

HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS



U

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS ING_s
COM A P53 EM LESÕES ODONTOGÊNICAS
EPITELIAIS BENIGNAS**

F

R

N

NATAL - RN

2020



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

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS ING_s COM A P53 EM
LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS**

HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS

NATAL - RN

2020

HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS ING_s COM A P53 EM
LESÕES ODONTOGÊNICAS EPITELIAIS BENIGNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Patologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz

Co-orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

NATAL - RN

2020

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

Medeiros, Hianne Cristinne de Moraes.

Estudo da correlação das proteínas INGs com a P53 em lesões odontogênicas epiteliais benignas / Hianne Cristinne de Moraes Medeiros. - Natal, 2021.

85 f.: il.

Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Natal, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz.

Coorientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka.

1. Tumores Odontogênicos - Tese. 2. Tumor Adenomatóide - Tese. 3. Genes Supressores de Tumor - Tese. 4. Proteínas Inibidoras de Apoptose - Tese. I. Queiroz, Lélia Maria Guedes. II. Nonaka, Cassiano Francisco Weege. III. Título.

RN/UF/BSO

BLACK D61

DEDICATÓRIA

Em meados dos anos dois mil, sentava-me pela primeira vez no centro da minha sala. Minha mãe tinha uma coleção de anjinhos de centro, paralisados em diferentes posições. Não lembro da data exata ou em que dia da semana esse filme, que guardo com carinho, se passou. Eu tinha por volta de 9 anos de idade quando cheguei em casa, alvoroçada de fome. Tirei só metade da farda do colégio e almocei arroz de leite, purê de batata e macarrão sem molho – estava numa fase em que só almoçava comidas brancas. Corri para sala e catei os três controles que ficavam soltos pelo sofá, organizei eles enfileirados no centro de vidro, ao som do vídeo show. Por trás de cada controle debruçado no centro, eu posicionava 3 anjinhos. E essa foi então a minha primeira classe. Meus primeiros 9 alunos. Para os quais eu contava tudo que eu aprendia nas aulas da quinta série. É narrando essa lembrança que peço licença, para quebrar a expectativa, e dedicar este trabalho à mim mesma, e a memória da criança de 9 anos que sonhava em ser professora desde o dia em que nasceu. A conclusão deste trabalho é uma honra à criança sonhadora que sempre existirá na mulher que me tornei, aos pais que sempre impulsionaram meus voos, às minhas crenças e fé nas minhas próprias lutas, e a todos os mestres e amigos que me inspiraram e me deram forças para ser o que sou e produzir o que produzo.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,
Sem ela tampouco a sociedade muda”

- Paulo Freire

“É isso: tudo está ao alcance do homem e tudo lhe escapa em virtude de sua covardia

(...) Coisa curiosa a observar-se: que é que os homens temem acima de tudo?

- O que for capaz de mudar-lhes os hábitos, eis o que mais apavora”

- Fiódor Dostoiévski

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ana Cristina e Denildo**, que nunca deixaram de acreditar em mim. Vocês são a minha grande sorte e a minha gratidão diária. Minha rede de proteção a cada salto que decido dar. Eu os amo imensamente. À minha irmã **Cristhianne**, exemplo de mulher e grande amiga. Muito obrigada.

A toda a minha família, especialmente as minhas tias, que sempre foram exemplo de mulheres fortes, batalhadoras e determinadas. Toda a minha perseverança e determinação foi espelha em vocês.

A minha querida prima e colega de trabalho, **Priscilla Medeiros**, que me amparou e me acolheu em momentos difíceis. Você é essencial.

À minha orientadora, **Lélia Maria Guedes Queiroz**, pela humanidade e acolhimento. Sem a sua compreensão e paciência, este trabalho não teria sido possível. Obrigada pelas oportunidades e pelos conhecimentos trocados ao longo destes 4 anos de mentoria. Serei eternamente grata.

Ao meu co-orientador **Cassiano Francisco Weege Nonaka**, que nunca mediu esforços em ajudar sempre que possível. Admiro imensamente o patologista e pesquisador que o senhor é, e a humildade de sempre passar os seus conhecimentos e disponibilizar o seu tempo, mesmo nos momentos de desespero. Ao senhor, toda a minha gratidão.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN**, que me proporcionou crescimento profissional e pessoal de forma imensurável. Não tenho palavras para expressar a quão grata sempre serei a todos, principalmente a todos os professores que contribuíram com a minha formação enquanto patologista.

A professora **Lélia Batista de Souza**, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionou. Toda a minha admiração à sua dedicação.

Ao professor **Leão Pereira Pinto**, pois em meus dias mais difíceis, o senhor sempre me recebeu com sorrisos e muita gentileza. Obrigada também por todos os cafezinhos e conversas.

A professora **Marcia Cristina da Costa Miguel**, a senhora é um grande exemplo na docência e pesquisa acadêmica. Não tenho como mensurar o quanto os seus conhecimentos acrescentaram a minha formação e maturidade científica. Obrigada.

A professora **Ericka Jannine Dantas da Silveira**, que colaborou diretamente com a construção deste trabalho e me forneceu oportunidades valiosas ao longo destes 4 anos. Serei sempre grata.

Aos professores **Patricia Teixeira de Oliveira, Denise Helen Imaculada Pereira de Oliveira e Pedro Paulo de Andrade Santos**, pela disponibilidade de participar da minha banca de defesa e contribuir com este trabalho. Obrigada.

Ao meu querido professor **Gustavo Pina Godoy**, um dos maiores exemplos de docência que tive durante a graduação. O seu carinho e paixão por ensinar me encheram de vontade de aprender mais sobre o universo da patologia. Lhe admiro imensamente como professor e ser humano. É uma honra ter-lhe compondo a banca de defesa deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, Sandrinha, Hévio, Gracinha, Betty e Ricardo, pelo acolhimento e simpatia, e por estarem sempre disponíveis a ajudar. Agradeço especialmente à Lourdinha, pelo café de todas as tardes e por todas as músicas de Ivete Sangalo que ela cantava nos corredores e alegrava as minhas tardes.

As minhas queridas colegas e irmãs de orientação, **Rani e Janaina** pelo companheirismo e apoio. A **Tiago João**, que sempre me apoiou e trabalhou ativamente neste trabalho.

A **Carolina Maria Campos**, uma irmã que a patologia trouxe, a quem admiro muito e sou extremamente grata por todo o auxílio prestado neste trabalho.

A **Malu Oliveira**, pela grande ajuda na estatística deste trabalho. Você é um exemplo de mulher e sua jornada profissional é uma grande inspiração. Muito obrigada.

A minha querida amiga e irmã, **Hellen Bandeira**, que foi a minha família e suporte durante esta jornada. A sua presença é presente de Deus. Serei eternamente grata pelos nossos caminhos terem se cruzado. Fico ainda mais feliz por podermos crescer profissionalmente e pessoalmente tão proximamente, torcendo pelo sucesso uma da outra de forma tão genuína. Te amo.

Aos amigos feitos durante esta jornada, **Cris, Juliana, Everton, Glória, Mara, Yallit e Mariana**. Obrigada pela companhia e acolhimento.

A **Daurea Cobe**, por toda a disponibilidade de sempre me receber em sua casa. Uma amiga querida que ganhei durante processos difíceis. Torço imensamente pelo seu sucesso. A **Ondina Karla**, obrigada por todas as viagens e conversas. Seu apoio foi essencial durante estes 4 anos. A **Paty Peixe**, um anjinho enviado a terra. Sua sensibilidade e ternura foram muito importantes para mim. Agradeço ainda a **Rodrigo Mafra**, um exemplo de ser humano e profissional, sempre disponível a ajudar. Admiro imensamente todos vocês.

A **Larissa Rolim, Caio Barros e Israel Cavalcante**. O trio que salvou minha vida em vários piores momentos. Nada teria sido a mesma coisa se não fosse por vocês. Serei eternamente grata por todo o apoio que recebi de vocês. Quero levar vocês para vida.

A **Matheus Cordula e Ana Cordula**, que me acolheram em momentos em que eu queria desistir de tudo. Jamais serei suficientemente grata pela importância de vocês me acolherem como membro da família em momentos tão difíceis.

Aos meus queridos e grandes amigos, Ronny, Dani, Aninha, Flavinha, Geovane, Aime, Gutierre, Leandrinha, Rodrigo Augusto, Joallison, Amanda, Beltrão e Artur por sempre me incentivarem a continuar e me darem forças durante todos esses anos. Agradeço especialmente à **José Matheus Alves e Andressa Melo**, que me acompanharam de perto durante os altos e baixos, e são como família para mim. Muito Obrigada.

A **Paula Vanessa e as FIP**, bem como a todos os meus colegas de trabalho, pelo apoio e flexibilização dos meus horários de trabalho. Sem isso, este trabalho não teria sido possível.

A todos os professores, do colégio e da graduação, me inspiraram e educaram. Especialmente à **Daliana Queiroga de Castro Gomes**, que me ofereceu oportunidades cruciais para o meu desenvolvimento. Muito obrigada.

Em memória da professora **Aline Carvalho Batista**, a pessoa que inicialmente incentivou a minha paixão pela patologia oral durante a minha pesquisa de mestrado na UFG.

Ao meu querido grupo “bata”, amigos que fiz no Mestrado da UEPB: **Hellen, Matheus Perazzo, Fernanda, Livia, José Matheus, Carol e Naiana**. Vocês foram essenciais para que eu continuasse firme nesta trajetória. Muito obrigada.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ninguém ignora tudo
Ninguém sabe de tudo
Todos nós sabemos alguma coisa
e todos nós ignoramos alguma coisa
É por isso que aprendemos.

-Paulo Freire

RESUMO

As proteínas INGs (*inhibitor of growth gene*) desempenham papel de supressoras tumorais e podem agir por vias dependentes, ou independentes, da p53 na sinalização do ciclo celular e da apoptose. Este trabalho investigou, por meio de imuno-histoquímica, a correlação entre a expressão das proteínas INGs e a expressão da proteína p53 em ceratocistos odontogênicos (COs), TOAs (20) e ameloblastomas sólidos (20). Os espécimes foram submetidos à marcação utilizando os anticorpos anti-Ing3, anti-Ing4, anti-Ing5 e anti-p53. Foi realizada análise quantitativa levando-se em consideração a localização citoplasmática e/ou nuclear para as proteínas INGs e a localização nuclear para a proteína p53. A análise da imunexpressão das proteínas ING1 e ING2 foi realizada em um estudo prévio e os resultados foram considerados apenas para a análise de correlação com as proteínas estudadas neste estudo. Os dados foram analisados pelo *Statistical Package for Social Sciences* para Windows (SPSS versão 22.0; IBM, USA). Para a comparação da imunexpressão entre os grupos de lesões foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis*, e para a investigação das correlações foi utilizado o teste de *Spearman*. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0.05$. O presente estudo evidenciou redução da expressão nuclear e citoplasmática das proteínas ING3, ING4 e ING5 em ceratocistos odontogênicos (COs) e ameloblastomas (AMBs). Além disso, em alguns casos, a perda da expressão nuclear das INGs esteve negativamente correlacionada à expressão da proteína p53. As análises de correlação entre as proteínas INGs indicam a existência de mecanismos compensatórios entre as proteínas INGs em folículos dentários (FDs) e tumores odontogênicos adenomatoides (TOAs), estes mecanismos parecem ser menos evidentes em COs e AMBs. Observou-se redução na expressão da proteína ING3 em AMBs ($p=0,003$); redução na expressão da proteína ING4, tanto em AMBs ($p=0,02$) quanto em COs ($p=0,001$); e uma redução da expressão nuclear da proteína ING5 nos COs ($p=0,09$) e nos AMBs ($p=0,012$). Foram evidenciadas correlações positivas entre a expressão nuclear da p53 com a expressão citoplasma/núcleo da proteína ING1 ($r=0,603$; $p=0,05$) em COs, e com a expressão citoplasma/núcleo das proteínas ING3 ($r=0,475$; $p=0,034$) e ING4 ($r=0,448$; $p=0,047$) em AMBs. Por fim, os resultados deste estudo sugerem que a redução na expressão nuclear das proteínas INGs pode ser um evento envolvido na etiopatogênese de lesões odontogênicas mais agressivas, e que a redução da expressão nuclear/citoplasmática das proteínas INGs não está relacionada ao aumento expressão da p53 em COs e AMBs, o que sugere que a expressão destas proteínas deve resultar em alterações funcionais de maneira independente da p53 em lesões odontogênicas.

