto M, Yoshizawa D, Ito S, Alva PG, Ide F, *et al.* Presence of ghost cells and the Wnt signaling pathway in odontomas. *J Oral Pathol Med.* 2007 Aug; 36(7): 400-4.

Tawfik MA, Zyada MM. Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases. *Oral Surg oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Feb; 109(2): e-67-73.

Teng YH, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol*. 2012 Jan; 31(1): 3-16.

Tomich CE. Calcifying odontogenic cyst and dentinogenic ghost cell tumor. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2004 Aug; 16(3): 391-7.

Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch*. 2001 Dec; 439(6): 725-51.

Van Rensburg LJ, Thompson IO, Kruger HE, Norval EJ. Hemangiomatous ameloblastoma: Clinical, radiologic, and pathologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Mar; 91(3): 374-80.

Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer*. 1970 Sep; 26(3): 699-710.

Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 1998 Feb; 8(1): 95-102.

Yoshida M, Kumamoto H, Ooya K, Mayanagi H. Histopathological and immunohistochemical analysis of calcifying odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med*. 2001 Nov; 30(10): 582-8.

Yoon JH, Kim HJ, Yook JI, Cha IH, Ellis GL, Kim J. Hybrid odontogenic tumor of calcifying odontogenic cyst and ameloblastic fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul; 98(1): 80-4.

Zornosa X, Muller S. Calcifying cystic odontogenic tumor. Head Neck Pathol. 2010 Dec; 4(4): 292-4.

ANEXO 1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (2008).

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado

Page 1 of 1



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Tumores odontogênicos: estudo clínico-patológico na cidade do Rio de Janeiro"**, protocolo nº 133/2008, dos pesquisadores Rebeca de Souza Azevedo e Fabio Ramôa Pires, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/12/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Odontogenic tumors: a clinicopathologic study in Rio de Janeiro"**, register number 133/2008, of Rebeca de Souza Azevedo and Fabio Ramôa Pires, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

file://E:\defesa\Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado.htm

20/1/2009

ANEXO 2. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (2011).

09/05/2011

Comitê de Ética em Pesquisa - Certifica...



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise da expressão imunoistoquímica da via Wnt/Beta-catenina no desenvolvimento dos ameloblastomas sólidos"**, protocolo nº 016/2011, dos pesquisadores Sabrina Nogueira de Moraes e Rebeca de Souza Azevedo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 09/05/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Immunohistochemical study of Wnt/Beta-catenin signaling pathway in solid ameloblastomas"**, register number 016/2011, of Sabrina Nogueira de Moraes and Rebeca de Souza Azevedo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 05/09/2011.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.