



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

YAILIT DEL CARMEN MARTINEZ VARGAS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS ING3 e
ING4 EM LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS**

Natal - RN

2018

YAILIT DEL CARMEN MARTINEZ VARGAS

ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS ING3 e ING4
EM LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz

Natal/RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos - Departamento de Odontologia

Vargas, Yailit Del Carmen Martinez.

Estudo da expressão imuno-histoquímica das proteínas ING3 e ING4 em lesões odontogênicas epiteliais benignas / Yailit Del Carmen Martinez Vargas. - 2018.

99 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Patologia Oral, Natal, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz.

1. Lesões odontogênicas- Dissertação. 2. Imuno-histoquímica - Dissertação. 3. ING4 - Dissertação. 4. ING3 - Dissertação. 5. Gene supressor de tumor- Dissertação. I. Queiroz, Profa. Dra. Lélia Maria Guedes. II. Título.

RN/UF/BSO

BLACK D61

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 15 de fevereiro de 2018, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

COMISSÃO EXAMINADORA

Denise Hellen S. P. de Oliveira

Dra. Denise Hellen Imaculada Pereira de Oliveira

Universidade Federal do Ceará

1º Examinador

Ana Miryam C. de Medeiros

Dra. Ana Miryam Costa de Medeiros

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

2º Examinador

Lélia M. Guedes Queiroz

Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Presidente - Orientadora

“Tudo o que a mente humana pode imaginar, ela pode conquistar”

Napoleón Hill.

Dedicatória

*El verdadero aprendizaje consiste en asumir que la vida es dinámica, no se detiene, que todo está en constante cambio y que cada día vendrá algo nuevo. Por eso quiero dedicar este trabajo primeramente a **Dios** por ser mi guía todos los días y por cada una de las oportunidades que he tenido en la vida, gracias al él, he vivido muchas experiencias que me han hecho crecer y madurar como persona a través de todas las pruebas que él ha puesto en mi camino y me ha ayudado a superar. Por darme una familia maravillosa, también salud y simplemente por el privilegio de vivir.*

*A **Maudys Margarita Vargas de Martínez**, mi mamá, una mujer luchadora, maravillosa, super bondadosa, que amo con toda mi alma. Por ser mi apoyo incondicional y que a pesar de la distancia su presencia espiritual y su amor superaron todas las fronteras que pudieron existir. Por estar siempre allí para mí, aconsejándome, escucharme con paciencia, darme ánimos cada vez que necesito, por guiarme día a día en cada paso que doy y ayudarme a superar todos los obstáculos y sobre todo darme fuerzas para seguir adelante.*

*A **Jesús Alberto Martínez Sifontes**, mi papá, por todo el cariño que siempre me dio desde pequeña, por ser una persona estricta conmigo para siempre hacer las cosas con excelencia, disciplina y esfuerzo. Un hombre que también amo, gracias por ese apoyo que siempre tuve para conquistar todas mis metas. Por inculcar valores importantes que me hicieron cada vez una mejor persona y por enseñarme a nunca rendirme ante mis sueños y tener fé en Dios.*

*A **Jesmalyk Del Carmen Martínez Vargas**, mi hermana, por los buenos momentos vividos, porque la distancia no supera el cariño y la falta que sentimos.*

" Si quieres llegar rápido, camina solo; pero si quieres llegar lejos camina acompañado "

Proverbio Africano.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Com a finalidade de crescer mais a nível profissional e espiritual, teve o objetivo e a valentia de viajar para brasil. Nesta caminhada de dois anos, conheci pessoas maravilhosas todas com peculiaridades diferentes. Todos compartilharam momentos, carinho e conhecimento. E nesta última etapa em brasil entendi que, não é felicidade que nos traz gratidão, é a gratidão que nos traz felicidade, por isso com muito carinho quero agradecer:

*A **Deus** em primer lugar, por ter me acompanhado e protegido durante estes dois anos aqui em Natal, e ter cruzado pessoas boas no meu caminho. Agradeço a Deus por minha família, pela saúde, por as provas que teve na vida, pelos êxitos, pelas lagrimas, pelas risadas e simplesmente por estar viva.*

*A meus Pais **Maudys e Jesús** porque graças a eles estou aqui, e devo a eles tudo o que eu sou. Por ser meus mestres desde criança, pelos valores que agora me definem, por todo o amor, por me ensinar que na vida a fé em Deus é o mais importante e que sempre devemos lutar por nossos sonhos. Além que a distância era longa, sempre estiveram perto de mim do coração e dando ânimos nos momentos mais difíceis durante estes dois anos. Obrigada por torcer sempre por mim, amo vocês com todo meu coração. A minha irmã **Jesmalyk**, que me deu a felicidade de ser tia, trazendo alegria, nostalgia e amor a minha vida. A meus avos **Carmen, Olga e Faustino**, tenho certeza que desde o céu sempre cuidam de mim. Estão em meus pensamentos todos os momentos especiais vivenciados, aprendizados e experiências. Tenho vocês no meu coração. São meus anjos do céu.*

A meus demais familiares tios, tias e primos que sempre derem apoio e estão em constante comunicação, apesar de eu estar numa longa distância.

*A minha orientadora **Dr^a Lélia Maria Guedes Queiros**. Eu acredito que tudo o que acontece em nossas vidas é por alguma razão, e Deus colocou você na minha vida para lograr alcançar minhas metas aqui no brasil. Minha gratidão é por toda sua ajuda, disposição, pela paciência, pelos ensinamentos, pela sua dedicação e sobre todo por me escutar em momentos que eu tive dificuldades, pelos momentos de descontração e sobre todo pelo apoio oferecido, muito obrigada "mamis".*

Aos demais professores da pós-graduação de patologia oral da UFRN que são exemplos de dedicação à nobre tarefa de ensinar:

*A **Prof.^a. Dr.^a. Lélia Batista de Souza**, você foi a primeira pessoa com quem eu entrei em contato antes de vir a Brasil, e agradeço pelas atenções dadas durante esse período, você é um exemplo de dedicação e amor a profissão. Ao **Prof. Dr. Leão Pereira Pinto**, meu pai adotivo, por transmitir alegria e carinho. Todos sabemos que eu sou a “mais querida”, você é uma pessoa digna de respeito e admiração. **Prof.^a Dr.^a. Márcia Cristina da Costa Miguel**, por sempre exigir o melhor de a gente, transmitir seus inumeráveis conhecimentos nas aulas, sendo exemplo de profissionalismo e inteligência. **Prof.^a. Dr.^a. Érika Janine Dantas da Silveira**, por sua disposição e dedicação tanto nas aulas teóricas como na clínica de estomatologia e seu compromisso com a profissão. Ao **Prof. Dr. Pedro Paulo De Andrade Santos**, por todos os conhecimentos transmitidos, por participar na minha banca de qualificação e dar sugestões importantes para a realização deste estudo e por sua disposição. Você é exemplo de compromisso profissional e excelência. Ao **Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa**, por transmitir tranquilidade e simplicidade. E por essas conversas de política que demonstraram que o senhor sabe muito mais além da política de Brasil, e por compartilhar pensamentos similares, porque queremos o melhor para o futuro e progressão de uma nação. À **Profa. Dra. Ana Myriam Costa de Medeiros**, primeiramente por toda a sabedoria e experiência transmitida na clínica de estomatologia, e muito agradecida de ter você na minha banca de qualificação e defesa de dissertação e por suas sugestões no exame de qualificação. À **Profa. Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira**, por todas as conversas descontraídas, por sua atenção e transmissão de conhecimentos na clínica de estomatologia. **Profa. Dra. Roseana, de Almeida Freitas**, por nos ensinar que com esforço podemos alcançar a excelência. **Prof.^a Dr.^a. Hébel Cavalcante Galvão**, por transmitir alegria e exemplo de ética profissional. **Prof.^a Dr.^a. Denise Helen**, agradeço por participar na minha banca de defesa de mestrado, por sua disposição e simpatia, no primeiro momento que a gente se conheceu.*

*A todos os doutorandos da pós-graduação de patologia oral da UFRN por sua receptividade e simpatia, além de ajuda e transmissão de conhecimentos em especial, A **Hellen Bandeira de Pontes Santos** uma pessoa muito serena, que transmite paz e bondade. Obrigada por compartilhar momentos especiais, e por sua disponibilidade para ajudar academicamente e ante dificuldades que fora do mundo profissional. A **Hianne Cristinne de Morais Medeiros**, **Tiago Joao Oliveira Silva Filho** meus irmãos patológicos, sempre receptivos e com energia positiva. A **Mara Luana Batista Severo**, por me acolher no natal do 2016 na sua casa, onde*

teve a oportunidade de compartilhar com sua linda família e por todos os momentos únicos de fé e esperança, alegria e cumplicidade que Deus permitiu em nossas vidas.

A meus 12 companheiros de mestrado, que estiveram comigo nesta caminhada, todos com o mesmo objetivo.

***Ondina Karla Mousinho da Silva Rocha**, por todo o carinho e amizade, por abrir as portas da sua casa, em João Pessoa, para mim, e me levar a conhecer parte da sua terrinha e sua família que me deram boas atenções. Você é uma pessoa de boa bondade, também perfeccionista, organizada e comprometida com seus objetivos profissionais. Me levo de você bonitas lembranças no meu coração. **Romulo de Paiva Macedo**, por sua receptividade e disponibilidade, você sempre esteve disposto para ajudar, além de compartilhar bons passeios. **Juliana Campos Pinheiro**, além de toda essa ansiedade e loucura que lhe caracteriza, você é uma pessoa que sempre ajuda para quem necessita. **Israel Leal Cavalcante**, nesta vida não todos somos perfeitos, todos temos defeitos e virtudes, durante esse caminho longo que é a vida aprenderemos através das experiências. Obrigada por me levar conhecer teu país Ceará e todos as atenções que eu recebi lá, além de conhecer e fazer amizades maravilhosas como **Manuela, Laecio e Mayra**. **Á Dáurea Adília Cobe Séna**, você é uma menina transparente, verdadeira e muito honesta. Obrigada pelos momentos, pelas tristezas, pelas alegrias e risadas que compartilhamos juntas. **Everton Freitas De Moraes**, por sua disposição, você transmite tranquilidade e admiro sua dedicação e disciplina para conquistar seus objetivos, **Larissa Santos Amaral Rolim**, você foi a primeira pessoa, que eu consegui entender com clareza, quando o português representava para mim uma barreira de comunicação. Além de compartilhar o bom gosto pela música e gastronomia, você sempre foi receptiva e disponível para compartilhar conhecimento. **Caio César Da Silva Barros**, tenho muito que agradecer a você, porque sua presença sempre trouxe luz, paz e serenidade na minha vida aqui no Brasil. Você é uma pessoa muito bondosa. Amei todas as vezes que compartilhamos juntos, quando um sanduíche sempre foi tua fraqueza. Além disso por todo o carinho que eu recebi de tua parte e aqueles abraços apertados que são necessários para trazer mais felicidade a nossos dias. **Cristianne Kalinne Santos Medeiros**, sinto muita admiração por você, porque você é muito esforçada e dedicada, além de ter uma família maravilhosa com vários filhos para dar atenção, você nunca desistiu de suas metas profissionais, além disso ainda tinha tempo para compartilhar amizade e bons conselhos. **Deborah Gondim Lambert Moreira**, você é um exemplo de imparcialidade o que é muito importante porque os mais inteligentes são os que sabem lidar melhor com seus sentimentos. Obrigada por todas as ajudas que eu recebi de você*

cada vez que precise. **Mariana Carvalho Xerez**. Minha eterna roommate e quase confidente de histórias e experiências. A forma leve de você lidar com as dificuldades é digno de admirar. **Glória Maria De França**, tenho muitas coisas boas que falar de você, já que você foi uma benção de Deus nestes últimos tempos, você esteve de meu lado e me ajudou batalhar com muitas dificuldades. Foram bons todos os momentos compartilhados, aquelas aventuras vivenciadas e todo o carinho que recebi da sua parte. Você é uma menina muito sonhadora sempre com metas e pensamentos positivos, espero que você persiga sempre seus sonhos porque, lembre-se sempre, que, os pensamentos que escolhemos pensar são as ferramentas que usamos para pintar o quadro de nossas vidas. A toda **minha turma M2** muito obrigada por me receber com os braços abertos, por todas as ajudas brindadas, por todo o carinho, pelos bons momentos, que foram de alegrias, estresse, lágrimas, risadas, energia positiva e que foram parte da minha experiência da aventura, que eu decidi viver aqui no Brasil. Minha Gratidão vocês estão no meu coração.

A minha irmãzinha linda **Rani Iani Costa Gonçalo**, uma pessoa com que adorei compartilhar bons momentos, uma menina muito simpática, colaboradora, sincera, com um coração bonito, muito organizada e que demonstrou realmente um carinho sincero, eu gostei muito de você e compartilhar momentos de estudo, como também momentos de descontração. E **Nelmara Sousa**, muito obrigada por me acolher em natal na casa de tua família e por todos os momentos compartilhados que foram únicos, você é uma menina que eu adorei de conhecer.

Aos funcionários, **Gracinha, Hévio, Lourdinha, Ricardo, Betsaida, Patrícia**. Muito obrigada por sempre me tratarem tão bem e estarem sempre dispostos a me ajudar. Vocês fazem acontecer. Queria dar meu agradecimento especial a **Sandrinha**, por seu bom humor todos os dias, sua vibração positiva e por sempre estar aí para me dar um abraço em momentos que eu mais necessitei. Muito obrigada por todos aqueles abraços apertados.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)**. E a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**. Porque graças a seu apoio financeiro foi possível a realização dessa pesquisa. **Muito obrigada Brasil**.

Resumo

RESUMO

Os cistos e tumores odontogênicos constituem um grupo heterogêneo de lesões originadas de tecidos epiteliais e/ou ectomesenquimais a partir do desenvolvimento embrionário do órgão dentário, acometendo unicamente os ossos gnáticos. Considerando que estas lesões de natureza epitelial apresentam um comportamento biológico distinto, as mesmas se tornaram alvo de numerosas investigações. As proteínas INGs desempenham um papel importante no controle do ciclo celular, senescência, reparo do DNA, proliferação celular e apoptose em diversas neoplasias. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a imunoexpressão das proteínas ING3 e ING4 em uma série de casos de lesões odontogênicas epiteliais benignas. A amostra consistiu de 20 ceratocistos odontogênicos (CO), 20 ameloblastomas (AMB) e 15 tumores odontogênicos adenomatóides (TOA). A imunoexpressão foi avaliada semiquantitativamente em cada caso estudado de acordo com o percentual de células epiteliais imunomarcadas positivamente, que variou de 0 a 3. Para análise estatística, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Spearman ($p < 0,05$). Resultados: A análise da expressão de ING3 revelou positividade no citoplasma e núcleo das células epiteliais sem diferença estatisticamente significativa entre as lesões estudadas. A análise da expressão da ING4 revelou positividade no citoplasma das células epiteliais de todas as lesões estudadas. A pontuação de imunomarcção citoplasmática para ING4 revelou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos de lesões estudadas, com maior frequência em TOA ($p < 0,05$). Após o pareamento, observou-se diferença significativa entre AMB e CO e entre AMB e TOA ($p < 0,05$). E a análise da expressão nuclear da ING4 nas lesões estudadas, revelou perda de expressão nuclear, seguido de uma expressão nuclear reduzida para os casos de AMB e CO, e positividade no núcleo das células epiteliais dos TOAs. A pontuação de imunomarcção nuclear para ING4 revelou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos de lesões estudadas, com maior frequência em TOA ($p < 0,05$). Após o pareamento, observou-se diferença significativa entre AMB e CO e entre AMB e TOA e entre CO e TOA ($p < 0,05$). Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que a regulação do ING3 e ING4 no crescimento celular, indicam que essas proteínas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão de lesões odontogênicas com comportamentos biológicos distintos.

Palavras-Chave: Lesões odontogênicas epiteliais benignas. Gene supressor de tumor. Imuno-histoquímica. ING3. ING4.



Abstract

ABSTRACT

Odontogenic cysts and tumors represent a heterogeneous group of lesions originated from epithelial or ectomesenchymal tissues from the embryonic development of the dental organ, affecting only the gnathic bones. Considering that these epithelial lesions have a distinct biological behavior, they have become the subject of numerous investigations. ING3 genes play an important role in cell cycle control, senescence, DNA replication and repair, cell proliferation and apoptosis in various neoplasms. The aim of this study was to comparatively evaluate the immunohistochemical expression of ING3 and ING4 proteins in a series of cases of benign epithelial odontogenic lesions. The sample consisted of 20 odontogenic keratocysts (OK), 20 ameloblastomas (AM) and 15 adenomatoid odontogenic tumors (AOT). The immunohistochemical staining was evaluated semiquantitatively on each case studied according to the percentage of positively immunostained epithelial cells, which ranged from 0 to 3. For statistical analysis were used the Kruskal-Wallis and Spearman tests ($p < 0.05$). Results: Analysis of ING3 expression was positive in the cytoplasm and nucleus of epithelial cells without statistically significant difference between group of lesions studied. Analysis of ING4 expression revealed positivity in the cytoplasm of epithelial cells of all lesions studied. The cytoplasmic immunostaining score for ING4 revealed a statistically significant difference between the groups of lesions studied, with a higher frequency in AOT ($p < 0.05$). After pairing, there was a significant difference between the AM and OK, AM and AOT ($p < 0.05$). And the analysis of ING4 nuclear expression in the studied lesions revealed loss of nuclear expression, followed by reduced nuclear expression for cases of AM and OK, and positivity in the nucleus of AOT epithelial cells. The nuclear immunostaining score for ING4 revealed a statistically significant difference between the groups of lesions studied, with a higher frequency in AOT ($p < 0.05$). After pairing, we observed a significant difference between AM and OK and between AM and AOT and between OK and AOT ($p < 0.05$). In conclusion, the results of the present study suggest that the regulation of ING3 and ING4 in cell growth indicate that these proteins may play an important role in the development and progression of odontogenic lesions with different biological behaviors.

Keywords: Benign epithelial odontogenic lesions. Tumor suppressor gene. Immunohistochemistry. ING3. ING4.