Palavras-chave: Lesões odontogênicas epiteliais benignas; Genes supressor de tumor; Proteínas ING

ABSTRACT

INGs (inhibitor of growth gene) proteins play a role of tumor suppressors and can act via p53-dependent or independent pathways in signaling cell cycle and apoptosis. The aim of this study is to evaluate correlation between expression of proteins of ING proteins and expression of protein p53 in dental follicles (DF), odontogenic keratocysts (OK), adenomatoid odontogenic tumors (AOT) and solid ameloblastomas (AMBs). The sample was intentional and non-probabilistic, consisting of 20 cases of solid AMBs, 20 cases of AOT, 20 cases of OKs and 10 samples of DFs. The specimens were subjected to immunohistochemical method, using antibodies anti-Ing3, anti-Ing4, anti-Ing5 and anti-p53. Quantitative analysis was performed taking into account cytoplasmic and / or nuclear location for ING proteins and nuclear location for the p53 protein. The analysis of ING1 and ING2 immunoexpressions was performed in a previous study and the results were considered only for the correlation analysis. Data were analyzed by Statistical Package for Social Sciences for Windows (SPSS version 22.0; IBM, USA). Kruskal Wallis test was used to compare the immunoexpression between the groups of lesions, and Spearman test was used to investigate correlations. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. This study showed a reduction in nuclear and cytoplasmic expression of ING3, ING4 and ING5 in odontogenic keratocysts (OKs) and ameloblastomas (AMBs). In addition, in some cases, loss of INGs nuclear expression was negatively correlated with p53 expression. Correlation analyzes may indicate existence of compensatory mechanisms between all the ING proteins in dental follicles (FDs) and adenomatoid odontogenic tumors (TOAs). These mechanisms seem to be less evident in COs and AMBs. The results of this study showed a reduction in ING3 expression in AMBs ($p = 0.003$); a reduction in ING4 expression, in OKs ($p = 0.02$) and in AMBs ($p = 0.001$); and a reduction in ING5 nuclear expression, also in OK ($p = 0.09$) and in AMBs ($p = 0.012$). Positive correlations were found between p53 nuclear expression with ING1 cytoplasm / nucleus expression ($r = 0.603$; $p = 0.05$) in OKs, and with ING3 cytoplasm / nucleus expression ($r = 0.475$; $p = 0.034$) and also ING4 cytoplasm / nucleus expression ($r = 0.448$; $p = 0.047$) in AMBs. Finally, this study suggests that reduction in the expression of ING proteins seems to be an event that occurred in etiopathogenesis of more aggressive odontogenic lesions. Furthermore, nuclear / cytoplasmic expression of ING proteins is not related to increase in p53 expression in OKs and AMBs, which indicates that loss of expression of these proteins may result in functional changes independently of p53.

Keywords: Benign epithelial odontogenic lesions; Tumor suppressor genes; ING Proteins

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB: Ameloblastoma

CO: Ceratocisto Odontogênico

CTNNB1: gene da beta-catenina

DLX2: do inglês, *Distal-Less Homeobox 2 gene*

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

ERK: do inglês, extracellular signal-regulated kinases

FD: folículo dentário

FGFR2: do inglês *fibroblast growth factor receptor 2*, traduzido como receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2

FGFR2: Fator de crescimento de fibroblastos 2

GSK3 β : do inglês, *Glycogen synthase kinase 3 beta*

GST: genes supressores de tumores

H3K4Me3: Histona 3 tri-metilada na lisina 4

HADAC: histona deacetilase

HAT: histona acetil transferase

INGs: do inglês, *inhibitor of growth gene*

ISL1: do inglês, *ISL LIM Homeobox 1*

KO: do inglês, *knockout*

MAPK: do inglês Mitogen-activated protein kinase, traduzido como Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MAPK: do inglês, Mitogen-activated protein kinase

miRNA: microRNA

MSX2: do inglês. *Msh Homeobox 2*

mTOR: do inglês, *mammalian target of rapamycin*

NER: Do inglês nucleotide excision repair, traduzido como reparo por excisão de nucleotídeo

NF- κ B: factor nuclear kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde

p53: proteína codificada pelo gene P53

PHD : domínio Homeostático de Planta (Plant HomeoDomain)

PITX2: do inglês, *pituitary homeobox 2 gene*

PTCH1: gene homólogo 1 ao gene *patched* de *Drosophila*

PTCH2: gene homólogo 2 ao gene *patched* de *Drosophila*

RUNX1: do inglês, *runt-related transcription factor 1 gene*

SMO: gene *smoothened*

SUFU: gene supressor fusionado homólogo de *Drosophila*

TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide

- Figura 1.** Domínios das isoformas da proteína ING. O homeodomínio da planta (PHD) permite que essas proteínas se liguem à marca histona H3K4me3 e está presente em todas as INGs. O domínio de interação com laminina (LID) é importante para que eles possam interagir com o lamina A. A sequência de localização nuclear (NLS), promove a translocação das proteínas ING para o núcleo e também pode ligar-se ao supressor de tumor p53. Algumas proteínas, como a ING1b possuem motivo de interação com PCNA (PIP), e essa interação também é importante para promover a apoptose no estresse induzido por danos no DNA. A região polibásica (PBR) está presente apenas no ING1 e ING2. Esse motivo pode interagir com os fosfolipídios de sinalização bioativa (PIs) e a ubiquitina (Ub), o último dos quais pode servir para estabilizar a p53 com multi-monoubiquitinação. A função do bromodomain parcial (PBD) não foi definida, mas, como a região do tipo zipper de leucina (LZL), pode promover a multimerização da proteína ING e / ou a interação com outros membros dos complexos HAT e HDAC.
-
- Figura 2.** As proteínas ING participam da remodelação da cromatina. A proteína ING1, pode compor os complexos HDAC1 / 2 e promover a acetilação das histonas H3 e H4. Esta acetilação também pode se dar devido à ativação da p300 induzida pela ING1. A ING2 pode ligar-se a H3K4me3 ou H3K9me3 e promover tanto à ativação da HAT quanto da HMT. Por outro lado, ING3, como um membro do complexo hNuA4, promove a ativação HAT bem como a inibição da HMT através da proteína chaperona HP1. Por fim, as proteínas ING4 e ING5 (ambas em complexo com HBO1) foram descritas como fatores promotores de HAT. A ING5 também pode atuar como inibidora da metilação de histonas pois esta envolvida na inativação do complexo HMT SUV39h1 (Adaptado de Archambeau, Blondel e Pedoux, 2019).....
- Figura 3.** As proteínas ING podem regular o ciclo celular de maneira dependente ou independente da p53. O ciclo celular é regulado negativamente pelos INGs de várias maneiras. A ING1 interage com p53 e promove a ativação da p21. Além disso, a ING1 pode estabilizar a p53 por inibir a desacetilase (hSir2). As proteínas ING2, ING4 e ING5 podem induzir a regulação negativa do ciclo celular por meio da ativação de p300, levando à acetilação da região promotora da p53. Além disso, a ING2 pode constituir um complexo mSin3A que pode ativar diretamente a expressão de p21, inibindo assim o ciclo celular independentemente de

33

36

47

p53. Finalmente, ING3, ao inibir a ativação de PI3K / AKT, pode diminuir a expressão da ciclina D1 resultando em parada do ciclo celular. (Adaptado de Archambeau, Blondel e Pedoux, 2019).....

Figura 4.	Fotomicrografias representativas da imunexpressão nuclear e citoplasmática da proteína ING3 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C)Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.....	56
Figura 5.	Fotomicrografias representativas da imunexpressão nuclear e citoplasmática da proteína ING4 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C)Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.....	57
Figura 6.	Fotomicrografias representativas da imunexpressão nuclear e citoplasmática da proteína ING5 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C)Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.....	57
Figura 7.	Fotomicrografias representativas da imunexpressão nuclear da proteína p53 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C)Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.....	59
Figura 8.	Comparação entre os percentuais de positividade para as proteínas INGs e para a p53 entre os foliculos dentários e as lesões odontogênicas. (A) Redução na expressão da ING3 nos AMBs quando comparados aos FDs (p=0,003). (B) Redução na expressão da ING4 nos AMBs (p=0,001) e COs (p=0,002) quando comparados aos FDs e redução na expressão da ING4 nos AMBs quando comparados aos TOAs ((p=0,036). (C) Não houveram diferenças significativas entre as imunexpressões para a proteína ING5. (D) Aumento na expressão da p53 em AMBs (p=0,003) e COs (p=0,002) quando comparados aos FDs e aumento na expressão da p53 em AMBs (p<0,0001) e COs (p<0,0001) quando comparados aos TOAs.....	60

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes que serão analisadas no estudo.....	52
Quadro 2. Elenco de variáveis independentes que serão analisadas no estudo.....	53
Quadro 3. Especificidade, clone, fabricante, diluição e tempo de incubação dos anticorpos a serem utilizados.....	53

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1.	Mediana, quartil 25, quartil 75 e significância estatística (p-valor) para o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e teste Post-Hoc de Dunn para a expressão das proteínas ING nas diferentes localizações celulares comparadas entre os diferentes grupos. Natal-RN, 2019.	61
Tabela 2.	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunoexpressão de ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, desconsiderando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020.....	62
Tabela 3.	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunoexpressão de ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, considerando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020	63
Tabela 4.	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunoexpressão de p53, ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, desconsiderando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020	64
Tabela 5	Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunoexpressão de p53, ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, considerando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS.....	23
2.1.1	Ceratocisto Odontogênico	23
2.1.2	Ameloblatoma.....	27
2.1.3	Tumor Odontogênico Adenomatoide.....	30
2.2	FAMÍLIA DOS GENES INIBIDORES DE CRESCIMENTO (INHIBITOR OF GROWTH GENE – <i>ING</i>).....	33
2.2.1	ING1.....	36
2.2.2	ING2.....	39
2.2.3	ING3.....	41
2.2.4	ING4.....	42
2.2.5	ING5.....	43
2.3	AS INGs e a p53.....	43
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	48
4.3	POPULAÇÃO.....	48
4.4	AMOSTRA.....	48
4.5	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	49
4.5.1	Critérios de inclusão	49
4.5.2	Critérios de exclusão	49
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	49
4.7	VARIÁVEIS.....	50
4.8	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	51
4.8.1	Técnica imuno-histoquímica	51
4.8.2	Análise imuno-histoquímica	54

4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS.....	55
5.1	REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ING _s EM COs e AMBs	55
5.2	OS MECANISMOS COMPENSATÓRIOS ENTRE AS PROTEÍNAS ING _s SÃO MENOS EVIDENTES EM COs e AMB.....	61
5.3	A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ING _s NÃO ESTÁ RELACIONADA À EXPRESSÃO DA P53 EM LESÕES ODONTOGÊNICAS.....	64
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	
	ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Os cistos e tumores odontogênicos compreendem um conjunto de patologias classificadas de acordo com sua etiopatogênese e comportamento biológico, podendo apresentar natureza inflamatória, neoplásica ou do desenvolvimento (BILODEAU e COLLINS, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Dentre as lesões císticas de natureza odontogênica, destaca-se o ceratocisto odontogênico (CO), o qual apresenta comportamento biológico distinto dos outros cistos de desenvolvimento, exibindo maior infiltração e maiores taxas de recidiva (HENRIQUES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Em relação aos tumores odontogênicos, o ameloblastoma (AMB) representa a lesão mais prevalente, apresentando comportamento biológico agressivo e alta recorrência. Em contrapartida, o tumor odontogênico adenomatoide (TOA) se caracteriza como uma lesão pouco agressiva e com baixas taxas de recidiva (LIMA-VERDE-OSTERNE *et al.*, 2017; EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Os eventos moleculares envolvidos na heterogeneidade do comportamento destas lesões odontogênicas ainda não estão bem compreendidos. Sabe-se que vias que envolvem os mecanismos do ciclo celular e da apoptose são afetadas durante o processo de tumorigênese, resultando em um descontrole, total ou parcial, da proliferação celular além de evasão da supressão tumoral (HANNAN e WEINBERG, 2011). A proteína p53 possui a função de supressora tumoral e age como *checkpoint* durante o ciclo celular. Mutações no gene que a codifica ou defeitos na via de ativação desta proteína são achados comuns em neoplasias malignas, podendo também serem encontrados esporadicamente em neoplasias benignas (GURPINAR e VOUSDEN, 2015; SABAPATHY e LANE, 2017). Além disso, o processo neoplásico também envolve a evasão do processo de morte celular (HANNAN e WEINBERG, 2011). As vias regulatórias da apoptose, especialmente as que envolvem as proteínas Bax e Bcl-2 podem ser afetadas, resultando em maior sobrevivência das células neoplásicas (WILL e ADAMS, 2005; ELMORE, 2007; HASSAN *et al.*, 2014).

As proteínas INGs (*inhibitor of growth gene*) são produtos do *splicing* alternativo de seus respectivos genes, e desempenham papel de supressoras tumorais, estando associadas à regulação de funções celulares importantes como remodelação da cromatina, proliferação celular, replicação e reparo do DNA, migração celular e angiogênese (GARKAVTSEV *et al.*, 2004; GUNDUZ *et al.*, 2008; GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014). Estas proteínas podem agir por vias dependentes, ou independentes, da p53 na

sinalização do ciclo celular e da apoptose(GARKAVTSEV *et al.*, 1996; ELMORE, 2007; GUNDUZ *et al.*, 2008; GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014)6.

Estudos evidenciam que as lesões odontogênicas benignas de origem epitelial apresentam alterações na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose (METGUD e GUPTA, 2013; TENÓRIO *et al.*, 2018). Contudo, este será o primeiro estudo a investigar a correlação entre as proteínas INGs com proteínas que regulam o ciclo celular e a apoptose nestas lesões. Desta forma, este estudo tem como objetivo analisar a correlação entre a imunexpressão das proteínas INGs com a proteína p53 no componente epitelial de COs, AMBs sólidos e TOAs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS

A odontogênese representa um processo complexo que envolve a regulação de diversas vias de sinalização entre componentes celulares epiteliais e ectomesenquimais, as quais coordenam cronologicamente os processos de proliferação, diferenciação e migração celular que ocorrem até a formação e maturação dos tecidos dentários e periodontais (JUSSILA e THESLEF, 2012; ZHENG *et al.*, 2014). Durante este processo, ocorre degradação de diversos componentes teciduais, epiteliais e mesenquimais, que podem remanescer aprisionados nos ossos gnáticos e ao serem expostos à determinados estímulos podem dar origem a lesões de etiopatogenia diversa, como: císticas e neoplásicas benignas ou malignas (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; TAKATA; SLOOTWEG, 2017; WRIGHT, J.; VERED, M., 2017).

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizou a classificação das lesões de origem odontogênica, onde subdivide os cistos odontogênicos em inflamatórios ou de desenvolvimento, e classifica os tumores odontogênicos, em benignos e malignos, sendo subdivididos de acordo com o tecido de origem, podendo ser considerados: a) tumores com origem no epitélio odontogênico; b) tumores mistos, com a participação do epitélio odontogênico e do ectomesênquima odontogênico; ou c) tumores com origem no mesênquima e/ou ectomesênquima odontogênico com ou sem epitélio odontogênico (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

2.1.1 *Ceratocisto Odontogênico*

O ceratocisto odontogênico é considerado um cisto de desenvolvimento, caracterizado por crescimento mais infiltrativo e maiores taxas de recidiva. Acredita-se que esta lesão se origine de remanescentes da lâmina dentária ou de células basais do epitélio de revestimento oral (BISWAS *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018). Apesar de ser uma lesão de natureza cística prevalente, o CO pode possuir alterações moleculares relevantes, podendo estar associadas à distúrbios genéticos, como a Síndrome de Gorlin-

Goltz, também denominada Síndrome do Carcinoma Nervoide Basocelular (LI, 2011; GOMES *et al.*, 2017).

O comportamento biológico distinto desta lesão resultou em questionamentos quanto à sua etiopatogênese. A classificação das lesões odontogênicas pela OMS em 2005, trouxe a denominação tumor odontogênico ceratocístico, enquadrando esta lesão entre os tumores benignos de origem no epitélio odontogênico (BARNES *et al.*, 2005). Esta discussão persiste em torno de estudos que argumentam achados incomuns em COs, que diferem do esperado para uma lesão cística, como infiltração em tecidos adjacentes e a presença de cistos-filhos na cápsula de tecido conjuntivo (LIU *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2013; STOELINGA., 2019).

Além disso, a natureza neoplásica também é questionada em estudos moleculares envolvendo COs, os quais demonstram alterações genéticas envolvendo vias importantes, como a via *Hedgehog* (Hh). A principal delas é a mutação do gene homólogo 1 ao gene *patched* de *Drosophila* (PTCH1), porém, outras alterações menos frequentes também são evidenciadas, como mutações no gene *smoothened* (SMO), perda de heterozigidade (LOH, do inglês *loss of heterozigosity*) ligada ao gene supressor fusionado homólogo de *Drosophila* (SUFU) e mutações no gene homólogo 2 ao gene *patched* de *Drosophila* (PTCH2) (RUI *et al.*, 2014; SPEIGHT *et al.*, 2017). Esses achados têm sido mais prevalentes em casos de ceratocistos síndrômicos, quando comparados aos casos de COs esporádicos (BARRETO *et al.*, 2000; DURMAZ *et al.*, 2018). Ademais, a perda de heterozigidade ligada aos genes da família PTCH não são achados exclusivos do ceratocisto odontogênico, sendo também relatados no cisto odontogênico ortoceratinizado, e cisto odontogênico calcificante (GOMES e GOMEZ, 2011). Desta forma, apesar destes achados, a última classificação da OMS, em 2017, considerou a evidência de alterações moleculares ainda insuficiente para confirmar uma natureza neoplásica. Assim, a denominação foi reavaliada, voltando a ser estabelecida como ceratocisto odontogênico, e classificada junto aos cistos odontogênicos de desenvolvimento (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

É válido ressaltar que as alterações significativas na expressão de genes supressores tumorais em COs, podem estar ligadas a desregulação de atividades vitais, como o ciclo celular, a apoptose e a proliferação (GOMES *et al.*, 2017). Em relação a estas alterações, Tekkesin, Mutlu e Olgak (2012) compararam a imunoexpressão das proteínas Bax, Bcl-2 e Ki-67 em lesões odontogênicas de origem epitelial. Este estudo evidenciou que o ceratocisto odontogênico exibiu maior expressão de Ki-67 em seu componente epitelial, quando comparado ao ameloblastoma e ao cisto odontogênico

radicular. Além disso, foi observada maior expressão da proteína Bcl-2 em AMBs e COs quando comparados aos cistos radiculares.

Em um estudo mais recente, Tenório *et al.* (2018) também realizaram uma análise imunohistoquímica demonstrando a expressão das proteínas p53, Bax e Bcl-2 em lesões odontogênicas de origem epitelial. Os autores compararam, através de uma análise semiquantitativa, a imunoexpressão destas proteínas em COs, AMBs e TOAs, demonstrando que os COs exibiam expressão das proteínas p53 e Bax semelhante à apresentada pelos AMBs. Além disso, este estudo também evidenciou uma correlação negativa entre as proteínas p53 e Bax nestas lesões, corroborando para a hipótese de que a maior expressão da proteína p53 resulta em maior sinalização anti-apoptótica, favorecendo a sobrevivência celular, e conseqüentemente, podendo contribuir para a promoção de um processo tumorigênico.

Em relação a epidemiologia do ceratocisto odontogênico, é mais comumente encontrado em indivíduos na segunda e terceira décadas de vida, frequentemente em região posterior da mandíbula, próximo à região dos terceiros molares e ramo ascendente. (FINKELSTEIN *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2016; LIMA-VERDE-OSTERNE *et al.*, 2017). Em geral, os COs não resultam em sintomatologia dolorosa, desta forma, são mais facilmente diagnosticados como achados ocasionais em exames imaginológicos como radiografias e tomografias computadorizadas. No caso de lesões mais agressivas, podem ser observados sinais e sintomas como tumefação óssea, deslocamento dentário, dor, trismo e parestesia (HENRIQUES *et al.*, 2009; FINKELSTEIN *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2016).

No que se refere aos aspectos radiográficos, o ceratocisto odontogênico apresenta-se mais comumente como uma lesão radiolúcida unilocular exibindo limites bem definidos, que pode, ou não, estar associada a coroa de dentes não erupcionados. Em alguns casos, os COs podem exibir crescimento mais infiltrativo, resultando em aspecto multilocular ou na presença de septos radiopacos incompletos no interior da lesão (MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2010; SANCHEZ-BURGOS *et al.*, 2014; BORGUESI *et al.*, 2018). Em tomografias computadorizadas, esta lesão pode exibir características imaginológicas distintas dependendo da localização afetada. Lesões em mandíbula tendem a se apresentar como hipodensidades bem definidas que apresentam maior crescimento mesiodistal ao longo do osso afetado, resultando em menor erosão ou menor expansão da cortical óssea. Já lesões localizadas em maxila, tendem a exibir um crescimento que parece resultar de maior pressão osmótica, sendo possível observar, com

mais frequência, a presença de lesões hipodensas que ocasionam erosão ou perfuração da cortical óssea (BORGUESI *et al.*, 2018).

Em relação aos aspectos histopatológicos, o ceratocisto odontogênico exibe um revestimento de epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado, apresentando camada basal com núcleos hipercromáticos, em geral organizados em paliçada, e camada superficial exibindo corrugações. Frequentemente observa-se a presença de descamações de ceratina para o interior do lúmen cístico. Devido à interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo apresentar-se plana, é comum a presença de áreas de destacamento do componente epitelial da cápsula cística. Esta, por sua vez, é composta de tecido conjuntivo fibroso denso e pode conter um número variado de cistos-filhos (CUNHA *et al.*, 2016; BILODEU e COLLINS, 2017; KAHRAMAN; GUHAN; CELASUN, 2018; VALLEJO-ROSETO *et al.*, 2020).

O tratamento do ceratocisto odontogênico pode representar um desafio, tendo em vista que a remanescência de cistos-filhos após o procedimento cirúrgico, pode resultar em recidiva da lesão. Desta forma, diversas manobras terapêuticas são evidenciadas na literatura, dependendo da avaliação do tamanho da lesão e sua relação com as estruturas adjacentes. Para lesões menores, pode-se optar pela enucleação. Já no caso de lesões mais extensas, indica-se a marsupialização e descompressão da cavidade cística, seguida por enucleação (SLUSARENKO DA SILVA; STOELINGA; NACLÉRIO-HOMEM, 2019; VALLEJO-ROSETO *et al.*, 2020). Para evitar a persistência de fragmentos de epitélio cístico no interior da loja cirúrgica, podem-se ainda serem utilizadas terapias complementares à enucleação, como a irrigação com solução de Carnoy, a osteotomia periférica, ou a eletrocauterização. Em caso de lesões mais agressivas, que exibem maior expansão, indica-se a ressecção cirúrgica com margens de segurança, que pode ser seguida de enxerto ósseo para aceleração do processo de reparo (ALCHALABI; MERZA; ISSA, 2017; KARACA *et al.*, 2018; POLAK *et al.*, 2019).

A escolha do tratamento tem um grande impacto no prognóstico do paciente, uma vez que a recorrência da lesão é um achado clínico frequente para o ceratocisto odontogênico. Karaca *et al.* (2018) realizaram um estudo longitudinal, onde acompanharam um total de 27 pacientes que realizaram tratamentos diversos para o CO. Os autores constataram que 14,8% dos pacientes exibiram recorrência da lesão em períodos entre 5 a 12 anos de acompanhamento. Observaram ainda que não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de recorrência e os parâmetros clínicos exibidos pela lesão primária, bem como entre o tratamento escolhido e a recidiva do cisto. Em contrapartida, Slusarenko Da Silva, Stoelinga e Naclério-Homem (2019), realizaram uma revisão

sistemática com metanálise e demonstraram que o uso da solução de Carnoy como adjuvante ao tratamento cirúrgico por enucleação diminui as chances de recorrência da lesão, quando comparado aos casos em que foram realizados apenas a enucleação cirúrgica. A compreensão dos eventos moleculares envolvidos na etiopatogênese do ceratocisto odontogênico pode fornecer evidências para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos, e contribuir para menores índices de recorrência desta lesão.