Lista de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Clone, especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados.....	54
Quadro 2 -	Variáveis dependentes elencadas para os testes estatísticos.....	57
Quadro 3 -	Variáveis independentes elencadas para os testes estatísticos.....	57
Figura 1 -	Estrutura esquemática dos diferentes membros da família de proteínas ING.....	42
Figura 2 -	Principais funções e interações dos domínios das proteínas INGS.....	43
Figura 3 -	Ativação, interpretação e migração da família ING.....	45
Figura 4 -	Expressão imuno-histoquímica da proteína ING3 no citoplasma das células de AMB, CO e TOA.....	62
Figura 5 -	Expressão imuno-histoquímica da proteína ING3 no núcleo das células de AMB, CO e TOA.....	64
Figura 6 -	Expressão imuno-histoquímica da proteína ING4 no citoplasma das células de AMB, CO e TOA.....	67
Figura 7 -	Expressão imuno-histoquímica da proteína ING4 no núcleo das células de AMB, CO e TOA.....	70
Gráfico 1 -	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING3 (marcação citoplasmática) de acordo com os grupos. Natal – RN, 2018.....	63
Gráfico 2 -	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING3 (marcação nuclear) de acordo com os grupos. Natal – RN, 2018.....	65
Gráfico 3 -	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) de acordo com os grupos (*p < 0,05). Natal – RN, 2018.....	79
Gráfico 4 -	Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) de acordo com os grupos (*p < 0,05). Natal – RN, 2018.....	72

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING3 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.....	63
Tabela 2 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING3 (marcação nuclear) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.....	65
Tabela 3 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.....	68
Tabela 4 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Mann-Whitney e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos quando analisados dois a dois. Natal – RN, 2018.....	68
Tabela 5 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação nuclear) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.....	71
Tabela 6 -	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Mann-Whitney e significância estatística (p) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação nuclear) em relação aos grupos quando analisados dois a dois. Natal – RN, 2018.....	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Ameloblastoma.
CO	Ceratocisto Odontogênico.
CEP	Comitê de ética em pesquisa.
CNS	Conselho nacional de ética.
CONEP	Comissão nacional de ética em pesquisa.
DNA	(Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>) Ácido desoxirribonucleico.
FHIT	(Do inglês <i>fragile histidine triad protein</i>), trata-se do gene responsável por codificar esta proteína que atua como supressor tumoral.
HAT	(Do inglês <i>Histone AcetylTransferase</i>) Histona Acetil-transferase.
HE	Hematoxilina e eosina.
HDCA	(Do inglês <i>Histone DeAcetylase</i>) Histona Desacetilase.
ING	(Do inglês <i>Inhibitor of Growth</i>) Inibidor do crescimento.
LID	(Do inglês <i>Lamin Interaction Domain</i>) Domínio de interação laminina.
LOH	(Do inglês <i>loss of heterozygosity</i>) Perda de heterozigidade
LTAS2	Gene <i>lats</i> encontrado em <i>Drosophila</i> , sendo considerado um gene supressor tumoral.
LZL	(Do inglês <i>leucine zipper-like</i>) Domínio leucine zipper.
MCC	(Do inglês <i>Colorectal mutant cancer protein</i>) gene que codifica a proteína mutante do câncer coloretal.
NCR	(Do inglês <i>Novel Conserved Region</i>) Nova região conservada.
NLS	(Do inglês <i>the nuclear localisation signal</i>) Sinal de localização nuclear.
NTS	(Do inglês <i>nucleolar transport sequences</i>) Sequência de transporte nucleolar
OMS	Organização mundial da saúde.
P16	Gene conhecido como múltiplo supressor tumoral -1, trata-se de uma proteína supressora de tumor.
P53	Proteína de 53kD que atuam como supressor tumoral.
PBR	(Do inglês <i>poly basic region</i>) Região polibásica

PCNA	(Do inglês <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>) Antígeno nuclear celular proliferante.
PHD	(Do inglês <i>Plant Homeo Domain</i>) Domínio homeostático de planta.
PIP	(Do inglês <i>phosphatidylinositol monophosphates</i>) Monofosfatos de fosfatidilinositol.
PTMs	(Do inglês <i>post-translational modifications</i>) Modificações pós-tradução.
PTCH	(Do inglês <i>Protein patched homolog</i>), membro da família patched e age como um supressor tumoral.
RNA	(Do inglês <i>ribonucleic acid</i>) Ácido ribonucleico.
TO	Tumor odontogênico
TOA	Tumor odontogênico adenomatóide
TOC	Tumor odontogênico ceratocisto
TOEC	Tumor odontogênico epitelial calcificante
TSG	Gene Supressor de tumor
TSLC1	(Do inglês <i>tumor suppressor in lung cancer 1</i>) gene que codifica a proteína supressora tumoral do câncer de pulmão 1.
UV	Radiação Ultravioleta

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1	LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS.....	30
2.1.1	Ceratocisto odontogênico.....	31
2.1.2	Ameloblastoma.....	34
2.1.3	Tumor odontogênico adenomatoide.....	38
2.2	GENES SUPRESSORES DE TUMORES (INGs).....	40
2.2.1	ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS ING_s.....	41
2.3	ING ₃	46
2.4	ING ₄	47
3	PROPOSIÇÃO.....	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	52
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	52
4.3	POPULAÇÃO.....	52
4.4	AMOSTRA.....	52
4.5	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	53
4.5.1	Critérios de inclusão.....	53
4.5.2	Critérios de exclusão.....	53
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	53
4.7	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	54
4.7.1	Técnica imuno-histoquímica.....	55
4.7.2	Coloração pelo método imuno-histoquímico.....	55
4.7.3	Análise imuno-histoquímica.....	56
4.8	VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	57
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
5	RESULTADOS.....	60
5.1	RESULTADOS DA ANALISE MORFOLÓGICA.....	60
5.2	RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	61
5.2.1	Análise da imunexpressão de ING₃.....	61
5.2.2	Análise da imunexpressão de ING₄.....	66

6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICES.....	94
	ANEXO.....	97



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os ossos maxilares são estruturas onde podem surgir uma grande variedade de lesões, dentre estas, merecem destaque os cistos e tumores odontogênicos que são originados de remanescentes dos tecidos epiteliais e/ou ectomesenquimais a partir do desenvolvimento embrionário do órgão dentário. O comportamento biológico destas lesões varia desde proliferações de tecidos não neoplásicos a neoplasias benignas não agressivas ou agressivas, e tumores malignos com alto potencial metastático. Dentro deste grupo heterogêneo de lesões, os cistos odontogênicos são encontrados na prática odontológica de forma relativamente comum, em contraste, os tumores odontogênicos são considerados lesões incomuns. Porém, essas últimas tornaram-se desafios consideráveis quanto à compreensão de sua patogenia, formulação do diagnóstico e tratamento (AVELAR et al., 2008; SLOOTWEG et al., 2009; SERVATO et al., 2013; KWON et al., 2017).

Na iniciativa de agrupar e compreender a natureza e comportamento biológico destas lesões, surgiram várias classificações ao longo dos anos. Sendo a mais recente publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017. Apesar do CO ser conhecido como uma lesão de natureza cística, considerou-se que esse possui um comportamento agressivo parecido ao dos TOs, devido a que essa lesão pode crescer e atingir grandes dimensões antes de se manifestar clinicamente, além de apresentar particular tendência à recidiva após o tratamento cirúrgico, sendo assim, recategorizado pela OMS no ano 2005 como uma neoplasia odontogênica benigna de origem epitelial. Porém, na atual classificação, o CO voltou a ser incluído entre os cistos odontogênicos de desenvolvimento (WRIGHT; VERED, 2017). Pesquisas adicionais são necessárias e estão sendo desenvolvidas na tentativa de elucidar mecanismos moleculares envolvidos no comportamento diferenciado dessa lesão cística (JOHNSON et al., 2014; RAZAVI et al., 2015; GOMES et al., 2017; WU et al., 2017; SPEIGHT, P. M; TAKATA, 2017).

. Dentre todos os 23 subtipos de tumores odontogênicos (TOs) conhecidos, o ameloblastoma (AMB) é o segundo mais prevalente e se destaca dentre o grupo de TOs epiteliais pelo seu curso localmente agressivo, o que o torna alvo de numerosas investigações. Apesar da sua natureza benigna, ele possui grande potencial de invasão nos tecidos adjacentes e tendência a recidivas (KUMAMOTO; OOYA, 2005; GOMES et al., 2010; EL-NAGGAR et al., 2017).

Por outro lado, dentre os TOs benignos derivados do epitélio odontogênico, podemos citar o tumor odontogênico adenomatóide (TOA) que é caracterizado por apresentar um crescimento

lento, mas progressivo e um comportamento clínico e biológico indolente (BARNES et al., 2005; ANDRADE et al., 2008; PREMALATHA et al., 2013; NEVILLE et al., 2016).

Existem muitas controvérsias em relação ao surgimento dessas lesões, porém, diversos estudos têm buscado identificar os eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento e progressão dos cistos e tumores odontogênicos, destacando os de caráter genético e epigenético. No entanto, pouco se sabe sobre a influência de alterações cromossômicas na patogênese destas lesões (MOSQUEDA-TAYLOR 2008; MOREIRA et al., 2009; GOMES et al., 2010).

Sabe-se que o comportamento biológico de qualquer lesão é altamente dependente não só da sua atividade proliferativa, mas também das taxas de morte celular. Estudos recentes têm demonstrado que uma nova família de genes supressores de tumores denominada ING tem sido associada ao controle do ciclo celular, na senescência, replicação, reparo do DNA, proliferação celular e apoptose em diversas neoplasias malignas, interagindo fisicamente e funcionalmente com a P53, como também de maneira independente de P53 (GUÉRILLON et al., 2014). Entretanto, com relação a lesões odontogênicas como AMB, só existe uma pesquisa envolvendo o estudo destes genes e sua atuação como um possível fator determinante na proliferação das células tumorais.

Considerando-se a participação de genes supressores tumorais no desenvolvimento de tumores, o presente estudo propõe avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas ING-3 e ING-4, em uma série de casos de lesões odontogênicas epiteliais benignas, na tentativa de contribuir para um melhor entendimento do papel desses marcadores no desenvolvimento e comportamento biológico das lesões odontogênicas estudadas.



Revisão Da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS

A odontogênese resulta de um processo complexo de interação entre os componentes ectodérmicos e ectomesenquimais através de fenômenos indutores que envolvem fatores de crescimento, fatores de transcrição e receptores de sinal. Antes deste processo concluir, as lâminas dentárias primárias e secundárias desaparecem. Qualquer remanescente destas células embriológicas pode mais tarde dar origem a uma ampla variedade de cistos e tumores odontogênicos (REICHART; PHILIPSEN, 2004; DUNFEE et al., 2006; AURREKOETXEA et al., 2016; KWON et al., 2017; BILODEAU; COLLINS, 2017).

Destacam-se os TOs, os quais constituem um grupo complexo de lesões, incomuns com manifestações clínicas e características histopatológicas diversas. Tais lesões neoplásicas têm sido um tema de considerável interesse para os patologistas orais, que vêm estudando e catalogando estes tumores durante décadas. Estas lesões compreendem aproximadamente 2,5% de todas as lesões biopsiadas nos consultórios odontológicos (MOSQUEDA-TAYLOR et al., 1997; AVELAR et al., 2008).

A frequência dos TOs é muito baixa em comparação com outras patologias diagnosticadas no interior dos ossos gnáticos, como no caso dos cistos odontogênicos. Entretanto, estudos epidemiológicos vêm sendo realizados a nível mundial com a intenção de determinar com mais precisão a ocorrência dessas lesões em variadas populações, e caracterizar o comportamento das mesmas, além de estabelecer as possíveis causas que levem ao desenvolvimento desses tumores (MOSQUEDA-TAYLOR, 2008; ORTEGA et al., 2007; LAWAL; ADISA; OLUSANYA, 2013)

No ano 2017, a OMS estabeleceu uma nova classificação completa de lesões odontogênicas com o objetivo de simplificar a classificação e esclarecer a terminologia dos nomes das lesões, e assim refletir adequadamente sobre sua natureza e comportamento biológico (EL-NAGGAR et al., 2017). O principal objetivo da OMS foi assegurar que as alterações, inserções ou exclusões foram suportadas por provas (SPEIGHT, P. M; TAKATA, 2017). A mudança mais marcante inclui o retorno dos cistos odontogênicos os quais foram divididos em cistos odontogênicos de origem inflamatória e cistos de desenvolvimento (odontogênico e não odontogênico), onde o tumor odontogênico ceratocístico (TOC) foi novamente denominado como CO (EL-NAGGAR et al., 2017 SPEIGHT, P. M; TAKATA, 2017).

Os TOs foram divididos em tumores de epitélio odontogênico que são compostos somente por epitélio odontogênico sem qualquer participação do ectomesênquima; TOs mistos, compostos por epitélio odontogênico e por elementos do ectomesênquima e tumores do ectomesênquima odontogênico, que são compostos principalmente por elementos do ectomesênquima (EL-NAGGAR et al., 2017; SPEIGHT, P. M; TAKATA, 2017). Embora as lesões odontogênicas compartilhem as mesmas fontes de epitélio odontogênico, apresentam diferentes graus de agressividade local (DINIZ et al., 2017).

Os tumores originados do epitélio odontogênico exibem variações histológicas consideráveis e são classificados dentro de várias entidades benignas e malignas. É relatado na literatura um possível comportamento agressivo desses tumores epiteliais, o que justifica algumas das mudanças ocorridas na classificação da OMS publicada em 2017 (EL-NAGGAR et al., 2017). Além disso os cistos odontogênicos, apesar de serem entidades que apresentam um comportamento biológico indolente, podem atingir dimensões consideráveis similares a dos TOs se não forem diagnosticados a tempo e tratados adequadamente (OCHSENIUS et al., 2007). O CO, apesar de sua natureza cística, já foi considerado um TO, porque também sugeriram influência genética na etiologia dessa lesão. Todavia, vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de comparar o comportamento biológico do CO ao dos TOs, na tentativa de elucidar mecanismos moleculares envolvidos no comportamento diferenciado deste cisto (RAZAVI et al., 2015; GOMES et al., 2017; WU et al., 2017).

A etiopatogenia destas lesões é desconhecida e características clínicas como sexo, idade e localização podem ser úteis no diagnóstico diferencial (EL-NAGGAR et al., 2017). Muitas controvérsias existem em relação ao surgimento dessas lesões e vários estudos para identificar alterações celulares, genéticas e moleculares foram realizados na tentativa de explicar os mecanismos da oncogênese, citodiferenciação e progressão tumoral (MOSQUEDA-TAYLOR 2008; MOREIRA et al., 2009; GOMES et al., 2010).

2.1.1 Ceratocisto Odontogênico

O termo CO foi adotado por Philipsen no início de 1956 para todos os cistos que apresentavam queratinização histológica (POGREL, 2013). Na identificação do tipo histológico de cistos e tumores da OMS, em 1992, “CO” foi a terminologia preferida para a identificação destas lesões (NEVILLE et al., 2016). Acredita-se que estas lesões se originam do epitélio odontogênico, particularmente de remanescentes da lâmina dentária ou também de extensões de células basais do epitélio oral subjacente (MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL,

2010). Este cisto apresenta um mecanismo de crescimento e comportamento biológico diferenciado daqueles do cisto dentígero e do cisto radicular, que são mais comuns (NEVILLE et al., 2016).

O termo TOC, foi estabelecido para incluir essa lesão na categoria de neoplasia odontogênica epitelial na penúltima classificação da OMS no ano 2005, para enfatizar o seu comportamento agressivo e a alta taxa de recorrência, além de apresentar atividade mitótica superior aos demais cistos odontogênicos (PHILIPSEN; NIKAI, 2005; SUYAMA et al., 2008; ALAEDINI et al., 2009; SUYAMA et al., 2009; AYOUB; BAGHDADI; EL-KHOLY, 2011). Além disso, justificam que a lesão pode apresentar associação com o Síndrome do Carcinoma Nevoide Basocelular ou Síndrome de Gorlin (condição hereditária autossômica dominante que exibe alta penetrância e expressividade variável), e influência de alterações genéticas, como mutações do gene PTCH1 e perda de heterozigosidade do Cromossomo 9q22.3 (AGARAM et al., 2004; MADRAS; LAPOINTE, 2008; VERED et al., 2009; FINKELSTEIN et al., 2013).

Recentemente, alguns estudos têm destacado os aspectos moleculares desta lesão, onde já foi demonstrado LOH, bem como evidências de perdas alélicas principalmente nos genes p16, p53, PTCH, MCC, TSLC1, LTAS2 e FHIT. Considerando que todos estes genes são supressores tumorais associados a diferentes tipos de neoplasias humanas, estes achados podem dar suporte adicional ao entendimento do comportamento agressivo do CO (GOMES; DINIZ; GOMEZ, 2009). Infelizmente, esses estudos não examinaram outras lesões císticas dos ossos gnáticos; portanto, atualmente não se sabe se essas alterações são exclusivas do CO (NEVILLE et al., 2016).

Atualmente a nova classificação da OMS de 2017, modificou o termo do TOC, sendo retomado o termo de CO, porque além desta lesão apresentar um comportamento agressivo e que uma proporção dessa lesão está associada a uma mutação ou inativação do gene PTCH1 com alterações observadas até em 80% dos COs, eles não são específicos quando se apresenta perda de heterozigosidade (LOH) na região 9q22.3 (onde o gene PTCH1 foi mapeado) e essas características foram encontradas em outros cistos de desenvolvimento, como no caso dos cistos dentígeros (SPEIGHT; TAKATA, 2017; EL-NAGGAR et al., 2017).

Do ponto de vista epidemiológico, o CO representa 10-20% de todos os cistos odontogênicos e é o terceiro cisto dos maxilares mais comum, ele está presente em uma ampla faixa etária, com pico entre a 2^a e 3^a década de vida sendo mais comum no sexo masculino (NEVILLE et al., 2009; SHEAR; SPEIGHT, 2011). A idade média varia de 50-70 anos (EL-NAGGAR et al., 2017).

Em fases iniciais, o CO é assintomático e, portanto, detectado somente por achados radiológicos ocasionais (NEVILLE et al., 2016). Em fases avançadas estas lesões podem aumentar consideravelmente seu tamanho e causar, alterações no posicionamento de dentes, dor, trismo, parestesia e lesões na maxila podem deslocar a órbita (PEREIRA et al., 2012; FINKELSTEIN et al., 2013). Radiograficamente, a lesão aparece como uma imagem unilocular ou multilocular bem definida, rodeada por margens suaves ou com bordas escleróticas (MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2010; FINKELSTEIN et al., 2013). A localização mais comum é a região posterior de corpo e ramo da mandíbula e as lesões geralmente envolvem a coroa de um terceiro molar, resultando uma aparência semelhante ao do cisto dentífero (NEVILLE et al., 2016; SPEIGHT; TAKATA, 2017).

Dentre as características histológicas do CO observa-se um revestimento epitelial pavimentoso estratificado paraceratinizado; uma camada superficial fina e ondulada de paraceratina, a espessura varia de 5-8 camadas de células; nota-se um caráterístico desgarre do epitélio. A camada basal é bem definida com células hiper Cromáticas organizadas em paliçada, uma junção epitélio-conjuntivo plana geralmente desprovida de cristas epiteliais, e uma cápsula fibrosa relativamente fina que na sua maior parte não apresenta infiltrado de células inflamatórias (GOMES et al., 2009; LI; KIKUCHI; TAKANO, 2011; SPEIGHT; TAKATA, 2017).

O tratamento de escolha geralmente inclui enucleação ou ressecção cirúrgica para grandes lesões e recorrências após a ressecção são raras, ocorrendo em menos de 2% dos casos. As recorrências podem ser originadas à remoção incompleta ou à presença de cistos filhos persistentes (FINKELSTEIN et al., 2013; SPEIGHT; TAKATA, 2017).

O grupo da OMS 2017 adicionou que a marsupialização é um tratamento eficaz, e as recorrências eram mais frequentes no passado, mas foram dramaticamente reduzidas com um tratamento metuculoso. Uma revisão sistemática relatou uma recorrência global de cerca de 25%, mas a taxa de recorrência diminuiu a 8% após a enucleação com a solução de carnoy. E as recorrências após a ressecção cirúrgica foram raras (ocorrendo em <2% dos casos). Em consideração o grupo de consenso da OMS concluiu que pesquisas adicionais são necessárias, mas, no momento, não há evidências suficientes para apoiar uma origem neoplásica do ceratocisto odontogênico (EL-NAGGAR et al., 2017).

2.1.2 Ameloblastoma

O AMB é um TO de crescimento lento, localmente invasivo, que apresentam um curso benigno na maior parte dos casos (NEVILLE et al., 2016). Foi descrito pela primeira vez em 1827 por Cusack, sendo batizado no ano 1885 pelo médico francês Louis-Charles Malassez, pelo nome de Adamantioma (MALASSEZ, 1885). Apenas em 1930, Ivey e Churchill usaram o termo de AMB para se referir a essa lesão (BACHMANN; LINFESTY, 2009; LEE; KIM, 2013).

O AMB é descrito como o TO mais diagnosticado, ficando atrás somente do odontoma. Representa 30% de todos os TOs identificados (JORDAN; SPEIGHT, 2009; NEVILLE et al., 2016; BILODEAU; COLLINS, 2017). Se destaca dentre o grupo de TOs epiteliais pelo seu curso localmente agressivo, o que o torna alvo de numerosas investigações. Apesar da sua natureza benigna, possui grande potencial de invasão nos tecidos adjacentes e tendência a recidivas (KUMAMOTO; OOYA, 2008). Sua histogênese ainda não é totalmente compreendida (GOMES et al., 2010; EL-NAGGAR et al., 2017). Podem surgir dos restos da lâmina dentária, de um órgão do esmalte em desenvolvimento, do revestimento epitelial de um cisto odontogênico ou das células basais da mucosa oral (NEVILLE et al., 2016).

Acomete aproximadamente em 80% dos casos com maior frequência a mandíbula, com uma marcada predileção para a região posterior. Acredita-se que essas lesões podem acometer qualquer região da mandíbula especificamente em pacientes de raça africana ou negros (BARNES et al., 2005; BILODEAU et al., 2017). Esta neoplasia geralmente é assintomática e cresce lentamente, causando assim expansão do osso. Os tumores em estágios mais avançados causam expansão volumétrica, dor e por vezes parestesia (MILMAN et al., 2016).

A nova classificação da OMS (2017), simplificou a terminologia em relação ao AMB, onde o termo AMB sólido/multicístico foi eliminado, já que este padrão está bem reconhecido como típico para AMB convencional. O termo AMB desmoplásico, também foi descartado como um tipo de lesão específica e atualmente é reconhecido como uma variante histológica do AMB convencional (SPEIGHT; TAKATA, 2017). Apresenta quatro variantes diferentes: AMB (convencional) caracterizado como o mais comum, AMB tipo unicístico que representa 5-22% de todos os casos, AMB tipo periférico/extraósseo (VERED; WRIGHT, 2017; ODELL; TILAKARATNE, 2017) e o AMB metastático também foi incluído como um tipo de AMB benigno, porque além de que pode acometer metástases para locais distantes, ele tem um comportamento histológico benigno (SPEIGHT; TAKATA, 2017).

O AMB convencional é caracterizado por um comportamento benigno, mas localmente invasivo com uma alta taxa de recorrência, apesar de ter uma estimativa de incidência anual de apenas 0,5 casos por milhões de habitantes, o AMB é o TO mais comum, excluindo os odontomas. (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2006) Acomete principalmente pacientes adultos entre a quarta e quinta década de vida com idade entre 8 a 92 anos e sem predileção por gênero (VERED; WRIGHT, 2017).