2.1.2 Ameloblastoma

O ameloblastoma é uma neoplasia benigna originada do epitélio odontogênico, sem a participação do ectomesênquima (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Acredita-se que esta lesão se origine de remanescentes da lâmina dentária, porém também existem discussões sobre uma possível origem no revestimento epitelial de cistos odontogênicos preexistentes. A origem de tecidos do órgão dentário vem sendo sustentada pela evidência de que esta lesão exibe alta expressão de genes como o *PITX2*, *MSX2*, *DLX2*, *RUNX1* e *ISL1*, considerados marcadores epiteliais importantes em fases precoces da odontogênese (SANTOS *et al.*, 2010; BROWN; BETZ, 2015; HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; ENFFION *et al.*, 2017). Estudos epidemiológicos indicam que o ameloblastoma é a neoplasia odontogênica mais prevalente, representando aproximadamente 11,0 a 45,2% de todos os tumores odontogênicos em países subdesenvolvidos. Em outros países, pode representar o segundo tumor mais frequente, sendo o primeiro o odontoma. Estas diferenças podem ser explicadas por variações étnico-geográficas (OSTERNE *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2014).

No grupo dos tumores odontogênicos, o ameloblastoma se destaca pelo seu curso clínico agressivo e alto índice de recidivas (LEDESMA-MONTES *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2008; HENRIQUES *et al.*, 2009). Estudos demonstram que este tumor apresenta alterações moleculares específicas, sendo a principal delas a alta frequência de mutações no gene *BRAF* (V600E), que pode estar presente em aproximadamente 63,7% dos casos de AMBs (KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015). Sandra *et al.* (2004) evidenciou que o crescimento tumoral envolvido na patogênese dos AMBs pode estar relacionado à sinalização da via MAPK, e corroborando com esta evidência, Kumamoto *et al.* (2004) observaram a presença de uma superexpressão das proteínas Ras,

c-Raf, MEK1, and ERK1/2 em espécimes parafinados, fortalecendo a hipótese de que esta via pode estar envolvida no aumento da proliferação celular em AMBs.

Além disso, mais recentemente, importantes estudos genéticos evidenciaram a presença de alterações importantes envolvendo genes como o Fator de crescimento de fibroblastos 2 (*FGFR2*), o *KRAS*, o *NRAS* e o *HRAS*, genes fazem parte da via MAPK (KURPPA *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.* 2014). Estes avanços têm contribuído para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas, tendo como principais alvos, os componentes alterados da via MAPK, porém, o processo envolvido na patogênese dos AMBs ainda não está esclarecido, e apesar de o uso destas terapias causarem boas respostas clínicas na redução do tamanho da lesão, ainda existem muitos efeitos colaterais que podem indicar riscos para os (YOU *et al.*, 2019).

No que diz respeito às características clínico-patológicas e radiográficas, o ameloblastoma é subclassificado em três variantes: sólido (multicístico), unicístico e periférico (extra-ósseo) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; WRIGHT; VERED, 2017). Em geral, são mais prevalentes em adultos a partir da quarta década de vida, sem predileção por sexo (HERTOG *et al.*, 2012). Clinicamente, acometem com maior frequência a região posterior da mandíbula e se caracterizam como massas tumorais assintomáticas, de crescimento lento e invasivo, que podem levar à perfuração óssea e infiltração dos tecidos moles (KREPPEL; ZOLLER, 2018; RUSLIN *et al.*, 2018). Pelo comportamento mais agressivo, os AMBs são lesões bastante osteolíticas normalmente detectadas como imagens radiolúcidas uni ou multiloculares, podendo apresentar-se difusas, em padrões de “bolhas de sabão” ou bem definidas com margens escleróticas (KREPPEL; ZOLLER, 2018).

Os AMBs sólidos representam a variante mais comum e também a mais agressiva, por estar associada à piores prognósticos e maiores índices de recidiva (BLACK; ADDANTE; MOHILA, 2010; YANG *et al.*, 2017). Clinicamente, acomete com maior frequência adultos entre 30 e 60 anos, são assintomáticos, e normalmente são encontrados como achados radiográficos ocasionais. Consistem em lesões tumorais de crescimento lento, expansivo e infiltrativo, mais frequentemente envolvendo a região posterior de mandíbula. Com menor frequência, podem resultar em alterações oclusais, mobilidade dentária e, mais raramente, dor e parestesia (YANG *et al.*, 2017; KREPPEL; ZOLLER, 2018; RUSLIN *et al.*, 2018). Os AMBs sólidos são também denominados multicísticos, por apresentarem o padrão radiográfico clássico de “bolhas de sabão”, caracterizado como uma área radiolúcida multilocular, porém algumas lesões podem apresentar imagens uniloculares bem definidas (BLACK; ADDANTE; MOHILA, 2010).

Em relação aos achados histopatológicos, os AMBs sólidos apresentam variações morfológicas e podem ser subclassificados em diversos padrões, incluindo: folicular, plexiforme, acantomatoso, de células basais, de células granulares e desmoplásico. Uma mesma lesão pode apresentar estes arranjos isoladamente ou combinados, sendo mais frequentes os padrões folicular e plexiforme. Ainda não há evidências de que os arranjos histopatológicos influenciem no comportamento ou no prognóstico das lesões (ALVES et al., 2012; HERTOOG, 2012; YANG et al., 2017).

O padrão histopatológico folicular é caracterizado por ilhas e ninhos de epitélio odontogênico, circundados por células semelhantes a ameloblastos, as quais se caracterizam pelo formato colunar, hipercromatismo, disposição em paliçada e polarização nuclear reversa. No interior das ilhas e ninhos, podem ser observadas células frouxamente arranjadas, as quais se assemelham ao retículo estrelado do órgão do esmalte. O arranjo plexiforme, por sua vez, consiste basicamente em cordões anastomosados de epitélio odontogênico. Por sua vez, os padrões acantomatoso, de células basais e de células granulares são caracterizados pela presença de diferenciação escamosa, células basalóides e células com citoplasma granuloso, respectivamente, no interior de ilhas de epitélio odontogênico. Finalmente, o padrão desmoplásico caracteriza-se pela presença de ilhotas e ninhos de epitélio odontogênico de permeio a um estroma com marcante desmoplasia (EL-NAGGAR et al., 2017).

Com relação ao ameloblastoma do tipo unicístico, diferencia-se como uma variante específica por ser mais comum em pacientes jovens e apresentar comportamento menos agressivo e menor índice de recorrências em relação ao subtipo sólido (HERTOOG, VAN-DER-WAAL, 2010; SIRIWARDENA *et al.*, 2018). Clinicamente, são lesões assintomáticas que podem ocasionar tumefações dos ossos gnáticos, sendo mais frequentes em região posterior de mandíbula (SIRIWARDENA *et al.*, 2018). O ameloblastoma unicístico apresenta achados imaginológicos pouco específicos, manifestando-se normalmente como imagem radiolúcida unilocular com limites bem definidos que podem, ou não, estar associados à coroa de dentes não erupcionados. As características clínicas e radiográficas desta lesão podem mimetizar cistos odontogênicos, a exemplo do cisto dentífero e do ceratocisto odontogênico (HENRIQUES et al., 2009; SEINTOU, MARTINELLI-KLAY e LOMBARDI, 2014).

Mesmo sendo raro, o ameloblastoma pode acometer regiões periféricas, principalmente região de rebordo alveolar posterior da mandíbula. Esta variante representa cerca de 1 a 10% das lesões de ameloblastoma. Clinicamente manifesta-se

como uma lesão assintomática que exibe crescimento exofítico, nodular ou tumoral, e não apresenta alterações de coloração em sua superfície (BARNES et al., 2005; SEINTOU, MARTINELLI-KLAY e LOMBARDI, 2014). Devido a sua apresentação inespecífica, faz diagnóstico diferencial com outras lesões como a lesão periférica de células gigantes e o fibroma ossificante periférico. Nos exames radiográficos, os AMBs periféricos podem apresentar uma discreta erosão óssea, porém estes achados são incomuns (NEVILLE et al., 2016). Os AMBs periféricos apresentam padrões histopatológicos similares aos encontrados na variante sólida (HERTOG et al., 2012).

A variante clinico-patológica do ameloblastoma deve influenciar diretamente na escolha do tratamento. O manejo clínico é sempre cirúrgico, porém, existem três tipos de regimes terapêuticos descritos com maior frequência na literatura: cirurgias conservadoras (curetagem e enucleação), marsupialização seguida por ressecção e cirurgia radical (ressecção em bloco) (HERTOG, VAN-DER-WAAL, 2010; EFFIOM et al., 2018; KREPPEL; ZOLLER, 2018; RUSLIN et al., 2018).

As modalidades terapêuticas mais radicais são indicadas para AMBs sólidos, devido a evidência de que esta lesão apresenta alta recorrência após tratamento conservador, recomenda-se a ressecção em bloco, com margem de segurança de 1,5 a 2,0 cm. Em contrapartida, os AMBs unicísticos apresentam menor índice de recorrências, motivo pelo qual se indicam tratamentos conservadores, tais como curetagem e enucleação (HERTOG, VAN-DER-WAAL, 2010; EFFIOM et al., 2018; KREPPEL; ZOLLER, 2018). Contudo, Mahadesh et al. (2011) defendem que os AMBs unicísticos com invasão mural deveriam ser tratados através de técnicas mais agressivas. Em virtude do comportamento inócuo dos AMBs periféricos, o tratamento mais adequado para esta variante consiste na excisão cirúrgica conservadora, inclusive para lesões recidivantes (NEVILLE et al., 2016).

2.2.3 Tumor Odontogênico Adenomatoide

O tumor odontogênico adenomatoide (TOA) é uma lesão de natureza benigna, inicialmente descrita como uma variante do ameloblastoma. Contudo, em 1969, Philipsen e Birn evidenciaram que suas características clínicas e comportamento biológico são completamente distintas daquelas tipicamente observadas nos AMBs e propuseram o termo tumor odontogênico adenomatoide (IDE et al., 2013; PHILIPSEN, KHONGKHUNTHIANG e REICHART, 2016). A partir de então, a lesão se caracterizou

como uma entidade patológica distinta e a denominação passou a ser utilizada pela Organização Mundial de Saúde desde a primeira classificação de tumores odontogênicos (PINDBORG; KRAMER, 1971), até a classificação atual (EL-NAGGAR et al., 2017).

Esta lesão compreende 2 a 9% dos tumores odontogênicos e possui histogênese incerta. Acredita-se que o tumor se origina a partir de restos da lâmina dentária ou do epitélio reduzido do órgão do esmalte. (OSTERNE et al., 2011; THAKUR *et al.*, 2016; BILODEAU e COLLINS, 2017). O TOA se destaca dentre as lesões odontogênicas por exibir um comportamento clínico bastante indolente, levantando a hipótese de uma natureza mais hamartomatosa do que neoplásica (THAKUR *et al.*, 2016).

Em contrapartida, um estudo mais recente demonstrou a frequência de mutação nos genes KRAS 12V e KRAS 12G, bem como expressão positivas das proteínas envolvidas na via MAPK/ERK em TOAs, indicando uma possível via tumorigênica envolvida na patogênese desta lesão (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2016). Em um outro interessante estudo, Coura et al. (2019) evidenciaram a mutação no códon 12 do gene KRAS como um achado frequente em TOAs, e que estas mutações devem resultar em maior ativação da via MAPK, uma vez que os TOAs evidenciam maior expressão da ERK1/2 fosforilada. Estes achados favorecem a hipótese de que modificações genéticas específicas podem estar associadas à etiopatogênese desta lesão.