Ocorrem com maior frequência na região posterior da mandíbula, mais frequentemente na região de ramo e corpo e cerca de 15% a 20% dos AMBs ocorrem na maxila, geralmente nas regiões posteriores (FULCO et al., 2010; VERED; WRIGHT, 2017; NEVILLE et al., 2016). A apresentação clínica usual é de uma tumefação indolor ou expansão dos ossos gnáticos. Se não for tratada, então a lesão pode crescer lentamente até atingir proporções grandes ou grotescas. A dor e a parestesia são incomuns, mesmo nos tumores grandes (NEVILLE et al., 2016). Quando a lesão acelera seu crescimento pode apresentar complicações as quais incluem mobilidade dentária, má oclusão, parestesia, dor, invasão de tecidos moles, deformidade facial, dificuldade na mastigação e obstrução das vias aéreas, porém o descontrolado crescimento do tumor pode ser fatal (VERED; WRIGHT, 2017).

Radiograficamente, o AMB convencional, pode se apresentar como uma lesão radiolúcida multilocular mais comumente encontrado, ou unilocular que é menos frequente. É frequentemente observado um aspecto de “bolhas de sabão” (quando as loculações radiolúcidas são grandes) ou de “favos de mel” (quando as loculações são pequenas). A expansão vestibular e lingual das corticais geralmente está presente, e reabsorção das raízes dos dentes adjacentes ao tumor é comum (BACHMANN; LINFESTY, 2009; NEVILLE et al., 2016; VERED; WRIGHT, 2017). Estas lesões também podem estar associadas a um dente impactado (BILODEAU; COLLINS, 2017).

Ainda há existência de uma classificação do AMB, que se baseia exclusivamente nas características histológicas da lesão. Quanto a essa classificação, observa-se a existência de seis diferentes variantes. O tipo mais comum é o folicular, esse padrão se assemelha ao componente epitelial do órgão do esmalte, apresentando ilhas de epitélio odontogênico com células periféricas, cuboidais ou colunares, com núcleos hipercromáticos, organizados em paliçada e apresentam polaridade reversa. A porção central apresenta células arranjas frouxamente lembrando ao retículo estrelado do órgão do esmalte e muitas vezes sofrem degeneração cística. O segundo mais comum é o tipo plexiforme, composto por finos cordões anastomosados de epitélio ameloblastomatoso, circundado células epiteliais arranjas frouxamente lembrando ao reticulo estrelado do órgão do esmalte na área luminal da lesão. É

importante ressaltar que um terço dos tipos histológicos da lesão são de variedade plexiforme; e que diferentes tipos histológicos podem coexistir na mesma lesão (GARDNER et al., 2005; LOYOLA et al., 2015). Outros tipos histopatológicos incluem o padrão acantomatoso, de células basais, granular e desmoplásico (VERED; WRIGHT, 2017).

O tratamento atual é a ampla excisão cirúrgica, incluindo uma área de osso além da margem radiográfica. O tratamento é conservador, e a variante histológica não determina o prognóstico. A cirurgia do AMB convencional produz uma alta taxa de recorrência (60-80%), mais do 50% das recorrências ocorrem dentro de 5 anos após o tratamento inicial. O Acompanhamento deve ter 25 anos de duração, sendo considerado ao longo da vida (EL-NAGGAR et al., 2017).

O AMB periférico extra-ósseo, é um tumor benigno, assintomático, que ocorre nos tecidos moles da gengiva ou áreas alveolares edêntulas. Sua apresentação é exofítica com superfície lisa ou papilar / granular, a mucosa oral pode ser normocrômica ou avermelhada. (VERED; WRIGHT, 2017). Estas lesões parecem surgir da lâmina dentária sob a mucosa oral, ou das células basais do epitélio de superfície (NEVILLE et al., 2016). Elas correspondem a 1-10% de todos os AMBs, a faixa etária varia de 9 a 92 anos, onde o 64% de todos casos ocorrem na quinta até a sétima década de vida. (VERED; WRIGHT, 2017).

Em contraparte ao AMB convencional, o AMB periférico ou extra-ósseo, não apresenta imagem radiográfica, uma vez que não leva a comprometimento ósseo. A falta de penetração óssea do tumor pode ser devido a uma barreira criada pelo tecido fibroso da gengiva e periósteo (GARDNER et al., 2005). Outros autores descrevem que pode ser observado uma erosão superficial ou depressão óssea (VERED; WRIGHT, 2017). Histopatologicamente, essas lesões apresentam as mesmas características que a variante intraóssea desse tumor (NEVILLE et al., 2016). O tratamento recomendado é a remoção cirúrgica conservadora com margens de segurança. A recorrência é rara, mas deve ser realizado um acompanhamento a longo prazo (VERED; WRIGHT, 2017).

O AMB unicístico é descrito como uma variante do AMB intraósseo que ocorre como uma única cavidade cística, com ou sem a proliferação luminal (VERED; WRIGHT, 2017). Em 1977, Robinson e Martinez relataram pela primeira vez essa variante unicística que era indicativa de uma neoplasia muito menos agressiva. (ROBINSON; MARTINEZ, 1977; CHOUINARD et al., 2017). Representa 5-22% de todos os AMBs e aproximadamente 50% dos casos são diagnosticados na segunda década de vida, a faixa etária dos pacientes é entre 1-79 anos. Se apresentam significativamente em pacientes de 16 anos, muitas vezes associativos com dente impactado e a partir de 35 anos na ausência de impactação (EL-NAGGAR et al., 2017). Macro e microscopicamente a lesão se caracteriza por apresentar uma única cavidade

cística bem definida revestida por um epitélio odontogênico ameloblastomatoso (GARDNER et al., 2005).

Radiograficamente, se assemelha bastante a imagem de um cisto, havendo a necessidade de diagnóstico diferencial para a lesão, em especial o cisto dentífero, já que em muitos pacientes, essa lesão aparece tipicamente como uma imagem radiolúcida circunscrita que envolve a coroa de um terceiro molar inferior não erupcionado (ACKERMANN et al., 1988; PHILIPSEN; REICHART, 1998; MILMAN et al., 2016., NEVILLE et al., 2016).

Histopatologicamente a lesão apresenta três variantes histológicas. 1) padrão luminal que apresenta uma única cavidade cística revestida por um epitélio com características ameloblastomatosas (as células da periferia estão dispostas em paliçada com núcleos hipercromáticos, apresentando polaridade reversa e células superficiais frouxamente arranjadas lembrando ao retículo estrelado do órgão do esmalte). 2) padrão intraluminal é caracterizado por extensões intraluminais de revestimento epitelial dispostos em um padrão plexiforme. 3) o tipo mural apresenta comportamento mais agressivo, em comparação com as variantes luminiais e intraluminais (VERED; WRIGHT, 2017). Alguns autores sugerem que o AMB unicístico deva ser tratado de forma conservadora em comparação ao AMBs convencionais, uma vez que eles exibem um comportamento biológico menos agressivo (GUPTA et al., 2011; KALASKAR et al., 2011). Em contraparte a OMS (2017) recomenda a remoção de toda a lesão e com ressecção em bloco, devido a que muitas recorrências estão associadas à variante mural da lesão e é indicado o seguimento a longo prazo, porque a recorrência pode ocorrer 10 anos após o tratamento inicial (VERED; WRIGHT, 2017).

O AMB metastático é uma neoplasia de origem odontogênica que apesar de seu aspecto histológico benigno, tende a fazer metástases. Nos EUA, a incidência anual global de AMB maligno (ou seja, ambos carcinomas ameloblásticos e a metástase mais rara de AMB) é 1,79 casos por 10 milhões de habitantes (ODELL; TILAKARATNE, 2017). Na nova classificação da OMS no ano 2017 essa lesão foi incluída como um tipo de AMB benigno, porque além de que pode acometer metástases para locais distantes, ele tem um comportamento histológico benigno (SPEIGHT; TAKATA, 2017).

A localização mais comum do AMB convencional metastático é a mandíbula, seguido pela maxila, e acomete principalmente como uma lesão solida ou multicística. Os depósitos metastáticos são mais frequentes no pulmão ocorrendo em 70% dos casos, seguido pelos linfonodos em 28% dos casos, e no tecido ósseo em 12% dos casos. O diagnóstico pode ser feito, após a ocorrência de depósitos metastáticos. Geralmente é um longo período latente antes da metástase, e alguns casos ocorrem após repetidas intervenções cirúrgicas (ODELL;

TILAKARATNE, 2017). Para que o diagnóstico seja feito, as lesões primárias e metastáticas devem ter características histológicas do AMB benigno. Não há características específicas que predizem a metástase. Os AMBs metastáticos com atipia significativa são considerados carcinomas ameloblásticos. A taxa global de sobrevida é de 5 anos em 70%, dos casos a sobrevivência depende do local de metástase e da acessibilidade cirúrgica. Radioterapia e a quimioterapia não tem benefício comprovado (GILJAMSE et al., 2007; JAYARAJ et al., 2014; ODELL; TILAKARATNE, 2017).

Estudos biomoleculares têm sido realizados com o AMB em geral por meio da investigação de proteínas relacionadas com o crescimento celular (KUMAMOTO; OOYA, 2007; VERED et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010; AMARAL et al., 2012), proteínas envolvidas com a matriz extracelular e sua degradação (FREITAS et al., 2009; HENRIQUES et al., 2009), proteínas relacionadas com a angiogênese (ALAEDINI et al., 2009) e proteínas relacionadas a apoptose (WANG, Y.; WANG, J.; LI, G, et al., 2006), dentre outras. De uma maneira geral, os estudos confirmam o grande potencial de agressividade do AMB em sua evolução.

2.1.3 Tumor Odontogênico Adenomatóide

O TOA foi descrito pela primeira vez no ano 1905 por Steensland como uma lesão hamartomatosa não invasiva, dois anos depois, Dreibladt descreveu a lesão como um pseudoameloameloblastoma (JING et al., 2007). Vários termos como adenoameloblastoma, tumor adenomatóide ameloblástico, adamantinoma, e odontoma teratomatosos foram usados antes de TOA (RICK, 2004). Em 1969, Philipsen e Birn propuseram o termo TOA e caracterizaram esta lesão como uma entidade patológica distinta, considerando as suas características clínicas e comportamento biológico distintamente daquele tipicamente evidenciado nos AMBs (IDE et al., 2013). Essa denominação foi aceita e tem sido utilizada pela OMS desde a primeira classificação de TOs (PINDBORG; KRAMER, 1971), até a classificação atual (EL-NAGGAR et al., 2017).

Apesar de haver evidências de que as células tumorais são derivadas do epitélio do órgão do esmalte, os investigadores também sugerem que a lesão surja dos remanescentes da lâmina dentária (NEVILLE et al., 2016). Alguns estudos têm sido realizados visando obter maiores subsídios para esclarecer a patogênese desta lesão bem como seu comportamento biológico (ANDRADE et al., 2008; PREMALATHA et al., 2013), uma vez que, embora originando-se de epitélio odontogênico como o AMB, o TOA apresenta comportamento clínico e biológico indolente (IDE et al., 2013).

Os TOAs representam menos de 5% de todos os TOs. E 87% de todos os casos ocorrem na segunda ou terceira década de vida. Cerca de dois terços de todos os casos ocorrem em adolescentes e acometem cerca de duas vezes mais indivíduos do sexo feminino. Os tumores que ocorrem em pacientes com mais de 30 anos são claramente incomuns (HANDSCHEL et al., 2005; PHILIPSEN; NIKAI, 2005; WRIGHT; KUSAMA, 2017).

Há considerável evidência da ocorrência desta lesão nas regiões anteriores dos ossos gnáticos, sendo encontrado duas vezes mais na maxila do que na mandíbula (NEVILLE et al., 2016). Esta lesão apresenta um crescimento lento e natureza geralmente assintomática, sendo tolerado seu crescimento por anos por parte dos pacientes, por vezes causando uma deformidade e desconforto significativo.

Existem duas variantes conhecidas dos TOAs baseadas em achados clínicos e radiográficos, 1) a variante intraóssea ou central a qual é subdividida em dois subtipos: folicular e não folicular. O subtipo folicular é o mais comum, geralmente envolve um dente incluso em particular os caninos, que juntos respondem por 60% dos casos; os caninos superiores sozinhos são responsáveis por 40%, sendo muitas vezes confundida com um cisto dentífero (PHILIPSEN et al., 1991; RICK, 2004). O subtipo não folicular acredita-se que surge da ausência do dente no arco dentário. 2) a variante periférica ou extra-óssea, surge como um fibroma gengival, quase exclusivamente na gengiva maxilar anterior (DAYI et al., 1997; HANDSCHEL et al., 2005).

As características radiográficas dos TOAs intraósseos, apresentam uma imagem radiolúcida unilocular com limites bem definidos, contornando a coroa de um dente incluso (variante folicular), formando uma imagem indistinguível de um cisto dentífero, causando frequentemente deslocamento dos dentes, mas a reabsorção radicular é rara. (LEE et al., 2013; LI et al., 2013; WRIGHT; KUSAMA, 2017). Radiopacidades em torno do dente incluso podem ser encontradas no TOA e são considerados como um achado característico da lesão (REICHART; PHILLIPSEN, 2004; RICK, 2004). Cerca de 70% das imagens radiográficas dos TOAs possuem essa característica (HANDSCHEL et al., 2005; REICHART; JUNDT, 2008).

A histopatologia do TOA é caracterizada por uma lesão frequentemente encapsulada, existindo uma variedade de padrões arquiteturais representado por uma proliferação de células cúbicas ou colunares formando ninhos de epitélio odontogênico ou estruturas semelhantes a roseta contendo espaços pequenos e na porção central das rosetas pode conter material eosinófilo amorfo com um estroma mínimo de tecido conjuntivo. Observa-se estruturas semelhantes a ductos revestidos por células epiteliais cúbicas ou colunares que mostram núcleos com polaridade inversa (PHILIPSEN et al., 1991; PHILIPSEN; REICHART, 1999,

PHILIPSEN; NIKAI, 2005; WRIGHT; KUSAMA, 2017). O mecanismo de formação dessas estruturas tubulares não está inteiramente claro, mas é provável que seja o resultado da atividade secretória das células tumorais, que parecem ser pré-ameloblastos. Pequenos focos de calcificação também podem estar dispersos por todo o tumor. Eles têm sido interpretados como uma formação abortiva do esmalte. Alguns TOAs contêm áreas maiores de material de matriz ou de calcificação. Esse material tem sido interpretado como dentinóide ou cimento. (KRAMER et al., 1992; PHILIPSEN; REICHART, 1999; DE MATOS et al., 2012; NEVILLE et al., 2016)

O TOA, devido à presença de uma cápsula espessa, pode ser facilmente enucleado do osso. O comportamento agressivo não foi documentado, tão pouco recidiva após a enucleação, porém as recorrências são extremamente raras (NEVILLE et al., 2016; WRIGHT; KUSAMA, 2017).

2.2 GENES SUPRESSORES DE TUMORES (INGs)

Os genes supressores de tumores são reguladores negativos da formação de tumores. Embora suas funções antitumorais tenham sido bem estudadas, descobriram-se que também estão envolvidas em respostas imunes e imunidade inata. Investigadores sugerem que TSGs podem estar envolvidos no desenvolvimento dos TOs através de alterações no controle da proliferação celular (KUMAMOTO et al, 2009). Em 1996, as proteínas inibidoras de crescimento INGs foram classificadas como genes supressores de tumores (TSG) do tipo II com base em resultados de experimentos, usando uma estratégia de isolamento do gene tumoral baseado em hibridação in situ que envolvia DNA de células epiteliais normais e células cancerígenas (GARKAVTSEV et al.,1996; UNOKI; KUMAMOTO; HARRIS, 2009).

Inicialmente foi identificado o ING1, e posteriormente após várias investigações de homologia se identificou quatro candidatos TSG, que foram nomeados ING2, ING3, ING4 e ING5. Porém foram destacados como uma família porque estes membros compartilhavam entre 32% e 76% de homologia de sequência de DNA. Os membros da família ING são altamente conservados, evoluindo desde leveduras até seres humanos (HE et al., 2005). As análises filogenéticas mostraram que os membros da família INGs estão presentes em diversos organismos, incluindo, rã, peixe, ratos, sapos, moscas da fruta, vermes, fungos, plantas e leveduras, entre outros. Algumas leveduras compartilham semelhanças com INGs humanos (GUÉRILLON et al., 2014; TALLEN et al., 2014).

As proteínas INGs, em mamíferos e humanos são codificadas pelo menos, por cinco loci diferentes, ING1, ING2, ING4 e ING5, estão localizados em regiões muito próximas das

extremidades de seu respectivo cromossomo (perto de telômeros), dos quais ING1, ING2 e ING4 tem splicing alternativo de exóns, gerando múltiplas isoformas da proteína, e ING5 que é o mais próximo do terminal cromossômico pode ser afetado pela degradação telomérica que ocorre com o envelhecimento celular e durante a geração do tumor, o que sugere a possibilidade da alteração de seus níveis de expressão observados em muitos tipos de cânceres (RUSSELL et al., 2006; YTHIER et al., 2008). Em contraste, ING3 constitui um ramo distinto porque está localizado no meio do braço longo do cromossomo 7 (7q31), e sua sequência de aminoácidos é a mais distinta entre as cinco proteínas INGs de forma evolutiva. Além disso, o ING3 tem o maior peso molecular da família e desempenha papéis únicos como as funções de desenvolvimento na estrutura da cromatina (HE et al., 2005; GUÉRILLON et al., 2014; TALLEN et al., 2014).

2.2.1 Estrutura e função das proteínas INGs

Todos os genes INGs codificam muitas variantes de proteínas (Figura 1). Estruturalmente todas as proteínas INGs estão compostas por um domínio C-terminal altamente conservado e uma região N-terminal a qual é muito variável. O domínio característico dos ING é o Domínio Homeostático de Planta (PHD = Plant HomeoDomain). Este domínio interage com proteínas normalmente associadas a remodelação de cromatina e foi caracterizado como um domínio de ligação com uma alta afinidade para o domínio N-terminal da histona 3 trimetilada em lisina 4 (H3K4me3), o que sugere uma conexão de ING com modificações epigenéticas, e uma afinidade mais fraca para H3K4 mono ou dimetilada (PENA et al., 2008; YTHIER et al., 2008).

Todas as proteínas INGs possuem pelo menos um sinal de localização nuclear (NLS) e, portanto, estão localizadas principalmente no núcleo onde exercem sua função celular concentrando-se durante alguns processos no nucléolo (onde o DNA é transcrito produzindo RNA ribossômico e ocorrem certos processos de reparo do DNA), mas também podem estar presentes no citoplasma quando ocorre uma sobre expressão dessas proteínas. Conjuntamente foi descrito a localização do ING4 no citoplasma, especificamente nos pseudópodes, atuando como regulador da propagação e migração celular através da sua interação com a proteína lipase citoplasmática $\alpha 1$. Além disso, o direcionamento dessas proteínas para o núcleo depende de algumas modificações pós-tradução (PTMs), como a fosforilação. Nas proteínas ING1 e ING2, o domínio NLS contém 3 possíveis sequências de transporte nucleolar (NTS). O papel destas proteínas no nucléolo foi descrito em alguns papéis através da interação com proteínas, como no caso do Antígeno Nuclear Celular Proliferante (PCNA) após o dano do DNA (SCOTT et al.,

2001), que afeta a parada do ciclo celular (BUNCE et al. 2006). Na região N-terminal estão as regiões que dão especificidade a cada membro da família ING. Observa-se uma nova região conservada (NCR) que foi proposta como um motivo de ligação a diferentes complexos HAT (Histona Acetil-transferase) e HDAC (Histona Desacetase) (FENG et al., 2002; KUZMICHEV et al., 2012; DOYON et al., 2006).

Estudos recentes sugere que NCR interage com a proteína de membrana nuclear laminina A, para ING1-4, mas não para ING5, e posteriormente foi chamado de domínio de interação laminina (LID). Além disso, descreveu-se para interagir com PCNA para ING2 e com mSin3a para ING1 e ING2 (GUÉRILLON et al., 2014). Alguns membros da família ING, como p33ING2, p29ING4 e p28ING5, têm domínios denominados Leucine Zipper (LZL) que poderiam estar envolvidos em dimerização (RUSSELL et al., 2006). Um estudo descreveu que as proteínas ING1 e ING2 podem interagir com fosfoinosítídeos, especificamente PtdIns-5-P (PIP), através de uma região polibásica (PBR) em condições de estresse celular após o dano do DNA (GOZANI et al., 2003).

Figura 1 - Estrutura esquemática dos diferentes membros da família de proteínas ING.



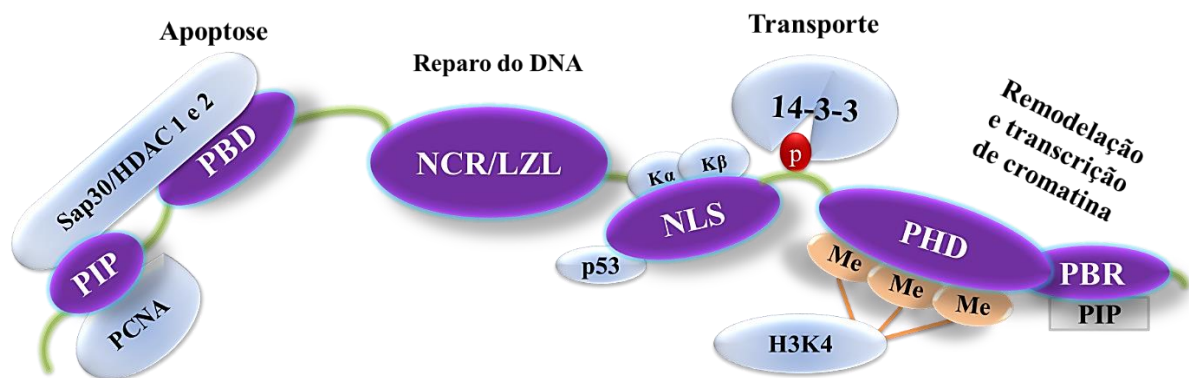
Fonte: (Adaptado do COLES; JONES 2009).

Legenda: As proteínas ING são homologas e todas possuem um PHD, um NLS e um NCR, estão filogenicamente e estruturalmente intimamente relacionados e compartilham uma identidade significativa. NCR: Nova região conservada; NLS: Sinal de localização nuclear; PHD: Domínio homeostático de planta. PBR: Região polibásica; LZL: domínio de Zipe de Leucina; PIP; Domínio de interação com a PCNA.

As interações das proteínas INGS através do ciclo celular iniciam através da ativação pela ligação com os fosfoinosítídeos, especificamente PtdIns-5-P (PIP), este domínio interage com PCNA e promove replicação, reparo do DNA e apoptose. O PBD e NCR / LID se liga a SAP30 (Proteína 30KDA associada a SIN3A), HAT e HDAC para regular suas atividades. O

domínio LZL é necessário para o reparo do DNA e indução de apoptose. O NLS se liga as proteínas karyopherin- α e β para direcionar e transportar as proteínas INGs para seu local funcional, o núcleo. Além disso as proteínas INGs através de seu PHD, atuam como sensores sensíveis à histona 3 trimetilada em lisina 4 (H3K4me3), regulando a transcrição e os genes alvo. Portanto, eles são considerados como "leitores" do código epigenético. Tanto PHD como PBR se ligam a PtdIns-5P, sugerindo que o PBR também pode estar envolvido no regulamento da remodelação e transcrição da cromatina (Figura 2).

Figura 2 - Principais funções e interações dos domínios das proteínas INGs.



Fonte: (Adaptado do SOLIMAN, M. A; RIABOWOL K, 2007 ; AGUISSA-TOURÉ et al., 2011).
 Legenda: durante a ativação do ciclo celular as ligações importantes dos domínios dos genes INGs como: PIP, PBD, NCR/LID, LZL promove apoptose e reparo do DNA. PBD e NCR/LID ligam-se a SAP30 para regular suas atividades. NSL interage para direcionar as proteínas no núcleo e PHD como PBR desempenham um papel importante na remodelação e transcrição da cromatina.

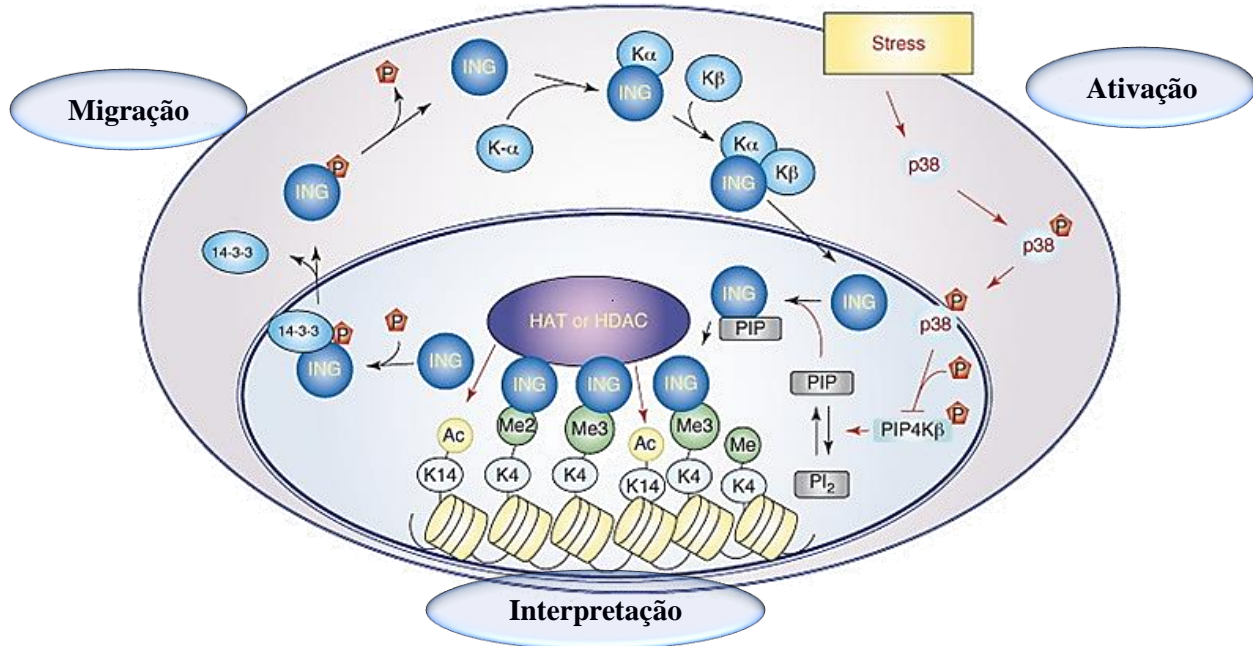
Avaliações recentes discutiram as ramificações da família ING como de receptores fosfoinositídeos (BUNCE et al., 2006). A interação ING-PIP têm um papel importante na mediação de uma variedade de processos biológicos, incluindo a resposta ao estresse e funções celulares essenciais. Historicamente, pensou-se que os PIPs eram sintetizados e metabolizados no citoplasma, no entanto, uma infinidade de dados mais recentes suporta que os PIPs também residem no núcleo onde eles têm papéis essenciais na função celular normal (SOLIMAN, M. A; RIABOWOL K, 2007; AGUISSA-TOURÉ et al., 2011).

Todas as proteínas INGs interagem através do ciclo celular após várias fases (Figura 3).
 1) ativação: quando ocorre exposição ao estresse celular (intra ou extracelular) o p38MAPK (Proteína quinase ativadas por mitógeno) é ativado e transladado para o núcleo onde ele fosforila PIP4K β (fosfatidilinositol-5-fosfato 4- quinase tipo beta 2), inibindo assim sua atividade de quinase e aumentando os níveis de PIP nuclear. PIP subsequentemente liga-se a

proteínas INGs recrutando-as para a cromatina e o reconhecimento da histona H3K4me3 por as proteínas INGs resulta na formação de complexos HDAC ou HAT. 2) interpretação: nesta fase as proteínas INGs ligam-se especificamente ao H3K4me2 / 3 recrutando os complexos de remodelação de cromatina associados a INGs para regiões exclusivas, possivelmente, loci genéticos específicos. Isso leva a distintas PTMs de histonas, tais como acetilação e desacetilação, levando a diferentes resultados biológicos, como apoptose, parada do ciclo celular ou reparo do DNA. 3) Migração: após a realização das modificações de histonas por complexos HAT e HDAC, as proteínas INGs são removidas e / ou inativadas por diferentes PTMs, através de ligação dependente de fosforilação onde as proteínas 14-3-3, conduzem a translocação citoplasmática, enquanto que a desfosforilação libera aos INGs das proteínas 14-3-3, promovendo assim a ligação dos INGs às proteínas de karyopherin (α ou β) que transportam as proteínas INGs de volta ao núcleo. Uma população de proteínas INGs é consistente no citoplasma, interagindo assim com a proteína lipina $\alpha 1$ para regular a propagação e migração celular (TALLEN et al., 2014; SOLIMAN, M. A; RIABOWOL K, 2007)

Estudos têm demonstrado que a nova família de genes supressores de tumores denominada ING tem sido associada ao controle do ciclo celular, senescência, apoptose, replicação e reparo do DNA. Assim, a perda ou diminuição da expressão do ING pode ser um ponto chave na tumorigênese (COLES et al., 2009; LI; KIKUCHI; TAKANO, 2011). A inativação e redução da expressão de genes ING geralmente ocorrendo no nível de RNA, tem sido relatada em câncer humanos, do pulmão (KAMEYAMA et al., 2003), de mama (NOUMAN et al., 2003), do estômago (OKI et al., 1999; LI et al., 2009), do esôfago (CHEN et al., 2001), do cérebro (VIEYRA et al., 2003), e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (LI et al., 2010). No total, os INGs também podem funcionar como genes supressores de tumores Tipo I, ou "cuidadores"(GUÉRILLON et al., 2014). A grande maioria dos estudos citados anteriormente caracterizaram os níveis de ING no contexto do câncer. No entanto, foi dada relativamente pouca atenção à expressão dos membros da família INGs em tumores benignos ou outros contextos (MAHER et al., 2009).

Figura 3 - Ativação, interpretação e migração da família ING.



Fonte: (Adaptado do SOLIMAN, M. A; RIABOWOL K, 2007)

Legenda: Interação das proteínas INGs após estresse celular, onde ocorre a ativação e translocação de p38 para o núcleo e se liga a PIP4K β (fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinase tipo beta 2), os níveis de fosfoinosítídeos são aumentados e ligam-se a proteínas INGs para exercer diferentes funções junto as histonas 3 trimetilada em lisina 4 (H3K4me3) e os complexos HAT e HDAC, leva a distintas PTMs modificações pós-tradução, como a fosforilação e desfosforilação, que geram a migração das proteínas ING para o citoplasma, assim como também de volta para núcleo.

2.2.2 Papel funcional da família INGs em conexão com P53

As proteínas INGs estão conectadas funcionalmente com o gene p53, o qual ocupa um lugar de destaque dentro do grupo dos TGSs, isto se deve, em grande parte, ao fato de que alterações tanto no gene, com na respectiva proteína, representam os achados mais frequentes nos cânceres humanos (VOUSDEN; LU, 2002). A proteína p53 tem um papel importante no controle da expressão de genes que inibem a proliferação celular (DE OLIVEIRA et al., 2008). O gene p53 regula a resposta celular ante estímulos internos ou externos, tais como danos no DNA, ativação de oncogênes, hipóxia, encurtamento dos telômeros, etc. A resposta mediada por este gene, pode provocar uma parada do ciclo celular temporariamente ou permanentemente, induzindo a senescência e outros processos tais como a apoptose, a inibição da angiogênese ou da reparação do DNA, prevenindo a iniciação da tumorigênese (VOUSDEN, 2007).

A proteína p53 permanece inativa até receber alguns estímulos, que podem gerar sua estabilização e ativação funcional. Atualmente se conhecem diferentes modificações pós-

tradução que p53 sofre, causando: fosforilação, mutilação, acetilação, ubiquitinação ou sumoilação (RYAN et al., 2001).

Numerosas evidências sugerem a existência de um relacionamento funcional entre proteínas INGs e o gene p53. Tem sido relatado que todos os membros da família das proteínas INGs exceto, ING3, são capazes de interagir fisicamente com p53 (GARKAVTSEV et al., 1998).

Os membros da família INGs estão envolvidos na estabilidade de p53 e melhoram a acetilação de seus resíduos de lisina na extremidade C-terminal da proteína. O ING e p53 cooperam como cofatores de transcrição envolvidos em mecanismos de supressão do tumor. Isto torna a determinação do papel da família INGs em determinados processos dependentes de p53, como apoptose, parada do ciclo celular ou senescência induzida por stress oncogênico (HELBING et al., 1997; GARKAVTSEV et al., 1998; KATAOKA et al., 2003; GONZALEZ et al., 2006). Nestes processos de cooperação entre ambos supressores de tumores contra estímulos oncogênicos estimulam a prevenção da progressão para a tumorigênese (YTHIER et al., 2008). No entanto, vários estudos têm sugerido que as proteínas INGs podem ter diferentes funções celulares independentemente de p53, neste contexto se destacam as proteínas ING3 e ING4 (TSANG et al., 2003; COLES et al., 2009).

2.3 ING3

O gene ING3 está localizado no meio do braço longo do cromossomo 7 (7q31) é composto por 12 exóons e produz três proteínas, dentre as quais o p47ING3 tem sido associado com a modulação da transcrição mediada por p53, controle do ciclo celular e apoptose (NAGASHIMA et al., 2003). Entretanto, Coles e Jones (2009), afirmam que embora a associação física com o p53 seja necessária para a função dos outros membros ING, ING3 não parecem interagir com p53. Nas células de melanoma, uma superexpressão de ING3 promoveu a apoptose induzida por raios ultravioletas (UV) através de uma via Fas/caspase-8-dependente de uma maneira independente de p53 (WANG; CHIN; LI, 2006). ING3 tem sido relatado como sendo um supressor de tumor em melanoma e carcinoma de células escamosas (WANG et al., 2007; GUNDUZ et al., 2008). Baixos níveis de mRNA do ING3 pode indicar um padrão agressivo do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (WANG et al., 2007). No melanoma, expressão nuclear de ING3 é reduzida e pode ser um fator prognóstico independente (GUNDUZ et al., 2005).

Investigações recentes relatam presença de perda de heterozigosidade, encontrada na região 7q31 do ING3 para respectivamente, 98% e 48,2% dos pacientes que sofrem carcinomas de

células escamosas de cabeça e pescoço e AMB (BORKOSKY et al., 2010). Além de uma análise Northern Blot dos níveis de RNA, ING3 em tecidos humanos a expressão de ING3 em tecidos normais humanos não tinha sido relatada (NAKASHIMA et al., 2003). Atualmente GOU et al. (2017) investigaram o perfil imuno-histoquímico de ING3 em tecidos normais e cancerígenos e observaram o mRNA de ING3 onipresente em tecidos humanos normais, incluindo testículos, músculo esquelético, baço coração e mucosa oral. Observaram que a Proteína ING3 foi distribuída principalmente no citoplasma; no entanto, observou-se tanto no citoplasma quanto no núcleo da língua, esôfago, estômago, intestino, pulmão, pele, apêndice, bexiga, colo do útero e células mamárias.

2.4 ING4

O gene ING4 está localizado na banda 13 no braço curto do cromossomo 12 (12p13.31) e é composto por 8 exóons que codificam para uma proteína de maior expressão nuclear e menor expressão citoplasmática (HE et al., 2005). ING4 está envolvido, direta ou indiretamente, na remodelação da cromatina, regulação da migração e propagação celular, inibição da proliferação celular, indução do apoptose e parada do ciclo celular. Esta proteína ao igual que os outros membros da família ING, tem uma expressão significativamente reduzida em células tumorais em comparação com células normais. A perda de heterozigosidade em 12p13 foi relatada em cânceres, como neoplasias hematológicas, câncer de ovário e câncer de próstata (KAWANA et al., 2002). Além disso, a perda de heterozigosidade e exclusão do lócus de ING4 foram encontradas no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e câncer de mama, respectivamente (GONDUZ et al., 2005).

Após ING1, o ING4 é o gene ING mais investigado em tumores (YTHIER et al., 2008). Estudos funcionais do ING4 sugerem que este gene possui uma função a mais, além das funções comuns das proteínas ING; ele poderia desempenhar um papel completamente diferente na tumorigênese. O gene ING4 pode estar envolvido na prevenção da disseminação e migração, bem como na angiogênese tumoral. A inibição da angiogênese por ING4 ocorre através da sua interação com a subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B, um fator de transcrição que ativa genes proangiogênicos. A interação inibe NF- κ B e com ela, a vascularização do tumor e seu crescimento. (YTHIER et al., 2008; GARKAVTSEV et al., 2004; SHEN et al., 2007).

Os níveis baixos de expressão de ING4 foram correlacionados com tumores de alto grau e desfecho de pacientes pobres em neoplasias malignas, incluindo melanoma, adenocarcinoma gástrico e carcinoma hepatocelular (GARKAVTSEV et al., 2004; LI et al., 2009). Assim, o

ING4 parece ser desativado por vários mecanismos de câncer e pode desempenhar um papel como supressor de tumor em vários tipos de câncer em diferentes tipos de tecidos (TAPIA et al., 2011).



Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo propôs avaliar e comparar a imunoexpressão das proteínas ING3 e ING4 em uma série de casos de CO, AMB e TOA no intuito de esclarecer a influência destas proteínas no comportamento biológico distinto dessas lesões.



Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização do estudo, este projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e submetido à análise do seu conteúdo pelo Comitê Central de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), de acordo com a resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O presente projeto obteve aprovação mediante o parecer nº 1.277.582 (ANEXO A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho consistiu em um estudo transversal e retrospectivo com análise descritiva, semi-quantitativa e comparativa da imunexpressão das proteínas ING3 e ING4, em espécimes de CO, AMB e TOA.

4.3 POPULAÇÃO

A população do estudo esteve constituída pelos casos de CO, AMB e TOA diagnosticados e armazenados nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi do tipo intencional e não-probabilística, por conveniência, constituída por 55 casos de lesões odontogênicas, assim distribuídos: 20 Cos, 20 AMBs e 15 TOAs, todos emblocados em parafina, diagnosticados no serviço de Anatomia Patológica da disciplina de patologia oral do Departamento de Odontologia da UFRN.

4.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.5.1 Critérios de inclusão

De uma maneira geral, como critérios de inclusão nas amostras foram considerados os seguintes aspectos: (1) quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina arquivado; (2) condições de armazenamento do espécime tecidual incluído em parafina. Tais critérios viabilizaram a realização da técnica de coloração pela imuno-histoquímica dos referidos casos. Além desses critérios, foram considerados os aspectos morfológicos determinantes para o diagnóstico histopatológico das lesões odontogênicas epiteliais benignas estabelecidos pela última classificação da OMS de 2017 (EL-NAGGAR et al., 2017).

4.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, todos os casos das lesões selecionadas que haviam sido submetidas ao processo de descalcificação, considerando que este interfere na antigenicidade do material.

Foram excluídas as amostras casos cujos prontuários não apresentavam os dados necessários para a realização do estudo clínico-patológico, assim como os casos de COs e AMBs submetidos à técnica de marsupialização previamente à biópsia.

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para o estudo morfológico foram utilizadas lâminas histológicas contendo cortes de 5µm de espessura, corados pela técnica de rotina Hematoxilina/Eosina do material emblocados em parafina e examinado sob microscopia de luz (microscópio Olympus CH30, Olympus Co.; Ltd., Japão). Foram descritos os aspectos referentes aos padrões característicos dos componentes epiteliais e mesenquimais observados nas lesões objeto da presente pesquisa.

4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.7.1 Técnica imuno-histoquímica

Todas as amostras selecionadas, fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina, foram submetidas a cortes histológicos de 3µm de espessura que foram estendidos em lâmina de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxysilano, Sigma Chemical CO, USA). Posteriormente, os espécimes foram submetidos a técnica da estreptoavidina-biotina (SABC, streptoavidin-biotincomplex) utilizando anticorpos anti-ING3, anti-ING4, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Clone, especificidade, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados (Fabricante: Abcam, Cambridge, USA; Novus Biologicals, Littleton, USA; Thermo Fisher Scientific Inc).

CLONE	ESPECIFICIDADE	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	INCUBAÇÃO
30330002 Policlonal	ING3	1: 4000	Citrato de sódio 10 mM pH 6.0 panela pascal, 30 minutos	Overnight a 4°C
NBP2-33828 Policlonal	ING4	1:4000	Citrato de sódio 10 mM pH 6.0 panela pascal, 30 minutos	Overnight a 4°C

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

4.7.2 Coloração pelo método imuno-histoquímico

A técnica utilizada foi realizada conforme aos passos a seguir:

- 1) Desparafinização: realizada com 2 banhos em xilol, sendo o primeiro banho à temperatura de 60°C, durante 30 minutos e, o segundo, à temperatura ambiente por 20 minutos;
 - Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto IV (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- 2) Imersão em solução de Hidróxido de Amônia a 10% durante 10 minutos, à temperatura ambiente, para remoção do pigmento formólico;
- 3) Lavagem do material em água corrente por 10 minutos e duas passagens por água destilada deionizada (5 minutos cada);
- 4) Recuperação antigênica (Quadro 01);
- 5) Lavagem em água corrente (10 minutos);
- 6) Duas imersões rápidas em água destilada, com tempo de 5 minutos cada; Duas incubações dos cortes, pelo período de 15 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes em uma proporção de 1/1 para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- 7) Lavagem em água corrente durante 10 minutos;
- 8) Imersão em água destilada duas vezes, com tempo de 5 minutos cada;
- 9) Duas imersões em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada;
- 10) Incubação dos cortes com anticorpos primários diluídos em solução BSA a 1% em TRIS-HCl pH 7,4;
- 11) Duas passagens em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 12) Incubação com anticorpo secundário com ADVANCETM HRP enzime (Dako North América Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- 13) Duas passagens em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 14) Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina (DAKO, A/S, Glostrup, Denmark) na diluição de 1/100, durante 30 minutos à temperatura ambiente;
- 15) Duas incubações em TRIS-HCl por 5 minutos cada;

- 16) Aplicação do agente cromógeno de diaminobenzidina (DAB), durante 3 minutos, diluído em TRIS-HCl pH 7,4 e ativado pelo peróxido de hidrogênio 10 volumes a 0,3%;
- 17) Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 18) Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- 19) Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente durante 10 minutos;
- 20) Lavagem em água corrente (10 minutos);
- 21) Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
- 22) Álcool etílico 80°GL (3 minutos);
- 23) Álcool etílico 95°GL (3 minutos);
- 24) Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- 25) Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- 26) Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- 27) Imersão em xilol I (5 minutos);
- 28) Imersão em xilol II (5 minutos);
- 29) Montagem da lâmina contra a lâmina em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA) para observação em microscópio de luz.