Reichart et al. (2016), realizaram um levantamento da literatura sobre as alterações imunohistoquímicas e moleculares presentes nos TOAs. Os autores demonstraram que a maior parte dos estudos evidenciam baixa expressão de marcadores de proliferação e apoptose, como o Ki-67 e o Bcl-2, bem como menor expressão da proteína p53, quando comparada aos AMBs. Além disso, os TOAs exibem maiores expressões de proteínas associadas à ameloblastos, indicando uma maior diferenciação funcional dos componentes desta lesão. Estes achados corroboram para a hipótese em que se defende um comportamento mais condizente com uma anomalia de desenvolvimento ou hamartoma, do que com uma neoplasia verdadeira.

Clinicamente, o tumor odontogênico adenomatoide se apresenta como massa sólida de crescimento lento e bem delimitado, em geral, assintomática. Estas características retardam seu diagnóstico clínico, que frequentemente representa um achado ocasional em exames imagiológicos. O TOA acomete com maior frequência indivíduos na segunda década de vida, com predileção pelo sexo feminino. Quanto à localização, há uma maior incidência na maxila em relação à mandíbula, sendo a região anterior o sítio anatômico mais afetado. Em casos mais raros, o crescimento da lesão pode resultar em expansão de corticais ósseas e assimetria facial, bem como ocasionar o

deslocamento de dentes adjacentes (IDE et al., 2013; EL-NAGGAR et al., 2017). Em 60% a 73% dos casos, a lesão encontra-se associada a dentes inclusos, preferencialmente os caninos (BILODEAU; COLLINS, 2017).

Vale ressaltar que o tumor odontogênico adenomatoide possui três variantes clinicopatológicas: intraóssea folicular, intraóssea extrafolicular e a periférica (extraóssea). A distinção entre essas variantes é feita com base em sua localização e aspectos radiográficos. O TOA do tipo folicular apresenta-se como uma imagem radiolúcida bem delimitada, circundando a coroa de um dente incluído, estendendo-se ao longo da raiz, ultrapassando a junção cimento-esmalte. Por sua vez, o tipo extrafolicular não está associado a dentes inclusos e manifesta-se como uma imagem radiolúcida unilocular. Ambas as variantes intraósseas podem evidenciar áreas de focos radiopacos discretos no interior das lesões. A lesão pode, ainda, possuir localização extraóssea e estar associada a uma discreta erosão no osso alveolar, ou ainda, a ausência de sinais de destruição óssea (IDE et al., 2013; EL-NAGGAR et al., 2017; BILODEAU; COLLINS, 2017).

Do ponto de vista histopatológico, o referido tumor apresenta células epiteliais odontogênicas com morfologia variada, incluindo células fusiformes, cuboidais e colunares, dispostas em lençóis, ilhas, estruturas ductiformes e arranjos semelhantes a rosetas, de permeio a um escasso estroma de tecido conjuntivo fibroso. Na porção central das rosetas e no lúmen das estruturas ductiformes, pode ser evidenciado um material eosinofílico amorfo. As estruturas semelhantes a ductos exibem células periféricas com morfologia cúbica a colunar, com os núcleos polarizados no sentido oposto à superfície luminal. Também é comum a presença de focos de calcificação distrófica. A lesão é envolvida por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo fibroso denso (DE MATOS et al., 2012; THAKUR et al., 2017).

O tratamento do tumor odontogênico adenomatoide é a excisão cirúrgica local, que pode ser realizada por meio de enucleação ou curetagem. Por se tratar de uma lesão bem delimitada, com cápsula fibrosa espessa, sua remoção é considerada fácil e casos de recidiva são raros (BILODEAU; COLLINS, 2017).

2.2 FAMÍLIA DOS GENES INIBIDORES DE CRESCIMENTO (INHIBITOR OF GROWTH GENE – *ING*)

Os genes inibidores do crescimento (do inglês, *inhibitor of growth genes* ou simplesmente *ING*) constituem uma família de cinco membros cuja expressão se dá constitutivamente por vias dependentes de ubiquitinação em tecidos do corpo humano,

e pode variar de acordo com a localização e estágios de desenvolvimento (COLES e JONES, 2009; GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; TALLEN et al., 2014). Estes genes estão localizados em cinco cromossomos diferentes, codificando 5 tipos de genes filogeneticamente conservados (COLES; JONES, 2009). Os genes INGs codificam proteínas de mesmo nome envolvidas na modulação eventos transcricionais relacionados à apoptose, ciclo celular e senescência, além de outras funções celulares (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014). Tendo em vista que estas funções resultam no controle da proliferação celular, os INGs são classificados como genes supressores tumorais (GSTs) do tipo II (YTHIER et al., 2008).

O gene ING 1, inicialmente denominado p33ING1, foi o primeiro gene da família a ser identificado. Garkavtsev et al. (1996), realizaram ensaios de transfecção em ratos nude, e observaram que a superexpressão do gene ING1 resultava em inibição do crescimento celular, enquanto o silenciamento deste gene resultou em estímulos à tumorigênese. Os autores observaram ainda a presença de mutação do ING1 em linhagens de células neoplásicas isoladas de neuroblastomas e câncer de mama. Os genes ING 2, ING3, ING4 e ING5 foram descobertos posteriormente, baseados no sequenciamento do DNA do ING1, uma vez que estes genes exibem de 32 à 75% de seqüências homólogas (HE et al., 2005).

As proteínas INGs se denominam de acordo com os respectivos genes codificantes, sendo um total de cinco proteínas. Estas proteínas possuem um domínio comum denominado C-terminal, e se distinguem estruturalmente em uma porção denominada N-terminal. Além disso, as INGs possuem outros domínios (Figura 1) que permitem a sua ligação à regiões específicas da cromatina, bem como à complexos proteicos. Estas estruturas são as principais responsáveis pela variedade de funções moduladoras que as INGs podem exercer (RUSSELL *et al.*, 2006; DANTAS *et al.*, 2019). Por meio do homeodomínio de planta (PHD), região que codifica uma extremidade do tipo dedo de zinco que é extremamente conservada em toda família ING, estas proteínas são capazes de se ligar à histonas e sinalizar para ação de enzimas HAT (histona acetiltransferase) ou HADAC (histona deacetilase) na cromatina (DOYON *et al.*, 2006; BOSE *et al.*, 2013; DANTAS *et al.*, 2019). Estas proteínas possuem também um domínio de interação com a laminina A (LID), e uma seqüência de localização nuclear (NLS), os quais promovem a translocação das INGs para o núcleo e, provavelmente, são responsáveis pela interação com a proteína p53. Além disso, algumas INGs, como a ING1, possui um motivo de interação com à proteína PCNA (PIP), que tem papel

importante na regulação da apoptose (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; DANTAS *et al.*, 2019).

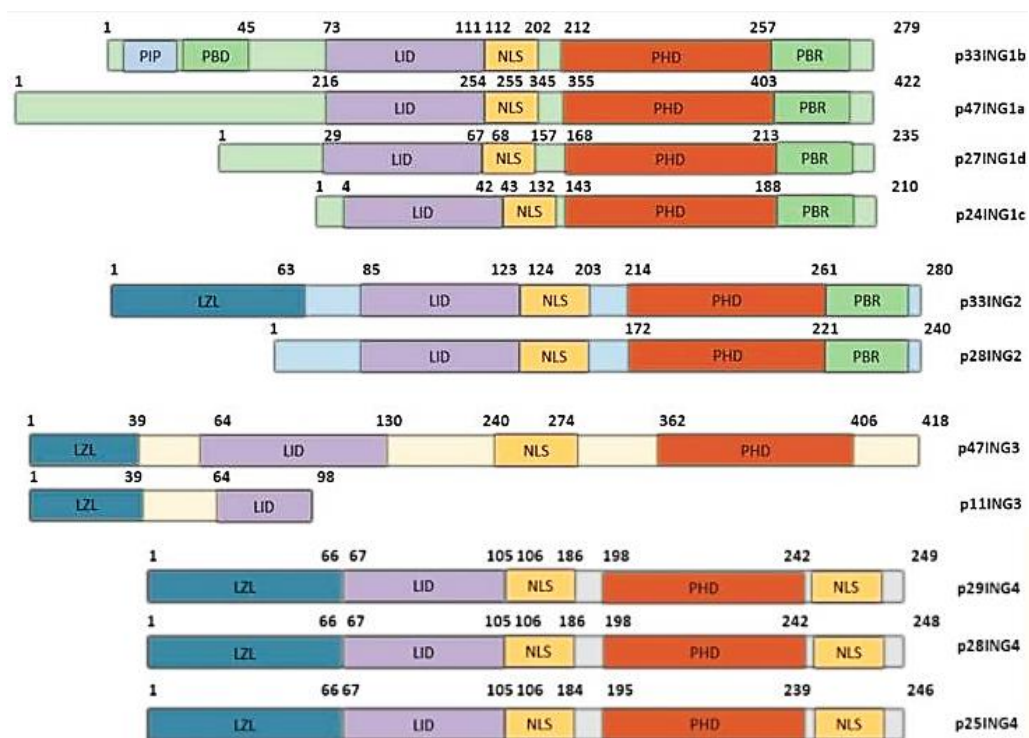


Figura 1. Domínios das isoformas da proteína ING. O homeodomínio da planta (PHD) permite que essas proteínas se liguem à marca histona H3K4me3 e está presente em todas as INGs. O domínio de interação com laminina (LID) é importante para que eles possam interagir com o lamina A. A sequência de localização nuclear (NLS), promove a translocação das proteínas ING para o núcleo e também pode ligar-se ao supressor de tumor p53. Algumas proteínas, como a ING1b possuem motivo de interação com PCNA (PIP), e essa interação também é importante para promover a apoptose no estresse induzido por danos no DNA. A região polibásica (PBR) está presente apenas no ING1 e ING2. Esse motivo pode interagir com os fosfolipídios de sinalização bioativa (PIs) e a ubiquitina (Ub), o último dos quais pode servir para estabilizar a p53 com multi-monoubiquitinação. A função do bromodomain parcial (PBD) não foi definida, mas, como a região do tipo zipper de leucina (LZL), pode promover a multimerização da proteína ING e / ou a interação com outros membros dos complexos HAT e HDAC. Adaptado de Dantas et al. (2019)

Acredita-se que as proteínas INGs também sejam reguladas em eventos pos-transcricionais, por meio de *splicings* alternativos que possibilitam uma maior variedade de funções dentro do metabolismo celular. Acredita-se que estas proteínas possam atuar como pontos de checagem durante a progressão do ciclo celular, em um mecanismo dependente da p53, além de terem um importante papel na regulação epigenética, onde também participam do controle da proliferação celular, apoptose e senescência, de maneira independente da p53 (SOLIMAN e RIABOWOL, 2007; YTHIER et al., 2008;

COLES e JONES, 2009; DANTAS *et al.*, 2019). As INGs podem ainda se relacionar com o processo de proliferação celular de maneira dependente da proteína PCNA, promovendo a estabilidade do genoma celular durante o processo de replicação (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014).

Além disso, estas proteínas podem atuar de forma indireta na regulação de outras funções celulares, devido a suas propriedades epigenéticas. Evidências apontam que as proteínas ING1 e ING2 podem participar do reparo do DNA, mais especificamente da via de reparo excisão de nucleotídeos (NER), regulando a metilação do DNA durante a progressão do reparo pela via NER (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014). Já a proteína ING4 tem sido apontada como possível moduladora no processo de migração celular e angiogênese, por meio de controle transcricional dos componentes da via NF- κ B envolvidos neste processo (DANTAS *et al.*, 2019).

A regulação epigenética parece representar uma propriedade de todas as proteínas da família ING. Acredita-se que isto seja possível, pois o PHD é um domínio conservado entre todas estas proteínas. Esse domínio conservado confere às proteínas INGs afinidade de ligação à complexos de histona acetil transferase (HAT) e/ou histona deacetilase (HDAC) e à estrutura de diferentes histonas na cromatina (Figura 2). Desta forma, acredita-se que estas proteínas estejam envolvidas em diversas funções celulares por meio da regulação da transcrição ou silenciamento de genes específicos (SOLIMAN; RIABOWOL, 2007; GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; LEIGHTON *et al.*, 2017; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019).

Diversos estudos tem evidenciado que o silenciamento de cada um dos genes ING resulta em alterações moleculares específicas e podem estar associados à diversos distúrbios de desenvolvimento, além de contribuir para o surgimento de neoplasias em diferentes tecidos. Estes achados enfatizam a função comum das proteínas ING como supressoras tumorais, uma vez que em condições normais, estão intimamente

relacionadas ao controle do ciclo celular e à mecanismos de diferenciação celular e apoptose (DANTAS *et al.*, 2019).