Para o controle positivo das reações foram utilizados espécimes de hiperplasia fibrosa inflamatória. Por sua vez, o controle negativo desses anticorpos foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por albumina de soro bovino a 1% (BSA – *Bovine Serum Albumin*), em solução tampão.

4.7.3 Análise imuno-histoquímica

As lâminas submetidas a técnica imuno-histoquímica foram examinadas em estudo duplo-cego de forma semi-quantitativa, por 2 avaliadores previamente calibrados, em cada caso estudado, foram analisados os aspectos relacionados com os anticorpos empregados em células epiteliais odontogênicas e os dados coletados serão anotados em fichas individualizadas e posteriormente tabulados.

Para isso, as lâminas imunomarcadas foram digitalizadas pelo Scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH Kft 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary) e as imagens obtidas foram observadas através do software Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH Kft 29-33, Konkoly-Thege M. str. Budapest, Hungary). Com o auxílio desse programa, foi possível visualizar toda a extensão do espécime e identificar 5 campos representativos e aleatórios após

a identificação das áreas de maior imunoreatividade sob o scaler bar de 100 μ para cada um dos anticorpos avaliados.

Adicionalmente destacasse que para as proteínas ING3 e ING4 foi realizada a avaliação da imunexpressão nuclear e citoplasmática nas células do componente epitelial das lesões odontogênicas constantes do estudo. Posteriormente, cada caso foi categorizado de acordo com os seguintes escores preconizados por Wang et al. (2007) e Vered et al. (2009): 0- ausente; 1- (baixo) 1 a 10% de células positivas; 2- (intermediário) 11 a 50%; e 3- (alto) > 50%.

4.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Quadro 2 - Variáveis dependentes elencadas para os testes estatísticos.

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	CATEGORIAS
Imunomarcção citoplasmática das células epiteliais odontogênicas para as proteínas da família INGs (ING3 e ING4)	Qualitativa Ordinal	0- Ausência de células marcadas 1- 1 a 10% das células positivas 2- 11 a 50% das células positivas 3- > 50% das células positivas
Imunomarcção nuclear das células epiteliais odontogênicas para as proteínas da família INGs (ING3 e ING4)	Qualitativa Ordinal	0- Ausência de células marcadas 1- 1 a 10% das células positivas 2- 11 a 50% das células positivas 3- > 50% das células positivas

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Quadro 3 - Variáveis independentes elencadas para os testes estatísticos.

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	CATEGORIAS
Tipo Histológico do Tumor	Qualitativa nominal mutualmente exclusiva	1. Ameloblastoma 2. Ceratocisto 3. TOA

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com a análise imuno-histoquímica foram digitados originalmente em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®) e posteriormente exportados para o programa OriginPro 2016 (OriginLab Corporation®), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

Os dados obtidos com a avaliação dos índices de positividade para o ING3 e ING4 no componente epitelial (marcação citoplasmática e nuclear) das lesões, variável categórica ordinal, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, com o intuito de observar o tipo de distribuição em cada um dos grupos. Como os dados não apresentaram distribuição normal, a comparação das medianas dos escores de positividade para o ING3 e ING4 (marcação citoplasmática e nuclear) entre AMBs, COs e TOAs foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no teste de Kruskal-Wallis, adicionalmente foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação dos grupos dois a dois.

Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).



Resultados

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA ANALISE MORFOLÓGICA

Foram analisadas microscopicamente 55 lesões de origem odontogênica, sendo 20 casos de ameloblastoma, 20 casos de ceratocisto odontogênico e 15 casos de tumor odontogênico adenomatóide.

Tendo em vista as lesões odontogênicas epiteliais benignas na presente pesquisa, a análise microscópica dos casos de AMBs analisados exibiam um predominante padrão folicular apresentando ilhas de epitélio odontogênico com células periféricas, cuboidais ou colunares, com núcleos hipercromáticos, organizados em paliçada e polaridade reversa. Além disso a porção central apresenta células arranjadas frouxamente lembrando ao retículo estrelado do órgão do esmalte.

outro padrões de AMBs observados foi o do tipo plexiforme, composto por finos cordões anastomosados de epitélio ameloblastomatoso, circundado células epiteliais arranjadas frouxamente lembrando o reticulo estrelado do órgão do esmalte. Em alguns casos, houve associação do padrão plexiforme com a variante folicular. E em menor frequência observou-se casos da variante de AMBs unicístico, exibindo um epitélio simples com células semelhantes a ameloblastos revestindo uma cavidade patológica e por vezes com proliferação de células, organizadas frouxamente, para o interior do lúmen, caracterizando as variantes luminal e intraluminal respectivamente. O estroma de todos os padrões era de densidade variável com vasos sanguíneos de tamanhos e calibres variáveis e por vezes congestos.

Considerando os COs as características histopatológicas apresentadas eram típicas desta lesão, todos os casos apresentaram um revestimento epitelial escamoso estratificado paraceratinizado com uma camada superficial corrugada a espessura do epitélio era entre 5-8 camadas de células e notou-se um caraterístico desgarramento do epitélio. A camada basal é bem definida com células hipercromáticas organizadas em paliçada e a cápsula era fibrosa densa a maioria sem infiltrado de células inflamatórias.

Com relação aos espécimes de TOA, foi evidenciada a presença de uma capsula de tecido conjuntivo fibroso denso circundando a lesão. Observou-se áreas sólidas constituídas por células epiteliais do parênquima tumoral e escasso estroma. As células neoplásicas eram predominantemente cúbicas e ovais, exibindo estruturas espiraladas semelhantes a rosetas, assim como estruturas semelhantes a ductos, circundadas em sua maioria por células colunares e núcleo polarizado e observou-se ainda a presença de estruturas calcificadas.

2.2 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS.

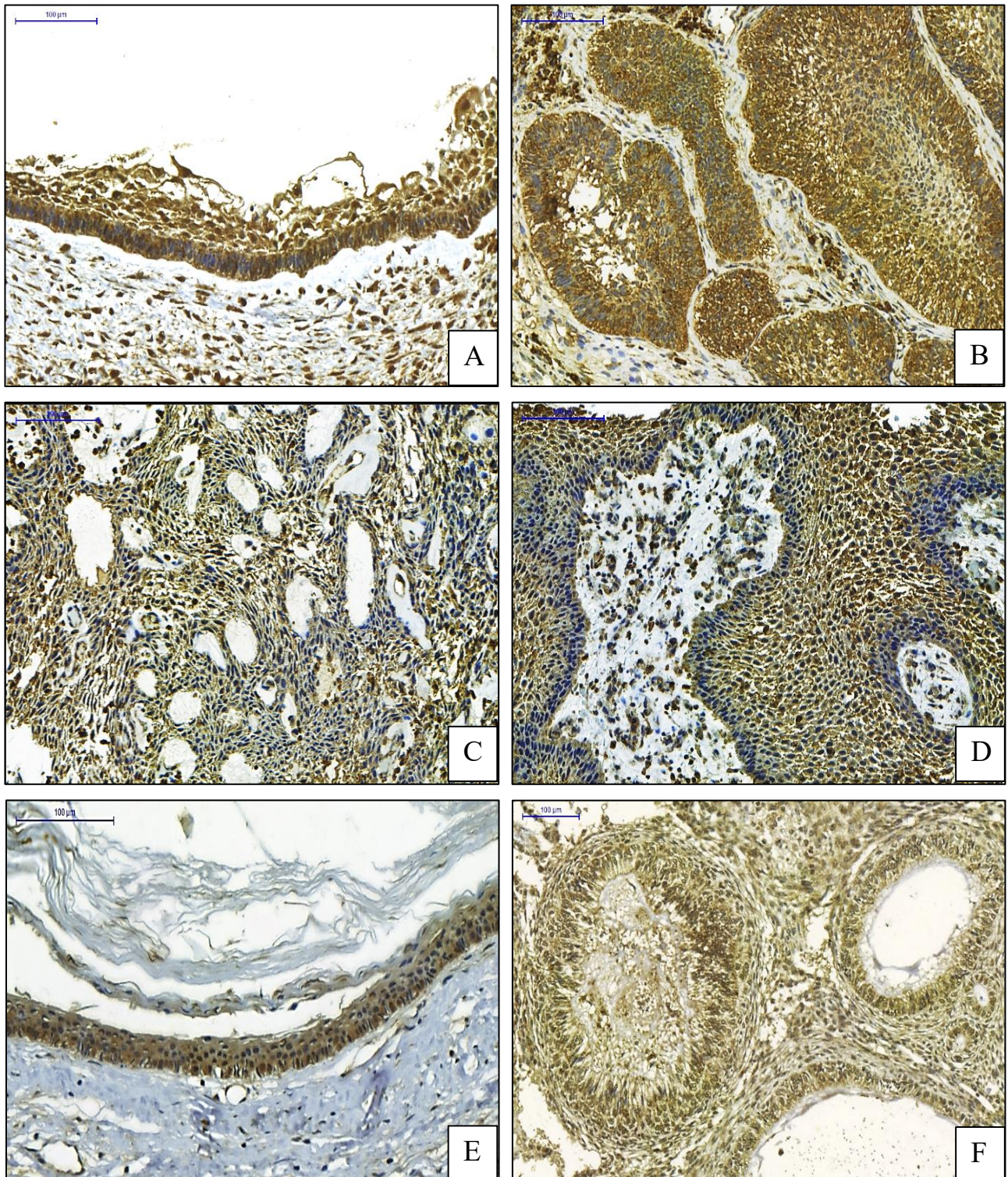
A presente amostra foi intencional e composta por 20 casos de COS, 20 de AMBs e 15 casos de TOAs. Todos os casos estudados apresentaram imunoreatividade para ING3 e ING4. A expressão dessas proteínas foi evidenciada ao observar uma marcação tipicamente citoplasmática em comparação com a expressão nuclear das células epiteliais, apresentando variações na expressão das lesões estudadas.

5.2.1 Análise da imunexpressão de ING3

A análise da imunexpressão de ING3 revelou positividade no citoplasma das células epiteliais em todos os casos de COs, AMBs e TOAs (Figura 4). Especificamente, no grupo dos AMBs, a maioria dos casos apresentou uma alta expressão, (Escore 3) (n = 11; 55%) seguido de uma expressão moderada (Escore 2) (n = 7; 35%) e baixa (Escore 1) (n = 2; 10%). No grupo dos COs, constatou-se que a proteína esteve expressa de maneira alta (Escore 3) (n = 12; 60%), seguido de uma moderada expressão (Escore 2) (n = 7; 35%) e uma baixa expressão (Escore 1) (n = 1; 5%). No grupo dos TOAs, foi observada uma predominância de marcação moderada (Escore 2) (n = 8; 53,3%), seguido por uma marcação alta (Escore 3) (n = 5; 33,3%) e uma baixa expressão (Escore 1) (n = 2; 13,3%). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis não revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação citoplasmática do ING3 entre os grupos analisados (Tabela 1) (Gráfico 1).

A análise da imunexpressão da proteína ING3 no núcleo das células epiteliais (Figura 5). Revelou no grupo dos AMBs uma baixa expressão (Escore 1) (n = 9; 45%) seguido de uma perda de expressão nuclear (Escore 0) (n = 6; 30%) e uma moderada expressão nuclear (Escore 2) (n = 5; 25%) numa minoria dos espécimes de AMBs. No grupo dos COs, constatou-se de igual forma maior frequência de uma baixa expressão nuclear (Escore 1) (n = 8; 40%), seguido de uma ausência de expressão nuclear (Escore 0) (n = 5; 25%), além disso houveram casos com expressão nuclear alta (Escore 3) (n = 4; 20%) e constatou-se uma expressão moderada do (Escore 2) (n = 3; 15%). No grupo dos TOAs, foi observada uma predominância dos escores 1 (n = 4; 26,6%), 2 (n = 4; 26,6%) e 3 (n = 4; 26,6%), seguido por ausência de expressão nuclear (Escore 0) (n = 2; 13,3%). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis não revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação nuclear do ING3 entre os grupos analisados (Tabela 2) (Gráfico 2).

Figura 4 – Expressão imuno-histoquímica da proteína ING3 no citoplasma das células de AMB, CO e TOA.



Legenda: A – Imunomarcção para a proteína ING3 em AMB unicístico: alta e citoplasmática (IHQ, 100X); B – Ameloblastoma padrão folicular: marcação citoplasmática alta nas ilhas das células tumorais (IHQ, 100X); C – Imunomarcção citoplasmática alta no AMB padrão plexiforme (IHQ, 100X) D – Maior aumento da Figura 1: marcação difusa entre os arranjos tumorais (IHQ, 200X); E – Imunomarcção alta e citoplasmática no revestimento epitelial do CO (IHQ, 100X); F – TOA : marcação citoplasmática moderada-alta nas células do parênquima tumoral (IHQ, 100X).

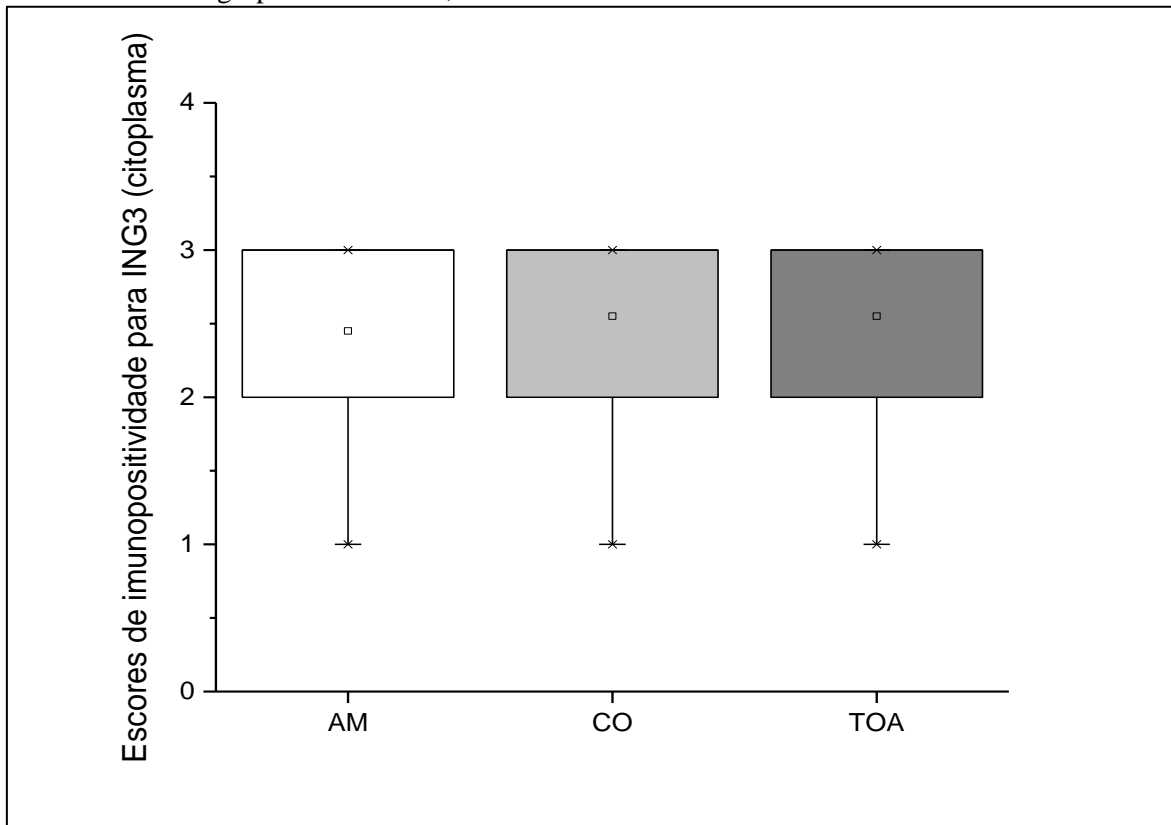
Tabela 1 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING3 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	H	P
AM	20	3,00	2,00 – 3,00	29,15	0,2363	0,888
CO	20	3,00	2,00 – 3,00	31,175		
TOA	15	3,00	2,00 – 3,00	31,175		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

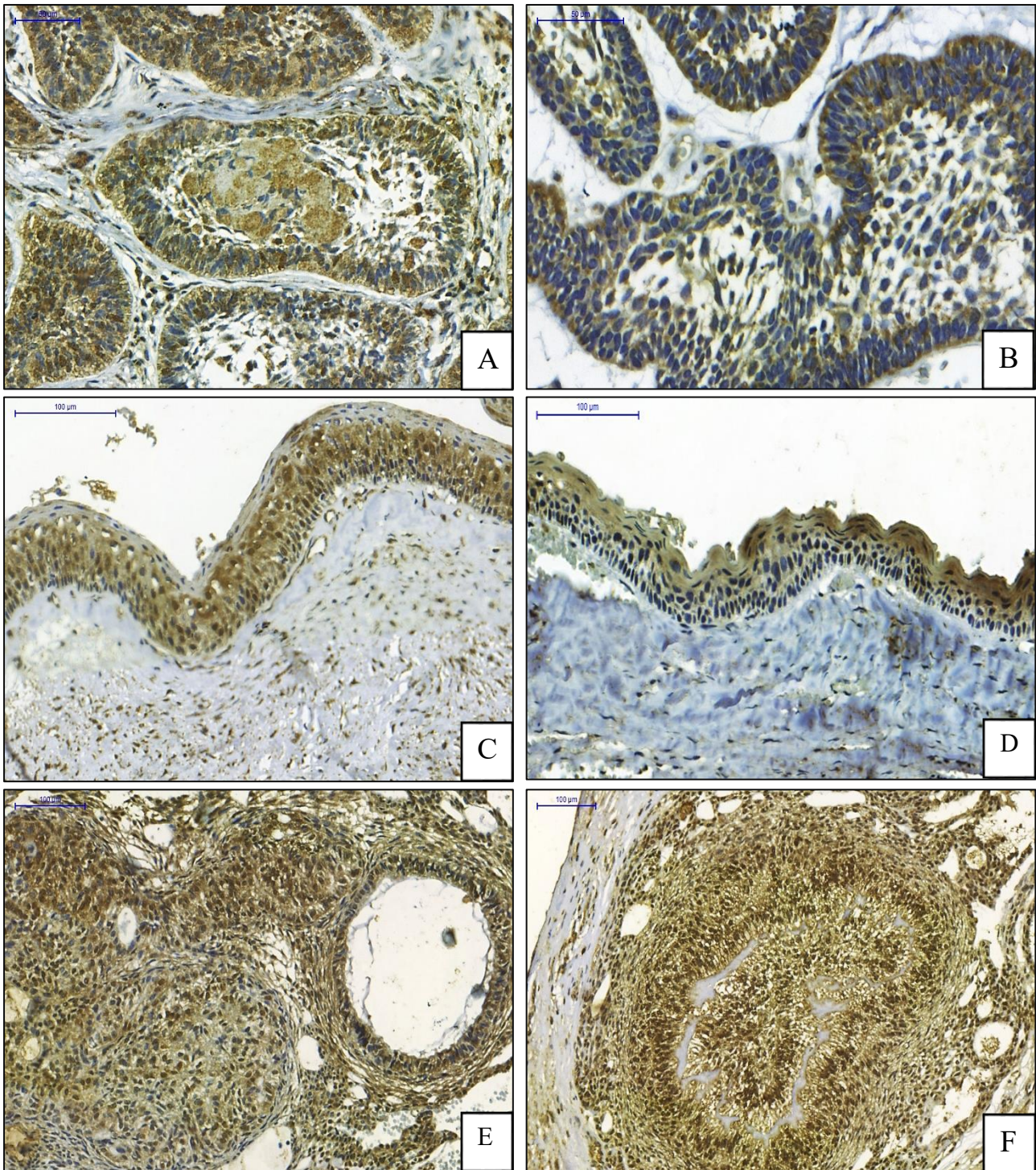
Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; H - Coeficiente de Kruskal-Wallis.

Gráfico 1 - Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING3 (marcação citoplasmática) de acordo com os grupos. Natal – RN, 2018.



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Figura 5 – Expressão imuno-histoquímica da proteína ING3 no núcleo das células de AMB, CO e TOA.



Legenda: A – Imunomarcção para a proteína ING3 em AMB observando uma baixa expressão nuclear (IHQ, 100X); B – Perda da expressão no componente epitelial dos AMBs (IHQ, 50X); C – Imunomarcção nuclear baixa no epitélio do CO (IHQ, 100X) D – Ausência de Imunomarcção nuclear no revestimento epitelial do CO (IHQ, 100X); E – Imunomarcção nuclear baixa nas células parenquimatosas do TOA (IHQ, 100X); F – TOA : marcação nuclear moderada-alta nas células do parênquima tumoral (IHQ, 100X).