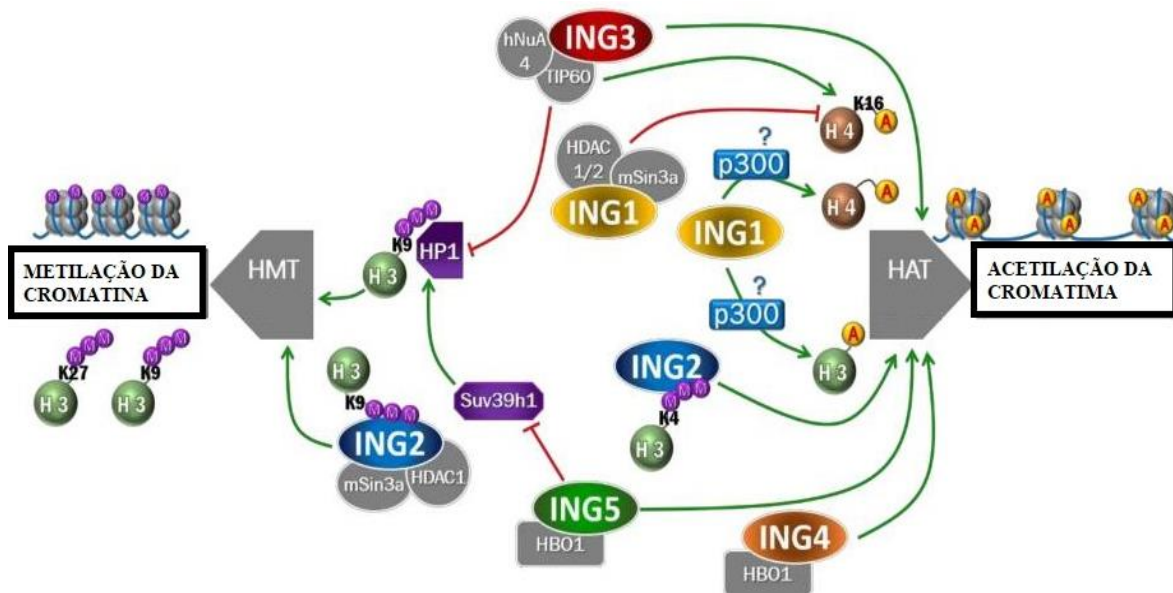


Figura 2. As proteínas ING participam da remodelação da cromatina. A proteína ING1, pode compor os complexos HDAC1 / 2 e promover a acetilação das histonas H3 e H4. Esta acetilação também pode se dar devido à ativação da p300 induzida pela ING1. A ING2 pode ligar-se a H3K4me3 ou H3K9me3 e promover tanto à ativação da HAT quanto da HMT. Por outro lado, ING3, como um membro do complexo hNuA4, promove a ativação HAT bem como a inibição da HMT através da proteína chaperona HP1. Por fim, as proteínas ING4 e ING5 (ambas em complexo com HBO1) foram descritas como fatores promotores de HAT. A ING5 também pode atuar como inibidora da metilação de histonas pois esta envolvida na inativação do complexo HMT SUV39h1 (Adaptado de Archambeau, Blondel e Pedoux, 2019).

2.1 ING1

O ING1 foi o primeiro gene da família a ser estudado. Este gene está localizado no cromossomo 13q34 e codifica uma proteína de mesmo nome, que possui 4 isoformas já identificadas. Todas as variantes da proteína ING1 possuem como função comum a inibição do crescimento, uma vez que estão envolvidas na regulação de processos como proliferação, reparo do DNA e apoptose, por atuarem como checkpoints do ciclo celular entre as fases G1/S e G2/M (LI *et al.*, 2011; THAKUR *et al.* 2014; ZHANG *et al.*, 2017; DANTAS *et al.*, 2019).

Contudo, apesar destas variantes possuírem grande parte de sua estrutura conservada, elas se diferenciam em uma cadeia aminoterminal, que pode atribuir funções

biológicas específicas à cada isoforma (DANTAS *et al.*, 2019). Soliman e Riabowol (2007) e Soliman *et al.* (2008) demonstraram que a proteína ING1a possui capacidade de inibir o crescimento e induzir a senescência por meio da ativação da proteína retinoblastoma (pRb), que age como importante supressor tumoral. Por outro lado, a proteína ING1b, além de atuar nestes mesmos processos, parece estar envolvida em outros eventos celulares como a regulação da apoptose, sinalizações hormonais e reparo do DNA.

Em um interessante estudo, Nourani *et al.* (2001) evidenciaram a presença da subunidade protéica, Yng2p, em um complexo denominado NuA4, responsável pela acetilação das histonas 2A e 4. Esta subunidade é isolada de leveduras e representa um PHD do tipo dedo de zinco homólogo ao homeodominio apresentado pela proteína ING1humana. A Yng2 desempenha papel importante no crescimento e na manutenção da viabilidade celular. Os autores demonstraram que ela possui capacidade de interagir diretamente com o complexo NuA4, atuando como regulador epigenético essencial na progressão do ciclo celular. Acredita-se que esta interação ocasione uma hiperacetilação nessas regiões e ative a proteína p53, que passa a atuar como fator transcrricional junto ao complexo. Desta forma, a partir destes achados, os autores hipotetizam que a ING1 pode ter um importante papel na regulação do crescimento celular, de maneira dependente da p53.

Posteriormente, Nourani *et al.* (2003), analisaram a interação da subunidade protéica Yng2 com a regulação transcrricional dependente da p53. Os autores demonstraram que deleção desta proteína, resultou em inativação do complexo Nu4A, e consequente inativação da p53. Neste mesmo estudo, foi observada a relação de outras subunidades conservadas das proteínas INGs em leveduras. Demonstrou-se que as mesmas proteínas possuem outros domínios, como o Pho23, que também possuem a capacidade de interação com os complexos de acetilação de histonas, como o Nu3A e Nu4A. Curiosamente, os autores elucidaram que a ativação do Pho23, resultou em inativação do complexo Nu4A, e consequente inativação da p53. Desta forma, acredita-se que a proteína ING1, bem como outras proteínas INGs, desempenham papéis essenciais na modulação epigenética, e por isso, influenciem indiretamente em outras funções, como a apoptose, a senescência e o reparo do DNA.

Em relação ao processo de tumorigênese, a perda de expressão da proteína ING1 tem sido relatada em algumas neoplasias, inclusive em carcinomas na região de cabeça e pescoço (LI *et al.*, 2011). Em alguns casos, como observado no melanoma e na leucemia

linfoblástica, vê-se uma diminuição ou perda da expressão nuclear do ING1 em contraste à um aumento de sua expressão citoplasmática (YTHIER et al., 2008). Alguns autores acreditam que perda de expressão desta proteína possa ser resultado da redução na expressão ou na instabilidade de seu RNA mensageiro (RNAm), ou ainda de outros mecanismos como a perda de heterozigotidade e a hipermetilação na região do promotor do ING1 (COLES E JONES, 2009; YTHIER et al., 2009).

Toyama et al. (1999) elucidaram que 44% das células neoplásicas isoladas de câncer de mama possuem uma expressão do RNAm do ING1 de 2 a 10 vezes menor quando comparadas ao controle positivo. Em um estudo mais recente, Thakur et al. (2012) transplantaram células neoplásicas de câncer de mama para linhagem de ratos e compararam dois grupos: um tratado apenas com uma droga antineoplásica (5azaC) e um segundo grupo em que, além da exposição à droga, foi induzida uma superexpressão da proteína ING1. Os autores evidenciaram que a superexpressão da proteína resultou em eventos epigenéticos capazes de aumentar a sensibilidade do tumor à 5azaC, resultando em um aumento significativo da morte celular para as células neoplásicas.

A menor expressão desta proteína também está associada à maiores níveis de metástase para o câncer de mama (THAKUR et al., 2014). Com base nestes achados, é possível hipotetizar que a perda de expressão da proteína ING1 está intimamente relacionada à desregulação de vias importantes no controle do ciclo celular e, portanto, contribui para o processo de tumorigênese. Vale ressaltar, que a diminuição desta expressão também foi observada em linfomas de células B e carcinomas de células escamosas oral, indicando que este não é um achado exclusivo das neoplasias de mama (ZHENG *et al.*, 2008; COLES E JONES, 2009)

Evidências apontam ainda que a ING1 pode estar associada à modulação da transcrição de RNA ribossomal (rRNA) e influenciar em vias regulatórias positivas (ERK, mTOR, CBP, c-Myc) e negativas (p53, Rb, PTEN, ARF, AMPK, GSK3 β) do crescimento celular. Rajarajacholan, Thalappilly e Riabowol (2017) demonstraram que em linhagens de células neoplásicas (HeLa e HEK293) a expressão da proteína ING1 está associada a regulação de rRNA. Linhagens *knockdown* (KO) para ING1, apresentam maiores níveis de rRNA, resultando em maior síntese proteica. Além disso, os autores observaram que a ING1 possui capacidade de se associar com a enzima HADAC1 e promover áreas de deacetilação da cromatina. Em contrapartida, as linhagens KO para ING1, apresentam maiores áreas de acetilação, permitindo a adesão de fatores de transcrição. Este estudo também evidenciou que há um aumento na expressão da ING1

quando as células são expostas às condições adversas, como privação de glicose e tratamento com rapamicina. Por fim, foi verificado que a proteína ING1 parece estar associada aos mecanismos de regulação epigenética envolvidos na inibição da proteína mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*), uma vez que as linhagens silenciadas para esta proteína demonstraram aumento significativo da expressão nuclear da mTOR, proteína que desempenha um papel essencial no controle do crescimento celular.

2.2 ING2

Dentre a família dos INGs, o gene ING2 apresenta a sequência mais semelhante (72%) ao gene ING1 (NAGASHIMA *et al.*, 2001). Desta forma, as evidências sugerem que as proteínas produzidas dos genes ING2 e ING1 apresentam estrutura muito semelhantes e podem ter funções similares ou complementares (GUNDUZ *et al.*, 2008; LUDWIG *et al.*, 2011; DANTAS *et al.*, 2019). O ING2 se localiza no cromossomo 4q35, sendo constituído por 3 éxons (1a, 1b e 2), e codificando duas isoformas proteicas, ING2a e ING2b, obtidas por *splicing* alternativo. A proteína ING2b não possui a cadeia N-terminal, onde se localizam os domínios responsáveis pela maioria das propriedades funcionais da ING2 (LUDWIG *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2016; DANTAS *et al.*, 2019).

Acredita-se a proteína ING2, também atuar na modulação epigenética de genes relacionados ao controle do ciclo celular, como o p53. Este fato se dá pelo PHD conservado em sua estrutura, que possui a capacidade de interagir com enzimas HAT e HADAC, formando complexos que regulam o processo transcricional (NAGASHIMA *et al.*, 2001; PEUDEUX *et al.*, 2005; LUDWIG *et al.*, 2011). Desta forma, possivelmente a proteína ING2 também participa da regulação do ciclo celular, reparo do DNA e senescência (ZHANG *et al.*, 2017). Alterações genéticas como perda de heterozigossidade e a instabilidade do RNAm no gene ING2, tem sido apontadas como as principais causas de desregulação funcional da proteína homóloga de mesmo nome (OKANO *et al.*, 2006; COLES; JONES, 2009; GUÉRILLON; LARRIEU; PEDEUX, 2013). Assim como observado para a proteína ING1, evidências demonstram que a expressão reduzida ou a perda da expressão das proteínas ING2 pode estar relacionada ao processo de tumorigênese (COLES; JONES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017).

Alguns autores hipotetizam que possa existir um mecanismo compensatório entre as funções desempenhadas pelos genes ING1 e ING2 (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX,

2014). Em um estudo realizado por Esmielli *et al.* (2016), os autores demonstraram que a diminuição da expressão da ING1 esteve relacionada à um aumento da expressão da ING2 em células neoplásicas da tireoide. Contudo, a perda da expressão da proteína ING2 também representa um achado comum em diversas neoplasias malignas, como carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma e câncer de pulmão (LU *et al.*, 2006; OKANO *et al.*, 2006; BORKOSKY *et al.*, 2009).