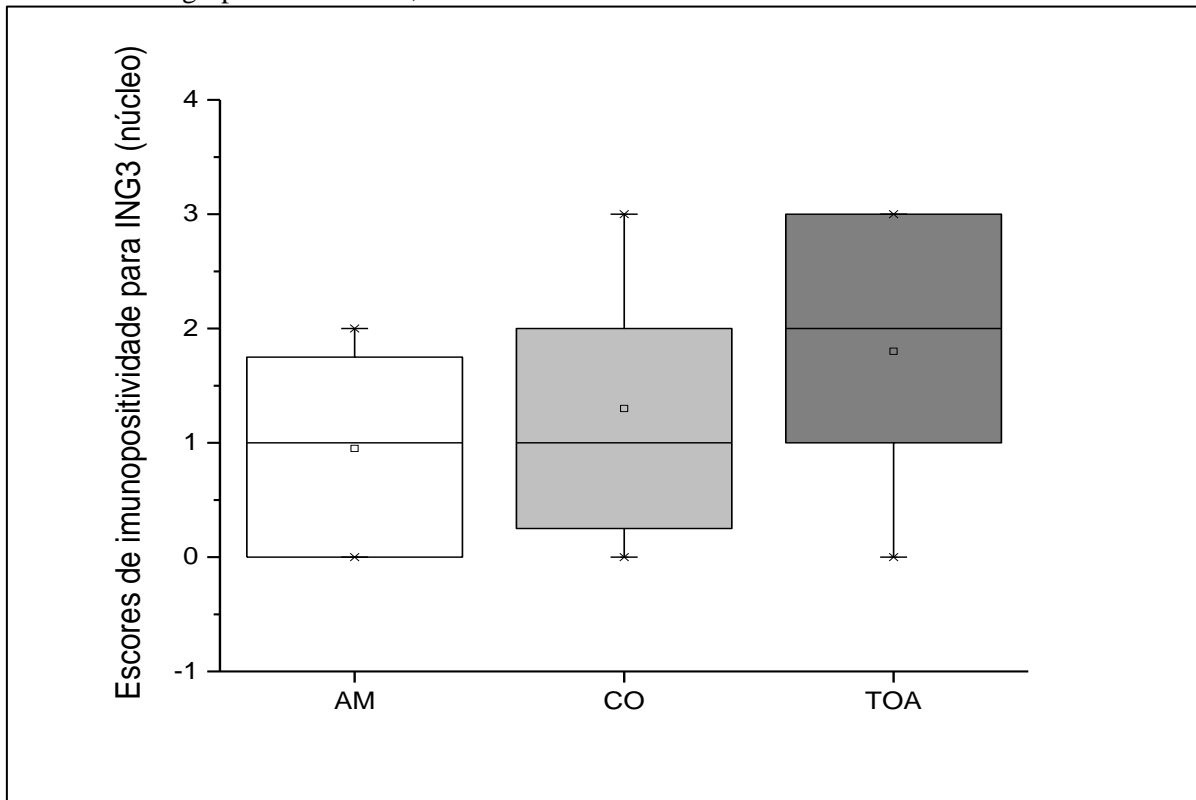
Tabela 2 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING3 (marcação nuclear) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	H	P
AM	20	1,00	0,00 – 1,75	23,025	5,36	0,06
CO	20	1,00	0,25 – 2,00	27,625		
TOA	15	2,00	1,00 – 3,00	35,13		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; H – Coeficiente de Kruskal-Wallis.

Gráfico 2 - Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING3 (marcação nuclear) de acordo com os grupos. Natal – RN, 2018.

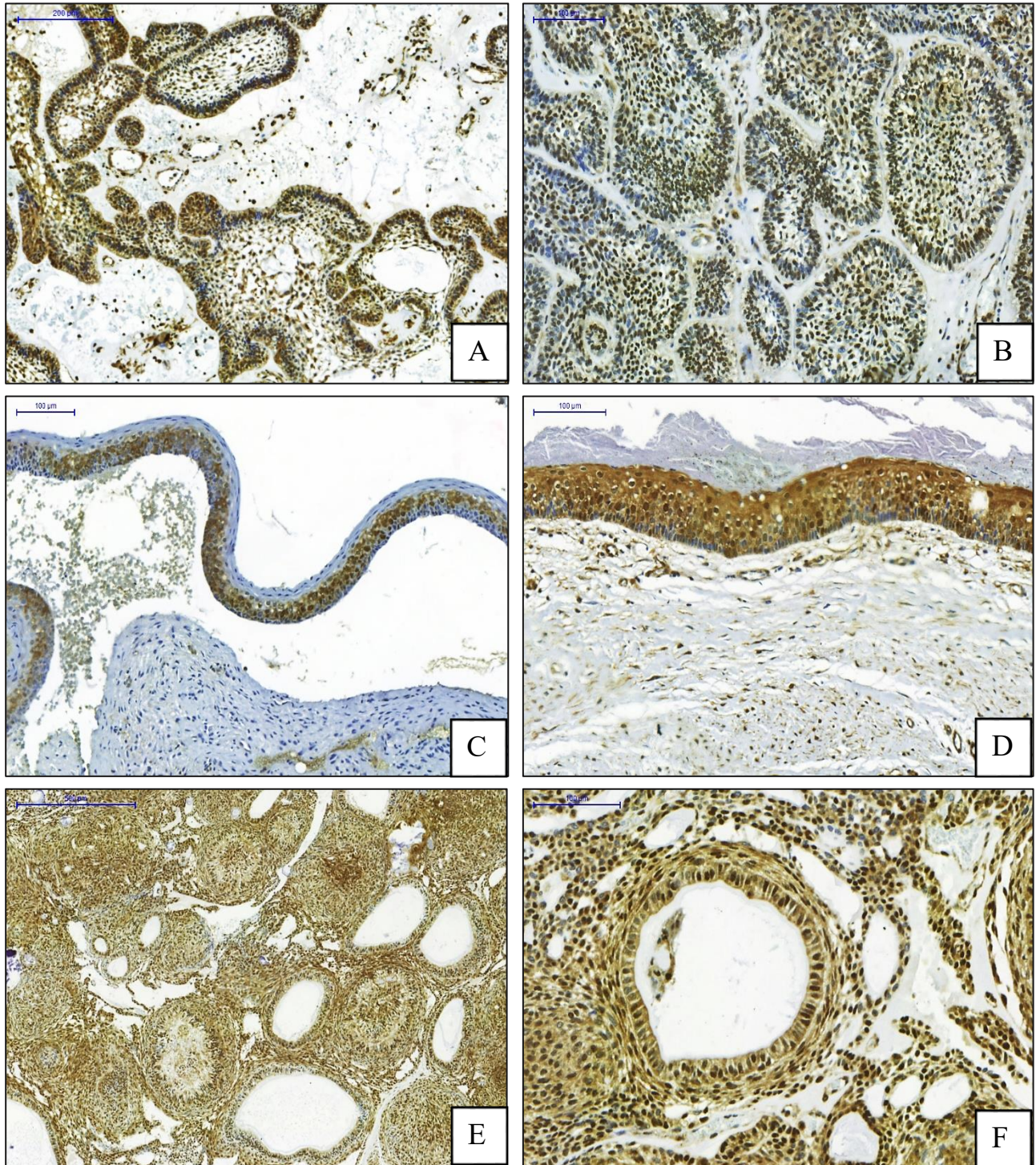


Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

5.2.2 Análise da imunexpressão de ING4

A análise da imunexpressão da ING4 no citoplasma das células epiteliais revelou positividade em todos os casos de COs, AMBs e TOAs (Figura 6). Para o grupo dos AMBs observou-se que a maioria dos casos tiveram expressão citoplasmática moderada e difusa no tecido epitelial (Escore 2) (n = 11; 55%) seguido de uma baixa expressão (Escore 1) (n = 9; 45%). No grupo dos COs, constatou-se maior frequência de uma moderada expressão e difusa no citoplasma das células do revestimento epitelial (Escore 2) (n = 11; 55%), seguido de uma alta expressão (Escore 3) (n = 7; 35%) e baixa expressão (Escore 1) (n = 1; 5%). No grupo dos TOAs, foi observada uma predominância de expressão moderada-alta (Escore 2 e 3) (n = 7; 46,6%); (n = 7; 46,6%), seguido por uma baixa expressão (Escore 1) (n = 1; 6,6%). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação citoplasmática do ING4, com os TOAs exibindo mediana superior em comparação aos AMBs e COs ($p < 0,05$) (Tabela 3). Na análise dois a dois com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre AMB e CO e entre AM e TOA, mas não entre CO e TOA ($*p < 0,05$) (Tabela4) (Gráfico 3).

Figura 6 – Expressão imuno-histoquímica da proteína ING4 no citoplasma das células de AMB, CO e TOA



Legenda: A – Imunomarcção para a proteína ING4 em AMB convencional: moderada e citoplasmática (IHQ, 100X); B – Marcação citoplasmática baixa nas ilhas das células epiteliais do AMB (IHQ, 100X); C – Imunomarcção citoplasmática moderada nas células epiteliais do CO (IHQ, 100X) D – CO apresentando uma expressão citoplasmática alta de ING4 (IHQ, 50X); E – Imunomarcção alta e citoplasmática nas células do parênquima tumoral do TOA (IHQ, 100X); F – TOA : marcação citoplasmática moderada nas células epiteliais do parênquima tumoral (IHQ, 100X).

Tabela 3 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	H	P
AM	20	2,00	1,00 – 3,00	17,77	15,89	< 0,001
CO	20	1,00	2,00 – 3,00	32,47		
TOA	15	2,00	2,00 – 3,00	35,66		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; H – Coeficiente de Kruskal-Wallis.

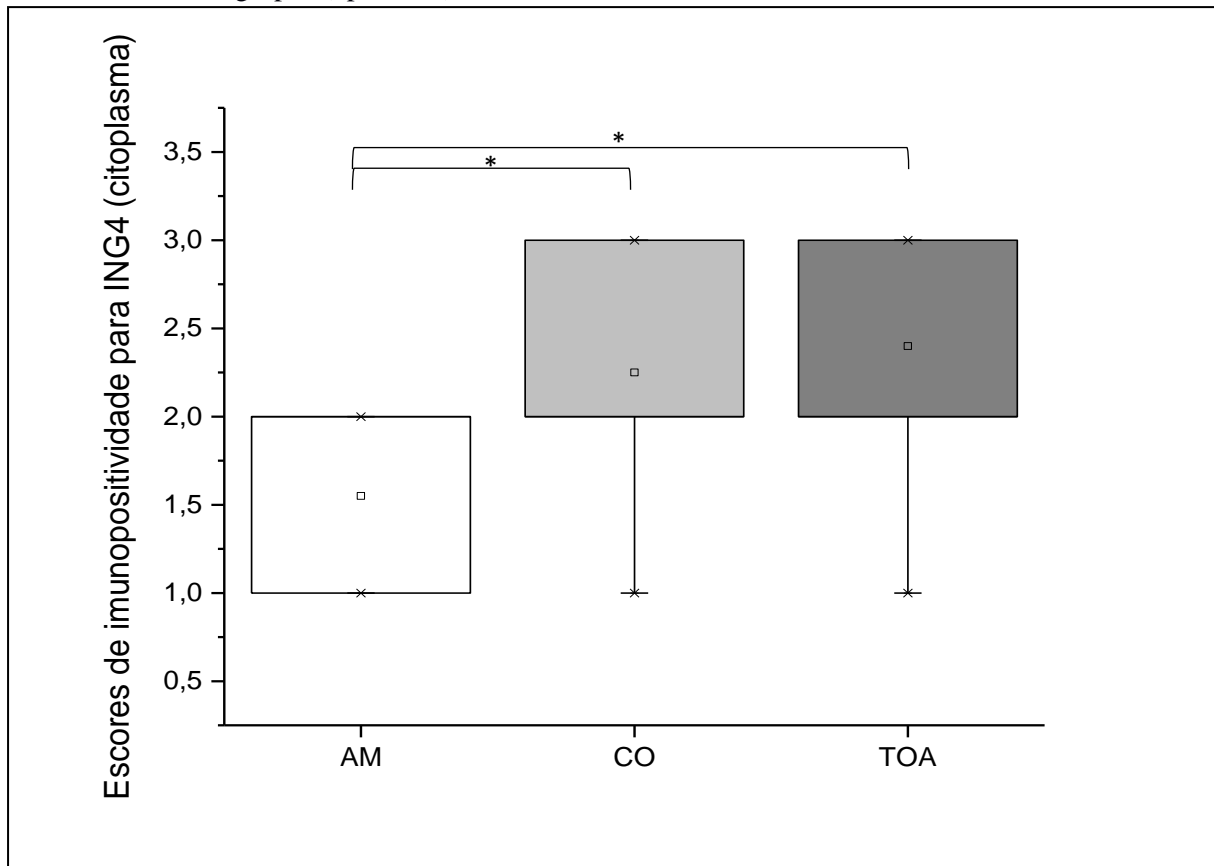
Tabela 4 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Mann-Whitney e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) em relação aos grupos quando analisados dois a dois. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	U	P
AM	20	2,00	1,00 – 2,00	15,075	91,5	0,001
CO	20	2,00	2,00 – 3,00	25,925		
AM	20	2,00	1,00 – 2,00	10,9	43,5	0,001
TOA	15	2,00	2,00 – 3,00	20,1		
CO	20	2,00	2,00 – 3,00	17,05	131	0,490
TOA	15	2,00	2,00 – 3,00	19,26		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; U – Coeficiente de Mann-Whitney.

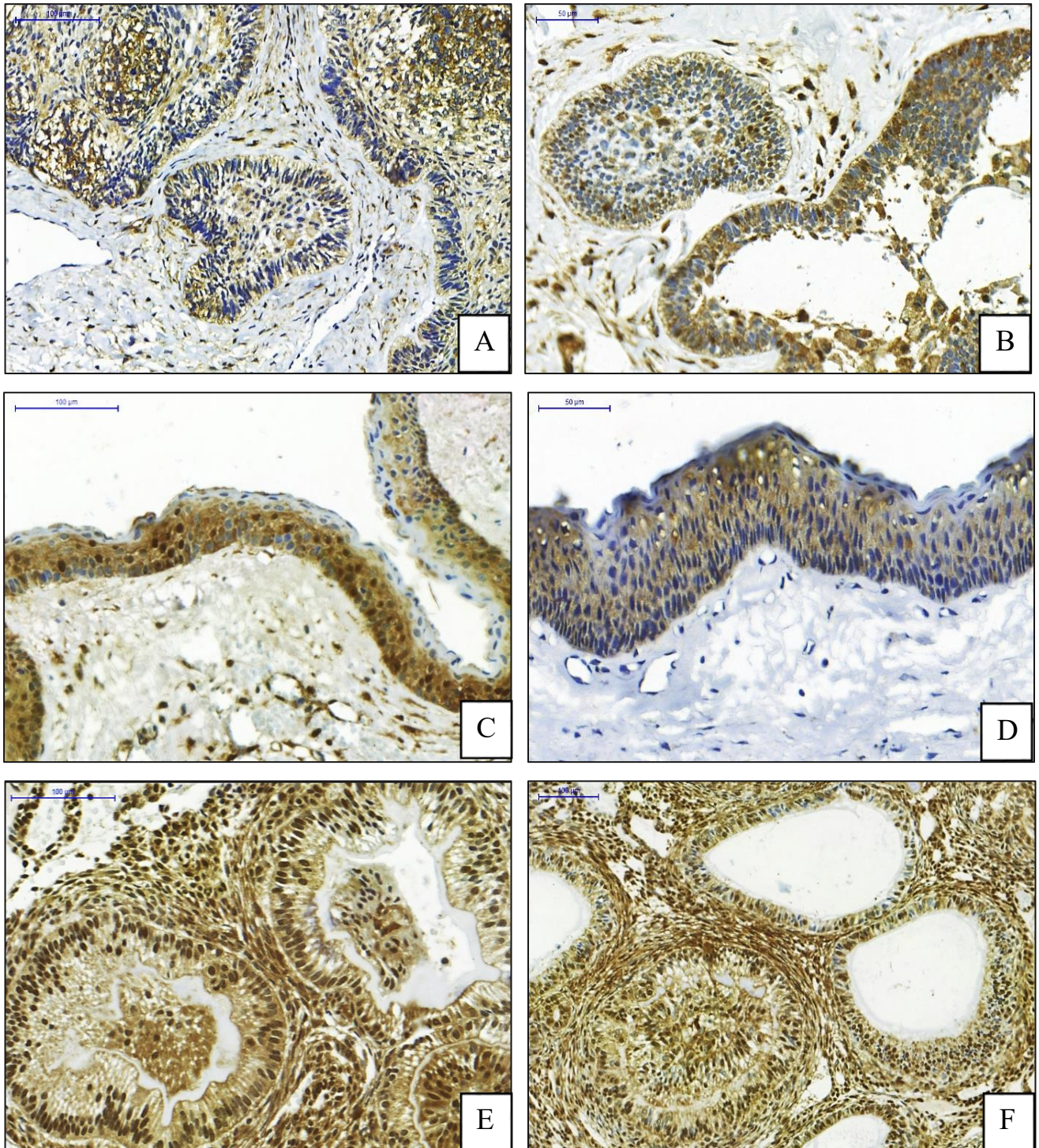
Gráfico 3 - Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING4 (marcação citoplasmática) de acordo com os grupos (* $p < 0,05$). Natal – RN, 2018.



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

A análise da imunoposição da ING4 no núcleo das células epiteliais revelou (Figura 7). No grupo dos AMBs, observou-se que a maioria dos casos tiveram perda de expressão nuclear e expressão nuclear reduzida, escores 0 ($n = 9$; 45%) e 1 ($n = 9$; 45%), seguido por uma minoria que apresentou uma expressão nuclear moderada no componente epitelial (Escore 2) ($n = 2$; 10%). No grupo dos COs, constatou-se maior frequência de uma baixa expressão nuclear das células epiteliais (Escore 1) ($n = 9$; 45%), seguido de uma moderada expressão (Escore 2) ($n = 6$; 30%), e (Escore 0) ($n = 3$; 15%) e (Escore 3) ($n = 2$; 10%). No grupo dos TOAs, foi observada uma predominância de alta expressão nuclear (Escore 3) ($n = 8$; 53,3%), seguido por uma baixa expressão (Escore 1) ($n = 4$; 26,6%), além de uma expressão moderada (Escore 2) ($n = 3$; 20%). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação nuclear do ING4, com os TOAs exibindo mediana superior em comparação com os AMBs e COs ($p < 0,05$) (Tabela 5). Na análise dois a dois com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre AM e CO, bem como entre AM e TOA e entre CO e TOA (* $p < 0,05$) (Tabela 6) (Gráfico 4).

Figura 7 – Expressão imuno-histoquímica da proteína ING4 no núcleo das células de AMB, CO e TOA



Legenda: A – Imunomarcção para a proteína ING4 em AMB, observa-se uma ausência de expressão nuclear nas ilhas de epitélio odontogênico (IHQ, 100X); B – Expressão nuclear baixa do ING4 no componente epitelial do AMB (IHQ, 50X); C – Imunomarcção nuclear baixa no revestimento epitelial do CO (IHQ, 100X) D – Ausência de Imunomarcção nuclear no revestimento epitelial do CO (IHQ, 100X); E – Imunomarcção nuclear altas nas células epiteliais parenquimatosas do TOA (IHQ, 100X); F – TOA : marcação nuclear baixa-moderada nas células do parênquima tumoral (IHQ, 100X).

Tabela 5 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística Kruskal-Wallis e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação nuclear) em relação aos grupos. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos postos	H	P
AM	20	1,00	0,00 – 1,00	17,5	20,61	< 0,001
CO	20	1,00	1,00 – 2,00	28,6		
TOA	15	3,00	1,00 – 3,00	41,2		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; H – Coeficiente de Kruskal-Wallis.