Borkosky *et al.* (2009) evidenciaram que a perda de heteroziguidade do gene ING2 pode ser analisada como fator de prognóstico em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Os autores observaram que uma alta frequência de LOH de ING2 está associada estatisticamente às fases mais tardias da progressão dessa neoplasia, o que corrobora com o exposto na literatura, de que esta proteína pode exercer funções importantes na progressão tumoral (COLES; JONES *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017).

2.3 ING 3

O gene ING3 representa o único gene da família ING que não está localizado em uma extremidade telomérica nos cromossomos. A proteína ING3 demonstra menor homologia quando comparada às outras proteínas da família, uma vez que há uma semelhança estrutural entre ING1/ING2 e ING4/ING5. Acredita-se que, apesar de possuir a estrutura mais distinta, esta proteína seja a mais conservada evolutivamente da família. Curiosamente, evidências tem demonstrado que esta variação em sua estrutura permite que esta proteína atue no ciclo celular de forma independente do p53, diferenciando-se das demais (NAGASHIMA *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2019). Nabbi *et al.* (2015) foram os pioneiros em evidenciar a expressão da ING 3 em tecidos humanos normais e demonstraram uma superexpressão da proteína no intestino, medula óssea e epiderme, tecidos que necessitam de renovação celular constante. Os autores indicam uma correlação entre maior número de células em proliferação e a expressão de ING 3 e sugerem que a função desta proteína deve ter papel direto no crescimento e renovação celular (DANTAS *et al.*, 2019).

Sabe-se que a proteína ING3 participa também de mecanismos de regulação epigenéticos. Doyon *et al.* (2004) demonstraram que esta proteína é um componente estrutural de um complexo de histonas acetiltransferases, denominado NuA4, atuando na acetilação das histonas 4 e 2A. Contudo, diferente do observado para as proteínas ING1

e ING2, a ING3 parece exercer função de ativação transcricional. Acredita-se que esta proteína esteja associada à ativação da proteína ATM, cuja fosforilação inicia uma importante via de sinalização para o reparo da quebra de dupla fita do DNA (MOUCHE *et al.*, 2019). A perda da expressão da ING3 tem sido encontrada em diversas neoplasias, como carcinoma hepatocelular, melanoma e carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (GUNDUZ *et al.*, 2008; BORKOSKY *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012)

Gunduz *et al.* (2012) realizaram um mapeamento do genoma de células neoplásicas e demonstraram alterações na região 7q31 do cromossomo, com deleção na sequência D7S643, onde se codifica o gene ING 3. Os autores evidenciam que a perda de heterozigotidade é um achado frequente em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Também foi observada a diminuição ou perda de expressão do RNAm da proteína ING 3 na metade dos casos avaliados. Além disso, a redução ou ausência da expressão do RNAm da ING 3 foi vista em 63% dos casos de carcinoma de língua e orofaringe que demonstraram baixa sobrevida e alta taxa de mortalidade.

2.4 ING 4

O gene ING 4 foi originalmente descrito por Shiseki *et al.* (2003) e semelhante aos demais genes da Família ING, codifica uma proteína de mesmo nome. O homeodomínio conservado na estrutura desta proteína, permite a interação com histonas acetiltransferases. Desta forma, a ING4 compõe um complexo denominado MYST-HB0, que tem sido associado à ativação transcricional do p53 e a inativação transcricional do NF- κ B (CONTZLER *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2016). Desta forma, a proteína ING4 parece estar envolvida na progressão do ciclo celular, na regulação da apoptose (NAGASHIMA *et al.*, 2003) e, diferente das outras proteínas da família, pode estar associada aos mecanismos de angiogênese e migração celular (SHISEKI *et al.*, 2003; GARVAVTSEK *et al.*, 2004; COLES e JONES, 2009).

Acredita-se que o ING4 possa sofrer regulação pós-transcricional pelos miRNA (microRNAs), miR214 e miR65 (TALLEN *et al.*, 2014). Este mecanismo pode estar associado à variedade de funções apresentadas pela proteína ING4 que pode exercer durante o processo de tumorigênese. Estudos têm evidenciado esta proteína como importante marcador tumoral em processos como: progressão do ciclo celular, apoptose, autofagia, perda de adesão celular, hipóxia, angiogênese, invasão e metástase (KUPHAL

e BROSSERHOFF, 2009; LU *et al.*, 2019) A diminuição da expressão da ING4 tem sido um **acho** frequente em casos de leucemia e cânceres de pulmão, fígado e pâncreas (TALLEN *et al.*, 2014) Além disso, a diminuição da expressão desta proteína tem sido associada à metástases linfonodais em casos de carcinoma renal de células claras, câncer colorretal, bem como câncer de pulmão e ovário (TALLEN *et al.*, 2014; DANTAS *et al.*, 2019).

Diferente do que foi observado para a proteína ING 3, a ING 4 parece desempenhar função na apoptose de maneira dependente de p53 (RUSSEL *et al.*, 2006; SOLIMAN *et al.*, 2007) Em um estudo realizado por Ren *et al.* (2017), os autores realizaram a transfecção ING4⁺ P53⁺ em implantes xenográficos de carcinoma de hipofaringe em ratos e verificaram a reação dos deste grupo ao tratamento com cisplatina. O estudo demonstrou a superexpressão das proteínas ING4 e p53 no grupo transfectado e que o tratamento deste grupo com cisplatina resultou em maior expressão de Bax e menor expressão de Bcl-2, quando comparado ao grupo controle, que exibia menores expressões destas proteínas. Estes achados indicam que a diminuição da expressão da ING 4 e do p53 pode estar diretamente relacionada à maior resistência a morte celular em células neoplásicas.

Em contrapartida, no estudo de Gunduz *et al.* (2005) foi observado que 76% dos carcinomas de células escamosas avaliados demonstraram redução na expressão do RNAm da proteína ING4 e que, ao contrário do que era esperado, essa redução não demonstrou associação com os níveis de expressão do p53 nos tumores correspondentes. Esses achados podem indicar que o ING4 também pode atuar como gene supressor tumoral durante o processo de tumorigênese, de forma independente do p53. Atualmente, diversos estudos apontam evidências sobre a interação entre as **estruturas** físicas da proteína ING4 e do fator transcricional NF-κB. Sabe-se também que o silenciamento do gene ING4 em ratos, resulta em aumento significativo da vascularização e este fato está associado ao aumento da expressão de genes constituintes da via NF-κB, considerados reguladores angiogênicos. Estes achados indicam que em condições normais, a ING4 pode exercer supressão tumoral por meio da inativação da via NF-κB (NOZELL *et al.*, 2008).

2.5 ING5

O gene ING5 possui funções homólogas às citadas para o gene ING4, desta forma, bioquimicamente as proteínas se comportam de forma semelhante. A proteína ING5,

semelhante à todas as proteínas INGs, possui um domínio PHD que pode desempenhar função de remodelação da cromatina, portanto também está envolvida na regulação transcricional (SHISEKI et al., 2003; ZHANG et al, 2011; LIU et al, 2013). Sabe-se que a ING5 pode responder à danos no DNA induzindo à metilação do p53 e promovendo à ativação de genes pró-apoptóticos, como o Bax. Além disso, existem evidências que o aumento da expressão da ING5 inibe a ciclina 1A, impedindo a progressão do ciclo celular. Desta forma, acredita-se que esta proteína desempenha um importante papel como supressora tumoral. (ZHANG et al, 2011; LIU et al, 2013).

Li et al (2010) avaliaram a expressão da ING5 em 172 casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Os resultados do estudo evidenciaram que carcinomas bem diferenciados demonstravam expressão nuclear da ING5 e esta expressão foi positivamente correlacionada à expressão de p21 e marcadores apoptóticos. Por outro lado, a perda da expressão nuclear e o aumento da expressão citoplasmática da ING5 foi observada em carcinomas menos diferenciados e esteve negativamente correlacionada à expressão de p21e p300. Desta forma, as evidências sugerem que a localização nuclear da ING5 deve estar associada à supressão tumoral por meio da inibição do ciclo celular e indução à apoptose. Além disso, a não translocação da proteína para o núcleo pode resultar na perda desta função e estar relacionada à perda da diferenciação celular e progressão no processo de tumorigênese.

Corroborando com estes achados, Cengiz et al (2010) também evidenciaram o possível papel da ING5 como supressora tumoral em carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Os autores encontraram 3 mutações missenses e 5 splices alternativos para a proteína ING5 em amostras de CCEO, além de demonstrarem redução na quantidade de mRNA da ING5 em 61% do casos avaliados quando comparados à amostras de tecidos normais. Em um estudo mais recente, Gou et al (2015) demonstraram que a maior expressão da ING5 resulta em menores índices de proliferação, migração e invasão e aumenta o processo de autofagia e diferenciação celular em células neoplásicas isoladas de câncer gástrico.

3 AS INGS E A P53

A célula possui múltiplos mecanismos envolvidos na manutenção, diferenciação e proliferação celular. Para tanto, requerem que as funções dos genes e proteínas sejam

coordenadas e controladas, de forma a manter a homeostasia da célula. Cada indivíduo é influenciado constantemente por fatores genéticos e ambientais que podem provocar danos celulares. Porém, a célula possui mecanismos específicos que visam reparar e reestabelecer o metabolismo normal, ou, em caso de danos irreversíveis, sinalizar para a morte da célula danificada. Os genes envolvidos na manutenção destas funções vitais, impedem o crescimento descontrolado das células, e portanto são denominados supressores tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2011; KIM et al., 2015).

Dentre os genes supressores de tumor, o TP53 destaca-se por codificar a proteína p53, que possui função essencial como ponto de checagem do ciclo celular, além de estar envolvida na regulação de processos secundários como a apoptose, a senescência e a autofagia (MULLER et al., 2011; SUI et al., 2015). Acredita-se que proteína p53 esteja fundamentalmente envolvida na parada do ciclo celular e no reparo do DNA, por isso há a denominação de “guardião do genoma” (SPEIDEL, 2015). Suscita-se que a p53 participe da regulação de cinco vias de reparo de dano ao DNA, incluindo o reparo por excisão de nucleotídeo, por excisão de base, de pareamentos errados, de recombinação não-homóloga e homóloga, que acontece, dentro outros fatores, pela regulação de miRNAs e da p21 (SENGUPTA & HARRIS, 2005; SPEIDEL, 2015).

A mutação do gene TP53 tem sido evidenciada como um marcador importante do processo de carcinogênese, tendo em vista que a maioria dos cânceres humanos exhibe aumento na expressão da proteína p53. (ONEL & CORDON-CARDO, 2004; HANAHAN & WEINBERG, 2011; WALERYCH et al., 2015). Alguns autores também utilizam a expressão desta proteína como um marcador prognóstico em neoplasias benignas. Tenório et al. (2018) evidenciaram que a proteína p53 é expressa de forma similar nos AMBs e COs, e que a expressão desta proteína apresenta-se reduzida no tumor odontogênico adenomatoide quando comparado às outras lesões epiteliais. Além disso, a expressão da p53 esteve correlacionada positivamente a expressão da proteína Bcl-2 e negativamente à expressão da proteína Bax nestas lesões odontogênicas.

Outros autores demonstraram um expressão aumentada da p53 em COs e cistos dentígeros, quando comparados aos folículos dentários. A maior marcação da p53 em ceratocistos comparada aos cistos dentigeros pode estar relacionada ao comportamento mais agressivo e aos maiores índices de recorrência exibidos por esta neoplasia(ALUR et al., 2014; FATMEH et al., 2017). Alur et al. (2014) demonstrou que a expressão da p53 encontrou-se aumentada em casos de lesões recorrentes ou associadas à síndrome de Gorlin, quando comparadas à lesões esporádicas.