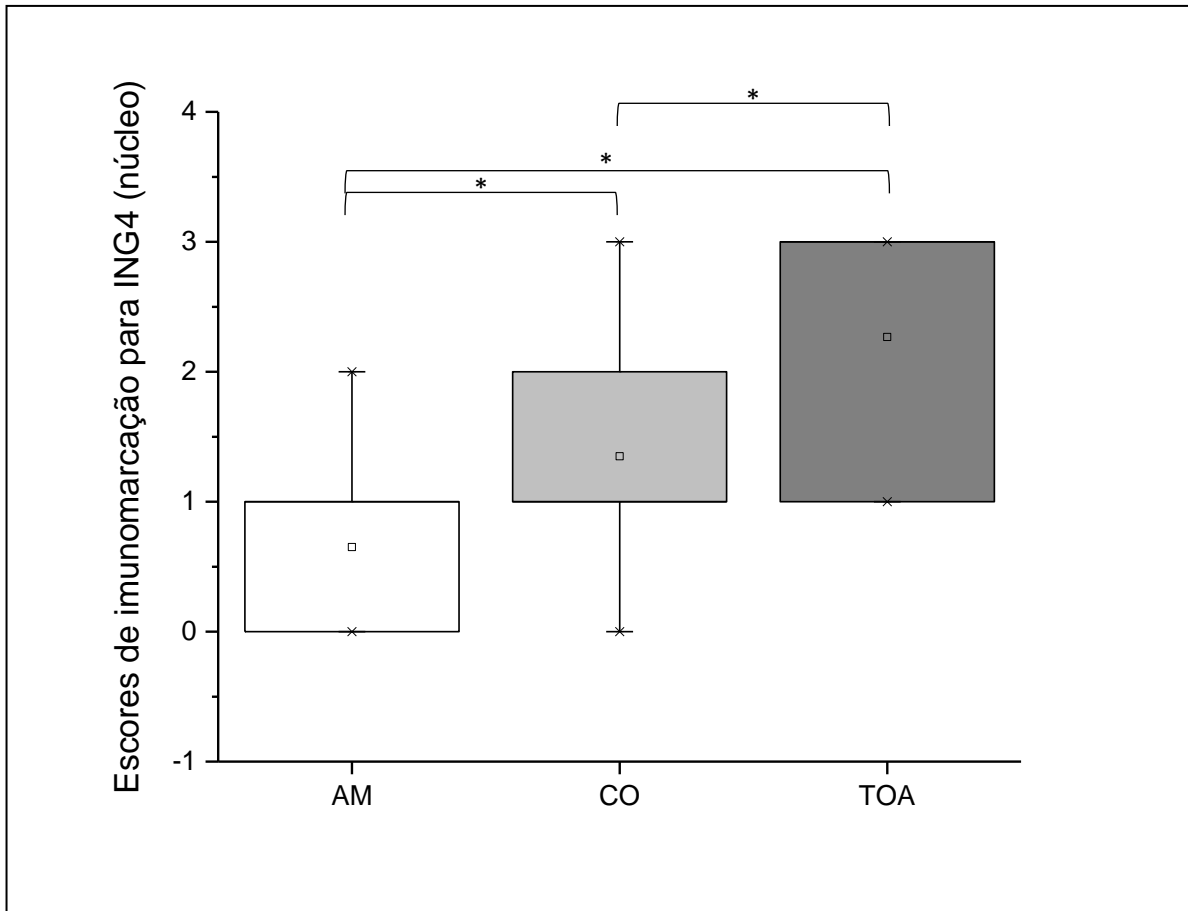
Tabela 6 - Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, estatística Mann-Whitney e significância estatística (*p*) para os escores de imunopositividade para o ING4 (marcação nuclear) em relação aos grupos quando analisados dois a dois. Natal – RN, 2018.

Grupos	N	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos postos	U	P
AM	20	1,00	0,00 – 1,00	16,05	111	0,01
CO	20	1,00	1,00 – 2,00	24,95		
AM	20	1,00	0,00 – 1,00	11,95	29	< 0,001
TOA	15	3,00	1,00 – 3,00	26,06		
CO	20	1,00	1,00 – 2,00	14,15	73	0,007
TOA	15	3,00	1,00 – 3,00	23,13		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Legenda: AM – ameloblastoma; CO – ceratocisto odontogênico; TOA – tumor odontogênico adenomatóide; U – Coeficiente Mann-Whitney.

Gráfico 4 - Box-plot relativo aos escores de imunopositividade para o ING4 (marcação nuclear) de acordo com os grupos (* $p < 0,05$). Natal – RN, 2018.



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.



Discussão

6 DISCUSSÃO

As lesões odontogênicas epiteliais benignas como o CO, AMB e TOA são consideradas um grupo heterogêneo de lesões que se desenvolvem nos maxilares através de um processo complexo que ocorre por meio da sinalização de diversas vias que estimulam a proliferação e diferenciação celular até a formação do elemento dentário. Ao longo do desenvolvimento do órgão dentário podem ocorrer alterações onde os remanescentes dos tecidos odontogênicos permanecem aprisionados nos ossos gnáticos e mucosa oral. De tal forma, estes remanescentes podem ser estimulados por vias bioquímicas, ainda pouco conhecidas. As alterações durante este processo de odontogênese que dão origem a estas lesões podem ocorrer em: genes supressores de tumor, controladores do ciclo celular, genes de reparo do DNA, oncogenes, oncovírus, elementos relacionados à apoptose, entre outros elementos participantes nesse processo biológico (EL-NAGGAR et al., 2017; KWON et al., 2017; SANDOVAL et al., 2017).

Considerando que estas lesões de natureza epitelial apresentam um comportamento biológico distinto, as mesmas se tornaram alvo de numerosas investigações. O AMB, por seu comportamento potencialmente agressivo, elevada destruição local e altas taxas de recidiva. Em contrapartida, o TOA é uma lesão benigna incomum, caracterizada por um comportamento biológico pouco agressivo e crescimento indolente (IDE et al., 2013; THAKUR et al., 2016; EL-NAGGAR et al., 2017). O CO, apesar de sua natureza cística (EL-NAGGAR et al., 2017), foi incluído na classificação da OMS em 2005 (BARNES et al., 2005) entre os TOs benignos de origem epitelial, devido ao seu crescimento expansivo e altas taxas de recorrências. Todavia, vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de comparar o comportamento biológico do CO ao dos TOs (agressivos e menos agressivos), na tentativa de entender mecanismos moleculares envolvidos no comportamento diferenciado deste cisto (RAZAVI et al., 2015; GOMES et al., 2017; WU et al., 2017).

Diversas pesquisas têm sido realizadas avaliando os TGSs INGs por sua relação com diversas neoplasias humanas e seu desempenho como reguladores fundamentais em processos celulares tão diversos como apoptose, proliferação e senescência. Nesse contexto, as evidências obtidas sugerem fortemente o papel das proteínas INGs, ressaltando também as proteínas do presente estudo ING3 e ING4 na manutenção do controle apropriado do crescimento celular (WALZAK et al., 2008).

O estado de expressão do RNAm relacionado aos INGs é frequentemente alterado no tecido neoplásico em comparação com o tecido normal. Isso ocorre para todos os membros da família de genes INGs incluindo ING3 e ING4 (ZHANG, G; LI, G., 2012; GOU et al., 2017).

A frequência das alterações observadas nos níveis de RNAm de ING3 e ING4 é consistente com um mecanismo pelo qual a interrupção da função normal das proteínas é conseguida, através da perda alélica de regiões genômicas, redução da estabilidade do RNAm, entre outras alterações dando possibilidade que a combinação desses processos irregulares produza uma expressão e função reduzida destas proteínas (WALZAK et al., 2008; GOU et al., 2017).

Diferentes estudos caracterizaram os níveis de expressão dos ING3 e ING4 no contexto de neoplasias malignas. No entanto, pouco se sabe sobre o papel destas proteínas em lesões benignas como CO, AMB e TOA, levando algumas investigações sugerir o papel destas proteínas como um ponto chave na tumorigênese (WANG et al., 2007; BORKOSKY et al., 2010). A perda do equilíbrio entre reguladores da proliferação celular e do apoptose, origina como consequência a tumorigênese. A morte celular desempenha um papel fisiológico importante no desenvolvimento e homeostase tecidual. A desregulação no apoptose tem sido responsável por eventos como a carcinogênese, progressão tumoral e resistência das células tumorais à quimioterapia (BORKOSKY et al., 2010; GOU et al., 2017).

No presente estudo foi avaliada a expressão imuno-histoquímica de ING3 e ING4 em espécimes de CO, AMB e TOA, com o objetivo de analisar o papel destas moléculas no desenvolvimento destas lesões, bem como avaliar possíveis relações quanto ao comportamento biológico.

A proteína ING3 e ING4 apresentaram variações de marcação no citoplasma das células do componente epitelial dos COs e nas células do parênquima dos AMBs e TOAs. Além de uma expressão nuclear reduzida nos AMBs e COs ao contrário do grupo dos TOAs. De acordo com a literatura, variações na imunoexpressão dessas proteínas podem ocorrer, exibindo um padrão de expressão homogêneo tanto núcleo quanto citoplasma nas células de tecidos normais ou em crescimentos benignos podendo estar associada à regeneração e reparo. Contrariamente, há uma expressão reduzida ou ausência de expressão em crescimentos malignos, sugerindo que estas proteínas participam não somente na formação dos diversos tecidos, mas também na carcinogênese de tumores de natureza epiteliais tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e melanomas humanos. O que indica que vários mecanismos podem estar envolvidos na perda de expressão destas proteínas, sugerindo uma translocação das proteínas do núcleo para o compartimento do citoplasma. (WANG et al., 2007; GUNDUZ et al., 2000; GOU et al., 2017). Nesse contexto, alguns autores investigaram a através de análise de microssatélites a perda de heterozigiosidade (LOH) da família ING em um grupo de AMB, e demonstraram que LOH destes genes aparece como uma alteração genética comum em AMB

sugerindo que essa lesão apresenta um comportamento agressivo e destrutivo e a consequência desta alteração pode ser a inativação da função supressora de tumor, indicando que há maior desregulação no controle do ciclo celular, contribuindo assim, no processo da tumorigênese (BORKOSKY et al., 2010).

No presente estudo, a análise da imunomarcção dessas proteínas foi realizada no componente epitelial analisando a marcação citoplasmática e nuclear de uma série de COs, AMBs e TOAs, demonstrando que todos os casos estudados exibiram imunomarcção para ING3 no citoplasma das células, com maior frequência de escore 3 no componente epitelial não havendo diferenças estatísticas consideráveis ($p = 0,888$) entre os grupos estudados. Este achado confirma os estudos que afirmam que a participação de ING3 no desenvolvimento tumoral. Foi comprovado que o aumento da expressão citoplasmática de ING3 está relacionado com a perda de expressão nuclear em várias neoplasias, principalmente em neoplasias malignas resultando de uma mutação ou deleção do NSL do ING3 por uma translocação nucleocitoplasmática, permitindo assim a progressão tumoral (GUNDUZ et al., 2000; WANG et al., 2007; GOU et al., 2017).

Ainda sobre a expressão da proteína ING3 no presente trabalho verificou-se que: o grupo dos AMBs e COs exibiram uma baixa expressão nuclear (escore 1) nas células epiteliais estudadas, além de uma ausência total de expressão nuclear nas células do componente epitelial e/ou parênquima das lesões mencionadas no constante estudo. Foi possível constatar que a maioria dos COs que apresentaram ausência de expressão nuclear para ING3 possuíam um histórico de recidiva. Contatou-se ademais que todas as variantes morfológicas de AMB apresentavam diminuição e perda de expressão nuclear, mas a maior frequência dessa característica foi em AMB convencional de padrão: folicular e plexiforme. Enquanto os TOAs apresentam uma expressão nuclear com predomínio dos escore 1,2 e 3 respectivamente, confirmando a imunoreatividade deste tumor para as células epiteliais tanto no núcleo e no citoplasma.

Embora a análise não revelou diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação nuclear do ING3 entre os grupos analisados ($p = 0,06$) essa informação corrobora com o estudo de Borkosky et al. (2010) que indica que o LOH para esses marcadores parece estar associado a um fenótipo mais agressivo de AMB, assim essa alteração pode inferir que há maior desregulação no controle do ciclo celular no caso de lesões com comportamento biológico mais agressivo.

Wang et al., 2007 avaliaram a expressão nuclear em diferentes lesões pigmentarias entre elas nevos displásicos, melanomas primário e melanoma metastático e mostraram que a

expressão nuclear reduzida de ING3 está relacionada com a progressão do melanoma humano. Fazendo uma analogia comparativa do trabalho supracitado com o nosso estudo, também verificamos perda da expressão nuclear no AMB, um tumor odontogênico de comportamento clínico agressivo, e no CO, que apesar de sua natureza cística, apresenta um comportamento biológico diferenciado quando comparado com os outros cistos e com lesões indolentes como o TOA.

Analisando a expressão citoplasmática da ING4 no epitélio das lesões odontogênicas constantes do presente estudo, foi observada positividade em todos os casos de AMBs, COs e TOAs, apresentando maior frequência de imunomarcção moderada do escore 2 a baixa escore 1 no grupo dos AMBs. por outro lado, no grupo dos COs e TOAs exibiram uma marcação predominantemente moderada escore 2 a forte escore 3. Contatou-se uma diferença estatisticamente significativa nos escores de imunopositividade para a marcação citoplasmática do ING4, com os TOAs exibindo mediana superior em comparação aos AMBs e COs ($p < 0,05$). Além disso também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre AMB e CO e entre AM e TOA, mas não entre CO e TOA ($*p < 0,05$). Considerando a expressão de ING4, pesquisas afirmam que em neoplasias essa proteína atua na propagação e migração celular no citoplasma em relação a células cancerígenas quando tem perda de expressão nuclear (GUNDUZ et al., 2005; SHEN et al., 2005; UNOKI et al., 2009). Além de progressão tumoral, como a indução da angiogênese através da liberação de citocinas pró-angiogênicas pelas células epiteliais (ZHANG, G; LI, G., 2012).

Uma vez sabido que ING4 é um gene candidato envolvido em LOH de AMBs, e que sua função é exercida principalmente no núcleo das células. Estudos tem demonstrado que a diminuição de expressão dessa proteína está relacionada com perda do controle do ciclo celular e progressão tumoral de diversas neoplasias malignas, assim, procuramos analisar a expressão no núcleo das células epiteliais de lesões benignas de origem odontogênica (BORKOSKY et al., 2010; ZHANG, G; LI, G., 2012)

No presente estudo foi observada uma perda de expressão nuclear (escore 0) além de uma expressão reduzida (escore 1) nas células epiteliais dos casos de AMBs. No grupo dos COs, constatou-se maior frequência de uma baixa expressão nuclear das células epiteliais. E contrariamente no grupo dos TOAs, foi observada uma predominância de alta expressão nuclear existindo diferença estatisticamente significativa entre os TOAs exibindo mediana superior em comparação com os AMBs e COs ($p < 0,05$). E também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre AM e CO, bem como entre AM e TOA e entre CO e TOA ($*p < 0,05$). Esses se relacionam com o estudo de Borkosky et al. (2010) onde acreditam que

em lesões de comportamento mais agressivo e destrutivo como no caso de AMBs de padrão convencional, há uma inativação da função supressora do tumor da proteína ING4. Associado a isso foi possível constatar em nosso trabalho diminuição e por vezes perda de expressão nuclear nas variantes mais agressivas de AMBs. Além disso constatou-se que os COs que foram recidivantes, tiveram predominância de diminuição e por vezes perda de expressão nuclear da proteína ING4. Assim essas afirmações podem apontar para o controle anormal do ciclo celular no AMB e CO.

Considerando as evidências da imunoexpressão nuclear de lesões menos agressivas e indolentes como o TOA, teve uma homogeneidade intensidade de expressão o que explica que ING4 pode atuar na supressão tumoral sem afetar o ciclo celular e regulando a transcrição de genes implicados no controle de múltiplas funções celulares. Além disso ING4 em situação de estabilidade, medeia a modificação da cromatina e tem um efeito supressivo sobre a tumorigênese e a imunidade inata e também inibe a angiogênese pela supressão da via NF- κ B e induz a supressão do crescimento e a apoptose (CAI et al., 2009; LI et al., 2010).

Ao comparar a expressão das proteínas ING3 e ING4 entre os COs, AMBs e TOAs, o presente estudo observou imunomarcção similar destes marcadores entre AMBs com COs a diferencia do TOA. Esses achados coincidem com único estudo de essas proteínas em tumores odontogênicos por Borkosky et al. (2010) que ao avaliar a expressão de esta proteína através de microssatélites em AMBs acharam a LOH associada a perda da função supressora de tumor e associaram isso com lesões de comportamento mais agressivo. Diante isso é importante refletir que apesar do COs ser considerados lesões císticas, os resultados desta pesquisa poderiam aportar esclarecimentos sobre o espectro do comportamento biológico diferenciado dessa lesão e sua similaridade com neoplasias odontogênicas altamente agressivas como no caso de AMBs.

Ainda assim, pode-se afirmar que há relação entre diferentes lesões odontogênicas, onde a expressão das proteínas ING3 e ING4 foi diminuída, bem como expressão regulada a nível núcleo-citoplasma destes supressores tumorais em lesões odontogênicas indolentes. Esses dados sugerem que as proteínas ING3 e ING4, conseguem contribuir na indução da apoptose, reparo do DNA e controle do ciclo celular. Entretanto, em processos tumorais benignos de comportamento agressivo, essas proteínas podem apresentar alterações que favorecem a sobrevivência celular e escape dos mecanismos de controle do ciclo celular, sendo um ponto chave na tumorigênese. Além de que pouco se sabe destas proteínas em lesões odontogênicas e seu papel na progressão de outros tumores tem sido bastante relatado, tais como em câncer de cabeça e pescoço, de mama, pulmão, estômago, esôfago, cérebro (KAMEYAMA et al., 2003; NOUMAN et al., 2003; LI et al., 2009; LI et al., 2010).

Os resultados do presente estudo, em consonância com os dados da literatura consultada, com relação à regulação do ING3 e ING4, indicam que essas proteínas podem desempenhar um papel importante na iniciação e progressão de AMBs e lesões odontogênicas de comportamento biológico diferenciado como no caso do CO. No entanto, mais estudos utilizando metodologias mais elaboradas, como biologia molecular, são necessários para o entendimento mais profundo do papel das proteínas da família ING nas lesões de natureza odontogênica.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

A diminuição de expressão nuclear das proteína ING3 e ING4 tanto em AMBs e COs justifica o comportamento biológico semelhante dessas lesões

Não houve diferença estatisticamente significativa entre Ameloblastomas, Ceratocistos Odontogênicos e Tumor odontogênico adenomatóide em relação às medianas dos escores de positividade para ING3 tanto na marcação nuclear quanto citoplasmática no componente epitelial, porém não exclui a possibilidade dessas proteínas participarem no processo de desenvolvimento e progressão de tumores odontogênicos.

Houve diferença estatisticamente significativa entre Ameloblastomas, Ceratocistos Odontogênicos e Tumor odontogênico adenomatóide em relação às medianas dos escores de positividade para ING4 tanto na marcação nuclear como citoplasmática no componente epitelial, indicando a possibilidade dessas proteínas participarem do processo de desenvolvimento e progressão tumoral.



Referências

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, G. L.; ALTINI, M.; SHEAR, M.. The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. **J. Oral Pathol.**, v. 17, N. 9-10, p. 541-46, 1988.
- AGARAM, N. P. et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 128, n 3, p. 313-317, 2004
- AGUISSA-TOURÉ, A. H. et al. The ING family tumor suppressors: from structure to function. **Cell Mol Life Sci.**, v. 68, n. 1, p.45-54, 2011.
- ALAEDINI, M. et al. Comparison of angiogenesis in Keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastoma. **Oral Dis.**, v. 15, n. 6, p. 422-427, 2009.
- AMARAL, F. R. et al. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and Keratocystic odontogenic tumors. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 2, p. 91-96, 2012.
- ANDRADE, E. S. S. et al. Immunoexpression of integrins in ameloblastoma, adenomatoid odontogenic tumor and human tooth germs. **Int. J. Surg. Pathol.**, v.16, n. 3, p. 277-285, 2008.
- AVELAR, R. L. et al. Tumores odontogênicos: estudo clínico-patológico de 238 casos. **Rev. Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 74, n. 5, p. 668-673, 2008.
- AVELAR, R. L. et al. Worldwide incidence of odontogenic tumors. **J. Craniofac. Surg.**, v. 22, n. 6, p. 2118-2123, 2011.
- AURREKOETXEA, M. et al. Wnt/ β Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**. v. 4, p. 1-14, 2016.
- AYOUB, M. S.; BAGHDADI, H.M.; EL-KHOLY, M. Immunohistochemical detection of laminin-1 and Ki-67 in radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. **BMC Clin. Pathol.**, v. 2, p. 11-14, 2011.
- BACHMANN, A. M.; LINFESTY, R. L. Ameloblastoma, Solid/ Multicystic type. **Head Neck Pathol.**, v. 3, n. 4, p. 307-309, 2009.
- BARNES, L. et al. (Ed.). World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck tumours**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2005.
- BILODEAU, E. A.; COLLINS, B. M. Odontogenic cysts and neoplasms. **Surg. Pathol. Clin**. v. 10, n. 1, p. 177-222, 2017.
- BORKOSKY, S. S. et al. Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma. **Oncol. Res.**, v. 18, n. 10, p. 509-518, 2010.
- BUCHNER, A.; MERRELL, P. W.; CARPENTER, W. M. 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. Bucal Maxillofac. Surg**. v. 64, n. 9, p. 1343-1352, 2006.

BUNCE, M. W. et al. Stress-ING out: phosphoinositides mediate the cellular stress response. **Science's STKE**, v. 2006, n.360, p.46.2006.

CAI, L. et al. Inhibitor of growth 4 is involved in melanomagenesis and induces growth suppression and apoptosis in melanoma cell line M14. **Melanoma Res.**, v. 19, n. 1, p.1-7, 2009.

CHEN, L. et al. Genetic alterations of candidate tumor suppressor ING1 in human esophageal squamous cell cancer. **Cancer Res.**, v.61, n.11, p.4345–4349, 2001.

CHOUINARD, A. F. et al. Unicystic Ameloblastoma Revisited: Comparison of Massachusetts General Hospital Outcomes With Original Robinson and Martinez Report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 75, n. 11, p. 2369-2378, 2017.

COLES, A. H.; JONES, S.N. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. **J. Cell. Physiol.**, v. 218, p. 45-57, 2009.

DAYI, E. et al. Adenomatoid odontogenic tumour (adenoameloblastoma). Case report and review of the literature. **Aust. Dent. J.**, v.423, p.15-18, 1997.

DE MATOS, F. R. Et al. Adenomatoid odontogenic tumor: retrospective study of 15 cases with emphasis on histopathologic features. **Head Neck Pathol.**, v. 6, p. 430-437, 2012.

DE OLIVEIRA, M.G. et al. Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. **Med. Oral Pathol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 5, p. 275-280, 2008.

DINIZ, M.G. et al. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. **Oral Oncol.**, v. 72, p. 165–173, 2017.

DOYON, Y. et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. **Mol Cell**, v. 21, p.51-64., 2006.

DUNFEE, B. L. et al. Radiologic and pathologic characteristics of benign and malignant lesions of the mandible. **Radiographics.**, v. 26, n. 6, p.1751-1768, 2006.

EL-NAGGAR, A. K. et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**, 4. ed. Lyon, France: IARC Press, 2017. p.203-241.

FENG, X. et al. Different HATS of the ING1 gene family. **Trends Cell. Biol.**, v. 12, p.532-538, 2002.

FINKELSTEIN, M. W. et al. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective analysis of genetic, immunohistochemical and therapeutic features. Proposal of a multicenter clinical survey tool. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 116, p. 75-83, 2013.

FREITAS, V.S. et al. Immunohistochemical expression. Of matrixins (MMP-7 and MMP- in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. **Oral Surg. Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.108, p.417-424, 2009.

- FULCO, G. M. et al. Ameloblastomas sólidos: estudo retrospectivo clínico e histopatológico em 54 casos. **Braz. J. Otorhinolaryngol.** v.76, n. 2, p. 172-177, 2010.
- GARDNER, D. G. et al. Ameloblastomas. In: BARNES. L. et al.(Eds). **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics: head and neck Tumours.** IARC Press: Lyon; 2005. p. 296-300.
- GARKAVTSEV, I. et al. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 295-298, 1998.
- GARKAVTSEV, I. et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. **Nature**, v. 428, n. 6980, p. 328-332, 2004.
- GARKAVTSEV, I. et al. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. **Nat. Genet.**, v. 14, n.4, p. 415-420, 1996.
- GILJAMSE, M. et al. Metastasizing ameloblastoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, n. 5, p.462-464, 2007.
- GOMES, C. C.; DINIZ, M.G.; GOMEZ, R.S. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 12, p. 1011-1014, 2009.
- GOMES, C. C. et al. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. **J. Oral Pathol. Med.**, v.39, n. 8, p.585-591, 2010.
- GOMES, C. C. et al. Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets. **J. Oral Pathol Med.**, 2017.
- GONZÁLEZ, L. et al. A functional link between the tumour suppressors ARF and p33ING1. **Oncogene**, v. 25, n. 37, p. 5173-5179, 2006.
- GOZANI, O. et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. **Cell**, v.114, n.1, p.99-111,2003.
- GOU, W F. et al. Immunohistochemical profile of ING3 protein in normal and cancerous tissues. **Oncol. Lett.**, v. 13, n. 3, p. 1631-1636, 2017.
- GUÉRILLON, C. et al. The ING tumor suppressor genes: Status in human tumors. **Cancer Letters**, v. 345, n. 1, p. 1-16, 2014.
- GUNDUZ, M. et al. Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. **Gene**, v. 356, p. 109-117, 2005.
- GUNDUZ, M. et al. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Res**, v. 60, n. 12, p. 3143– 3146, 2000.
- GUNDUZ, M. et al. The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 275–284, 2008.

- GUPTA, N. et al. Unicystic ameloblastoma of the mandible. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v.15, n.2, p.228-231, 2011.
- HANDSCHEL, J G. et al. Adenomatoid odontogenic tumor of the mandible: Review of the literature and report of a rare case. **Head Face Med.**, v.1, p.3, 2005.
- HE, G. H. et al. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. **Mol Biol Evol.**, v. 22, n. 1, p. 104-116, 2005.
- HELBING, C. et al. A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. **Cancer Res.**, v.57, p. 1255-1258, 1997.
- HENRIQUES, A. C. G. et al. Considerações sobre a classificação e o comportamento biológico dos tumores odontogênicos epiteliais: Revisão de Literatura. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 2, n. 55, p. 175-184, 2009.
- IDE, F. et al. An expanded and revised early history of the adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 115, n. 5, p. 646-651, 2013.
- JAYARAJ, G. et al. Metastasizing Ameloblastoma – A perennial pathological enigma? Report of a case and review of literature. **J. Cranio Maxillofac. Surg.**, v.42, p. 772-779, 2014.
- JING, W. et al. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, p. 20–25, 2007.
- JOHNSON, N. R. et al. Frequency of odontogenic cysts na dtumors: a systematic review. **J. Investig. Clin. Dent.**, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2014.
- JORDAN. R. C. K; SPEIGHT P M. Current concepts of odontogenic tumours. **Diagn. Histopathol.**, v15, n. 6, p. 303-310, 2009.
- KALASKAR, R. et al. Conservative management of unicystic ameloblastoma in a young child: report of two cases. **Contempt. Clin. Dent.**, v. 2, n.4, p. 359 63, 2011.
- KAMEYAMA, K. et al. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. **Clin. Cancer Res.**, v.9, n.13, p. 4926-4934, 2003.
- KATAOKA, H. et al. ING represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. **Cancer Res.**, v. 63, n.18, p.5785-5792, 2003.
- KAWANA, Y. et al. Loss of heterozygosity at 7q31.1 and 12p13-12 in advanced prostate cancer. **Prostate**, v.53, n.1, p. 60-64, 2002.
- KRAMER, I. R. H. et al. **Histological Classification of Odontogenic Tumours. In: Histological Typing of Odontogenic Tumours.** Berlin: Springer, 1992. p. 7-9.
- KUMAMOTO H, OOYA K. Immunohistochemical detection of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. **J. Oral Pathol Med.** v34, n. 7, p. 401-406, 2005.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of uPA, uPAR, PAI-I, and maspin in ameloblastic tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 8, p. 488-494, 2007.

KUMAMOTO, H.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of BH3-only proteins in ameloblastic tumors. **Oral Dis**, v.14,n. 6, p.550-555, 2008.

KUMAMOTO, K. et al. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. **Int. J. Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1306–1315, 2009.

KUZMICHEV, A. et al. Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). **Mol. Cell. Biol**, v. 22, p.835-848, 2012.

KWON, H. J. E. et al. Activin and Bmp4 Signaling Converge on Wnt Activation during Odontogenesis. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 10, p. 1145-1152, 2017.

LAWAL, A. O.; ADISA, A.O.; OLUSANYA, A.A. Odontogenic tumours: A review of 266 cases. **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 5, n. 1, p. e13-e17, 2013.

LEE, S. K.; KIM, Y. S. Current concepts and occurrence of epithelial odontogenic tumors: I. Ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. **Korean J. Pathol.** v. 47, n. 3, p. 191-202, 2013.

LI, BB. et al. Adenomatoid odontogenic tumor with fibro-osseous reaction in the surrounding tissue. **J. Craniofac. Surg.**, v. 4, p. 100-101, 2013.

LI, M. et al. Reduced expression and novel splice variants of ING4 in human gastric adenocarcinoma. **J. Pathol.**, v. 219, n. 1, p. 87–95, 2009.

LI, X. et al. Decreased nuclear expression and increased cytoplasmic expression of ING5 may be linked to tumorigenesis and progression in human head and neck squamous cell carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 136, n. 10, p. 1573– 1583, 2010.

LI, X.; KIKUCHI, K.; TAKANO, Y. ING Genes Work as Tumor Suppressor Genes in the Carcinogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J. Oncol.**, v. 2011, p. 963614, 2011.

LOYOLA. et al. Clear cell odontogenic carcinoma: report of seven new cases and systematic review of the current knowledge. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 120, n. 4, p.483-496, 2015.

MADRAS, J; LAPOINTE H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **Tex. Dent. J.**, v.125, n.5, p446-453, 2008.

MAHER, S. et al. Modulators of inhibitor of growth (ING) family expression in development and disease. **Curr. Drug Targets**, v.10,n. 5, p.392-405, 2009.

MENDES, R. A.; CARVALHO, J. F.; VAN DER WAAL, I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - an overview. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 1, p. 19-24, 2010.

- MILMAN, T. et al. Ameloblastoma: 25 Year Experience at al. Single Institution. **Head Neck Pathol.**, v. 10, n. 4, p. 513-520, 2016.
- MOHAMED A. S; KARL R. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 32, n. 11, p. 509-519, 2007.
- MOREIRA. et al. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. **Arch. Oral Biol.**, v.54 n.10, p.893-897, 2009.
- MOSQUEDA-TAYLOR, A. et al. Odontogenic tumours in Mexico: A collaborative retrospective study of 349 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.84, n. 6, p.672-675, 1997.
- MOSQUEDA-TAYLOR, A. New findings and controversies in odontogenic tumors. **Med. Oral Pathol. Oral Cir. Bucal**, v.13, n. 9, p.555-558, 2008.
- NAGASHIMA, M. et al. A novel PHD-finger motif rotein, p47 ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 343–350, 2003.
- NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2009.
- NEVILLE, B.W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2016.
- NOUMAN, G. S. et al. Downregulation of nuclear expression of the p33 (ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. **J. Clin. Pathol.**, v.56, n. 7, p. 507-511, 2003.
- OCHSENIUS, G. et al. Odontogenic cysts: analysis of 2,944 cases in Chile. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 12, n. 2, p.85-91, 2007.
- ODELL, E.W; TILAKARATNE, W.M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head Neck Pathol**. v. 11, n. 1, p.218-219, 2017.
- OKI, E. et al. Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer. **Cancer Lett.**, v. 147, p. 157-162, 1999.
- ORTEGA. et al. No endodontic periapical lesions: a retrospective study in Chile. **Int. Endod. J**, v. 40, n. 5, p.386-389, 2007.
- PENA, P.V. et al. Histone H3K4Me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. **J. Mol. Biol.**, v.380, n. 2, p.303-312, 2008.
- PEREIRA, F. A. C. et al. Orthokeratinized odontogenic cyst: a report of two cases in the mandible. **Rev. Odonto Ciênc**. v. 27, n. 2, p. 174-178, 2012.
- PHILIPSEN, H. P. et al. An updated clinical and epidemiological profile of the adenomatoid odontogenic tumour: A collaborative retrospective study collaborative retrospective study. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 7, p.383-393, 2007.

- PHILIPSEN, H. P. et al. Adenomatoid odontogenic tumor: biologic profile based on 499 cases. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 20, n. 4, p. 149-158, 1991.
- PHILIPSEN, H. P; NIKAI, H. Adenomatoid odontogenic tumour. In: BARNES, L. et al. (Eds) **Pathology and Genetics of head and neck tumors**. Lyon, France: IARC Press,2005. p. 304-305.
- PHILIPSEN, H. P; REICHART, PA. Adenomatoid odontogenic tumour: facts and figures. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 2, p.125-131, 1999.
- PHILIPSEN, H. P; REICHART, PA Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. **Oral Oncol.**, v.34, n.5, p.317-325, 1998.
- PINDBORG, J.; KRAMER, I. **WHO international histological classification of tumours. histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions**. Geneva:WHO, 1971.
- POGREL, M. A. The keratocyst odontogenic tumor. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 25, n. 1, p. 21-30, 2013.
- PRATORIUS, F.; LEDESMA-MONTESET, C. Calcifying cystic odontogenic tumour. In: BARNES, L, et al. (Eds). **World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press,2005. p. 313-314.
- PREMALATHA, B. R. et al. Odontogenic Tumor Markers - An Overview. **J. Int. Oral Health**, n. 2, v. 5, p. 59-69, 2013.
- RAZAVI et al. Expression of Bcl-2 and epithelial growth factor receptor proteins in keratocystic odontogenic tumor in comparison with dentigerous cyst and ameloblastoma. **Dent. Res. J.**, v. 12, n. 4, p. 342-7, 2015.
- REICHART, P A; PHILLIPSEN H P. Odontogenic tumours and allied lesions. **Quintessence**, v. 35 n. 9, p. 525-529, 2004.
- REICHART, P. A. et al. Immunoprofile of the adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Dis.**, v. 23, n. 6, p. 731-736, 2017.
- REICHART, P. A; JUNDT, G. Benigne epitheliale odontogene Tumoren. **Der. Pathol.**, v.29, n. 3, p.175-188, 2008.
- RICK, G. M. Adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v.16, p.333-54, 2004.
- ROBINSON, L; MARTINEZ, M. G. Unicystic ameloblastoma: a prognostic distinct entity. **Cancer**, v.40, p.2278-2285,1977.
- RODRIGUES, T. L. C. et al. Tumores benignos dos maxilares: análise retrospectiva de 10 anos. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac**, , v.9, n.4, p. 87 - 92, 2009.

- RUSSELL, M. et al. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. **Exp. Cell. Res.**, v. 312, n.7, p.951-961, 2006.
- RYAN, K. M. et al. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v.13, n.3, p. 32-37, 2001.
- SCOTT, M. et al. UV induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. **J. Cell. Sci.**, v.114, p. 3455-3462, 2001.
- SERVATO, J. P. et al. Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian university and a review of international literature. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.42, n. 2, p. 288-293, 2013.
- SHEN, J.C. et al. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1. **Cancer Res.**, v. 67, p. 2552-2558, 2007.
- SIQUEIRA, A. S. et al. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behavior. **Histopathol**, v.57, n. 1, p.128-137, 2010.
- SOLIMAN, M. A; RIABOWOL K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. **Trends Biochem Sci.**, v. 32, n. 11, p. 509-519, 2007.
- SLOOTWEG, P. J. et al. Lesions of the jaws. **Histopathol**. v. n. 4, 18 p. 54:401, 2009.
- SPEIGHT, P. M; TAKATA, T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. **Virchows Archiv**. p.1-9, 2017.
- SUYAMA, Y. et al. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v.38, n. 5, p.476-480, 2009.
- SUYAMA, Y. et al. Immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, its type I receptor and antagonista in Keratocystic odontogenic tumors. **J. Oral Pathol. Med.**, v.37, n. 9, p.560-564, 2008.
- TAPIA, C. et al. Deletion of the inhibitor of growth 4 (ING4) tumor suppressor gene is prevalent in human epidermal growth factor 2 (HER2)-positive breast cancer. **Hum. Pathol**, v.42, n.7, p.983-989, 2011.
- TALLEN et al. Keep-ING balance: Tumor suppression by epigenetic regulation. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2728-2742, 2014.
- THAKUR, A. et al. Adenomatoid odontogenic tumor: What is the true nature? **Med Hypotheses.**, v. 97, p.90-93, 2016.
- TSANG, F. C. et al. ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and -independent mechanisms. **FEBS Lett.**, v.553, n. 3, p. 277-285, 2003.
- UNOKI, M.; KUMAMOTO, K.; HARRIS, C. C. ING proteins as potential anticancer drug targets. **Curr. Drug. Targets.**, v. 10, n.5, p. 442-454, 2009.

VERED, M. et al. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression. Of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 38, n. 7, p. 597-604, 2009.

VERED, M.; WRIGHT, J. M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head Neck Pathol.**, v. 11, n. 1, p. 215-218, 2017

VIEYRA, D. et al. Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 16, p. 5952-5961, 2003.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 594-604, 2002.

VOUSDEN, K. H. et al. p53 in health and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 4, p. 275-283, 2007.

WALZAK, A. A. et al. Expression profiles of mRNA transcript variants encoding the human inhibitor of growth tumor suppressor gene family in normal and neoplastic tissues. **Exp Cell Res.**, v. 314, n. 2, p.273-285, 2008.

WANG, Y. et al. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 14, p. 4111-4116, 2007.

WANG, J.; CHIN, M. Y.; LI, G. The novel tumor suppressor p33 ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. **Cancer Res.**, v. 66, n. 4, p. 1906–1911, 2006.

WANG, Y.; WANG, J.; LI, G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 16, p. 3787–3793, 2006.

WRIGHT, J.; VERED, M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head Neck Pathol.**, v. 11, n. 1, p. 68–77, 2017.

WRIGHT, J. M.; DEVILLIERS, P. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head Neck Pathol.** v. 11, p. 220–221, 2017.

WRIGHT, J. M; KUSAMA, K. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head Neck Pathol.** v. 11, p. 221–222, 2017.

WU, Y. H. et al. Expression of astrocyte elevated gene-1 protein in ameloblastomas, keratocystic odontogenic tumors, and dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.** v. 46, n. 2, p. 121-126, 2017.

YTHIER, D. et al. The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer. **Int. J. Cancer**, v. 123, n. 7, p. 1483-1490, 2008.

ZHANG, H. K. et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 261, n. 2, p. 183-192, 2008.

ZHANG, G; LI, G. Novel multiple markers to distinguish melanoma from dysplastic nevi. **PLoS One.**, v. 7, n. 9, p.45037, 2012.



Apêndices

Anexo

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito da proliferação celular e da perda de heterozigidade do gene supressor de tumor ING em tumores odontogênicos.

Pesquisador: LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49318915.9.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.277.582

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa corresponde a uma pesquisa realizada no depto de odontologia, no depto de Patologia Oral. O projeto de pesquisa está bem estruturado e quer avaliar qual o papel de uma nova família de genes supressores de tumor denominada ING com alguns tipos de tumor.

Os tumores odontogênicos (TOs) constituem um grupo heterogêneo de lesões com características histopatológicas e manifestações clínicas diversas. O ameloblastoma e o tumor odontogênico ceratocístico se destacam entre eles por demonstrarem comportamento biológico intrigante e tendência a desenvolver recorrências. Em contraste, o tumor odontogênico adenomatóide e o tumor odontogênico epitelial calcificante, embora

também sejam originados de epitélio odontogênico, apresentam crescimento lento e um comportamento biológico bastante indolente. Diversos estudos têm tentado identificar os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão dos TOs, destacando os de caráter genético e epigenético. Alterações nos genes supressores de tumores, incluindo a perda de heterozigidade (LOH) têm sido associados ao aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Algumas pesquisas têm destacado uma nova família de genes supressores de tumor denominada ING que interagem fisicamente e funcionalmente com o P53 e desempenham funções importantes na apoptose, reparação do DNA, regulação do ciclo celular e

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

CEP: 59.078-970

Telefone: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 1.277.582

senescência. Considerando-se a participação de genes supressores tumorais no desenvolvimento de tumores, o presente estudo se propõe investigar a LOH da família ING (ING1-ING5) e a expressão imunohistoquímica das proteínas ING-1, ING-2, ING-3, ING-4 e ING-5 em uma série de casos de lesões odontogênicas epiteliais com comportamentos biológicos distintos, na tentativa de contribuir para um melhor entendimento do papel desses marcadores no desenvolvimento e no comportamento biológico dos TOs estudados.

Objetivo da Pesquisa:

o presente estudo terá como enfoque a investigação da perda de heterozigosidade (LOH) da família ING (ING1-ING5) e a expressão imunohistoquímica das proteínas ING-1, ING-2, ING-3, ING-4 e ING-5 em uma série de casos de tumores odontogênicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto de pesquisa terá um risco mínimo, pois utilizará biopsias que se encontram armazenadas nos arquivos da disciplina de Patologia Oral. Como foi descrito uma nova família de genes supressores tumorais, esta correlação poderá trazer correlações importantes para estas famílias de câncer. Os benefícios serão considerados indiretos, o maior benefício da pesquisa será o aumento da compreensão acerca da participação das proteínas da família do gene supressor de tumor - ING (ING-1, ING-2, ING-3, ING-4 e ING-5) envolvidas na fisiopatologia das lesões estudadas. Contribuindo para que, no futuro, essas informações, ajudem a melhorar o entendimento e o tratamento das mesmas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa importante, pois como foi descrito uma nova família de genes supressores de tumor, estas novos dados poderão auxiliar num futuro próximo no diagnósticos mais rapido e mais seguro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000	CEP: 59.078-970
Bairro: Lagoa Nova	
UF: RN Município: NATAL	
Telefone: (84)3215-3135	E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 1.277.582

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_567132.pdf	09/09/2015 14:55:33		Aceito
Outros	Carta_de_anuencia.pdf	09/09/2015 14:53:31	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	09/09/2015 14:44:56	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 14:42:57	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	09/09/2015 14:41:39	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	CEP.pdf	09/09/2015 14:39:06	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	Declaracao_nao_inicio.pdf	09/09/2015 14:35:54	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	Cartadeconcessao.pdf	09/09/2015 14:34:08	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	Cartadeapresentacao.pdf	09/09/2015 14:31:06	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	09/09/2015 14:23:05	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NATAL, 13 de Outubro de 2015

Assinado por:
Daniella Regina Arantes Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN **Município:** NATAL

Telefone: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br