Além disso, a proteína p53 está intimamente relacionada à ativação das vias apoptóticas na célula e está associada a regulação das proteínas da família Bcl (HAUPT et al., 2003; SPEIDEL, 2015). Acredita-se que a proteína p53 possua a capacidade de regular a razão de proporção das proteínas Bax e Bcl-2 de forma a modular a viabilidade celular (CHEN et al., 2012). Sabe-se que todas as proteínas da família ING possuem capacidade de interagir com a p53 e regularem o ciclo celular e os mecanismos de apoptose. Porém, ainda não existem evidências que demonstrem a expressão destas proteínas em lesões odontogênicas, bem como, uma possível correlação destas proteínas à expressão das proteínas p53, Bax e Bcl-2. Estes achados podem auxiliar na compreensão do processo etipatogênico destas patologia e fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e conservadoras.

É importante ressaltar que as proteínas INGs podem regular funções específicas de maneira dependente da proteína p53. Thalappilly et al. (2011) evidenciaram, por meio de ensaios de coprecipitação, a interação entre a proteína ING1 e a p53. Segundo os autores, a ING1 possui um domínio de afinidade à ubiquitina (UBD, do inglês, *ubiquitin-binding domain*) que a permite se translocar após dano ao DNA, e interagir com a p53 ubiquitinizada. O estudo demonstra que há uma interdependência entre as expressões destas proteínas, uma vez que o aumento ou a redução na expressão da ING1 está positivamente correlacionado à expressão da p53. Em contrapartida, mudanças na expressão da p53 não afetam à expressão da ING1. As funções resultantes da interação destas duas proteínas ainda não estão esclarecidas, mas acredita-se que a ING1 exerça um papel na estabilização da p53 durante o reparo do DNA.

A associação com a p53 não é um achado exclusivo da proteína ING1, evidências indicam que todas as proteínas da família ING, exceto a ING3, parecem desempenhar funções relacionadas à ativação transcrricional da p53, e a partir daí, regular diferentes funções celulares de maneira dependente desta proteína (COLES e JONES, 2009). Sabe-se que as proteínas INGs estão envolvidas diretamente na regulação do ciclo celular, e que isso pode ocorrer de maneira dependente ou independente da p53 (Figura 3). As proteínas ING1, ING2 e ING5 participam da regulação do ciclo celular tanto pela interação com a p53, quanto secundariamente, pela interação com a PCNA (antígeno nuclear de proliferação (LARRIOU et al., 2009; GOU e FAST, 2011; THALAPILLY et al., 2011; LIU et al., 2013; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019). Já a proteína ING4, possui apenas função relacionada à ativação da proteína p300 que resulta em uma consequente acetilação da região promotora da p53 (GOU e FAST, 2011). Por fim, a ING3 não demonstra nenhuma evidência de interação com esta proteína. Apesar disso,

acredita-se que a ING3 possa estar relacionada à parada do ciclo celular por meio da ativação da via PI3K/AKT que resulta na diminuição da ciclina D1 (OH et al., 2002; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019).

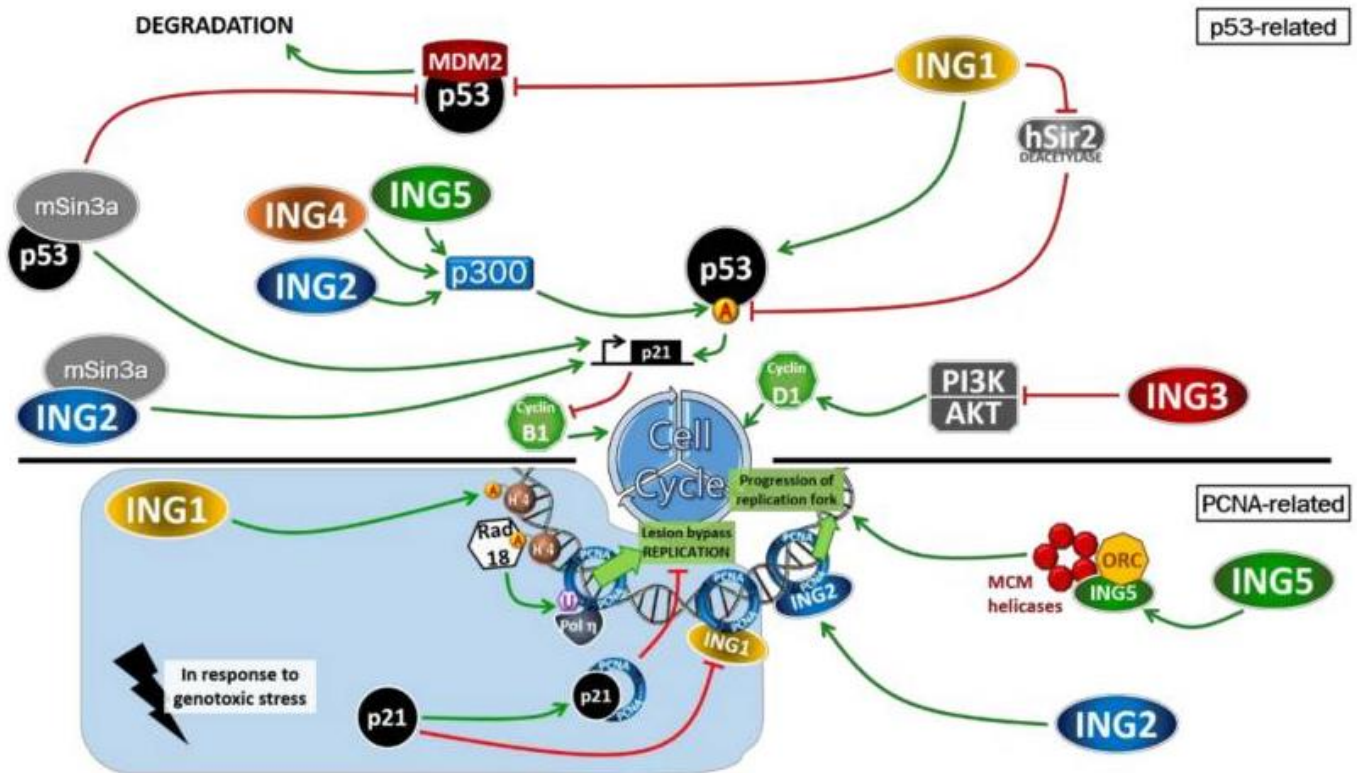


Figura 3. As proteínas ING podem regular o ciclo celular de maneira dependente ou independente da p53. O ciclo celular é regulado negativamente pelos INGs de várias maneiras. A ING1 interage com p53 e promove a ativação da p21. Além disso, a ING1 pode estabilizar a p53 por inibir a desacetilase (hSir2). As proteínas ING2, ING4 e ING5 podem induzir a regulação negativa do ciclo celular por meio da ativação de p300, levando à acetilação da região promotora da p53. Além disso, a ING2 pode constituir um complexo mSin3A que pode ativar diretamente a expressão de p21, inibindo assim o ciclo celular independentemente de p53. Finalmente, ING3, ao inibir a ativação de PI3K / AKT, pode diminuir a expressão da ciclina D1 resultando em parada do ciclo celular. (Adaptado de Archambeau, Blondel e Pedoux, 2019)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo propõe analisar, por meio de imuno-histoquímica, a imunexpressão das proteínas ING3, ING4, ING 5 e p53, bem como investigar a correlação entre a expressão de proteínas da família ING com a expressão da p53 em AMBs sólidos, TOAs e COs. As imunexpressões das proteínas ING1 e ING2 foram avaliadas em um estudo prévio e os resultados serão utilizados apenas para as análises de correlação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a imunorreatividade nuclear e citoplasmática para as proteínas ING3, ING4 E ING5 em relação ao componente epitelial dos FDs COs, AMBs e TOAs, bem como, determinar se há diferenças entre a imunexpressão nuclear e citoplasmática destas proteínas entre os grupos de estudo;
- Analisar a imunorreatividade nuclear para a proteína p53 nos componentes epiteliais dos COs, AMBs e TOAs e verificar se há diferenças entre a imunexpressão nuclear para a proteína p53 no componente epitelial entre os grupos de estudo;
- Investigar possíveis correlações entre às localizações, bem como os percentuais, das imunexpressões das proteínas Ing1, Ing2, Ing3, Ing4, Ing5 e p53 nos componentes epiteliais dos COs, AMBs, TOAs e FDs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido para análise do seu conteúdo ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), via Plataforma Brasil, com o intuito de atender às exigências éticas e científicas firmadas nas normas de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, tendo sido aprovado sob o número de parecer 3.455.557 (ANEXO A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa consistiu em um estudo observacional, analítico e com corte transversal, caracterizado pela análise da correlação entre a imunexpressão das proteínas Ing1, Ing2, Ing3, Ing4 e Ing5 com a proteína p53 em espécimes de AMBs, TOAs, COs e FDs. As imunexpressões das proteínas ING1 e ING2 foram avaliadas em um estudo prévio (CAMPOS, 2019) e os resultados serão utilizados apenas para as análises de correlação.

4.3 POPULAÇÃO

A população deste estudo foi constituída pelos casos de folículos dentários e lesões odontogênicas diagnosticadas e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) entre os anos de 2010 e 2019.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi do tipo intencional e não-probabilística, por conveniência, constituída de 20 casos de AMBs, 20 casos de TOAs convencionais, 20 casos de COs e 10 amostras de FDs , totalizando 70 casos, todos emblocados em parafina e armazenados no referido centro.

4.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.5.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra os espécimes de AMBs, TOAs, COs e FDs que apresentarem os seguintes aspectos:

- Viabilização para realização da técnica imuno-histoquímica, através da seleção de blocos de parafina com material incluído que exibirem boas condições de armazenamento e material suficiente para o estudo pretendido;
- Casos de AMBs sólidos convencionais;
- Casos de COs não sindrômicos;
- Casos de FDs que possuíam componente epitelial suficiente para a análise quantitativa.

4.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

- Espécimes que foram submetidos ao processo de descalcificação, visto que o mesmo pode interferir na antigenicidade do material;
- Espécimes com intenso infiltrado inflamatório, devido à alteração que estes componentes podem acarretar as lesões que serão estudadas.

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foi realizada uma análise morfológica sob microscopia de luz, por meio de lâminas histológicas confeccionadas e armazenadas no Laboratório de Anatomia

Patológica da Disciplina de Patologia Oral da UFRN, contendo cortes de 5µm de espessura dos espécimes teciduais e coradas pela técnica de rotina da hematoxilina e eosina (HE). Esta análise objetivou apenas a rápida observação dos aspectos histopatológicos das lesões para que os casos fossem incluídos de acordo com os critérios estabelecidos.

4.7 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes analisadas no presente estudo, estão listadas no Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Imunoexpressão de Ing3	Marcação nuclear e/ ou citoplasmática em células do componente epitelial das lesões e dos FDs	Percentual de células epiteliais imunopositivas
Imunoexpressão de Ing4	Marcação nuclear e/ ou citoplasmática em células do componente epitelial das lesões e dos FDs	Percentual de células epiteliais imunopositivas
Imunoexpressão de Ing5	Marcação nuclear e/ ou citoplasmática em células do componente epitelial das lesões e dos FDs	Percentual de células epiteliais imunopositivas
Imunoexpressão de p53	Marcação nuclear em células do componente epitelial das lesões e dos FDs	Percentual de células epiteliais imunopositivas

Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Lesões odontogênicas epiteliais benignas	Lesões odontogênicas epiteliais benignas que apresentam comportamento clínico e biológico diferentes	- Ameloblastoma - Ceratocisto odontogênico - TOAs
Folículo dentário	Folículo dentário, o qual servirá como grupo de comparação, por se tratar de um tecido odontogênico normal.	Folículo dentário

4.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

4.8.1 Técnica imunoistoquímica

Toda a amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes histológicos de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical CO, USA). Em seguida, os espécimes foram submetidos à marcação por meio do método imuno-histoquímico, utilizando os anticorpos anti- Ing3, anti-Ing4, anti-Ing5 e anti-p53, conforme descrito no Quadro 3.

Foram utilizados como controle positivo para os anticorpos, cortes histológicos de hiperplasia fibrosa inflamatória. O controle negativo, por sua vez, consistiu na substituição dos anticorpos primários por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

QUADRO 3. Especificidade, clone, fabricante, diluição e tempo de incubação dos anticorpos. Natal-RN, 2019.

ESPECIFICIDADE	CLONE	FABRICANTE	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO
----------------	-------	------------	----------	-----------

Ing3	Policlonal 30330002	Abcam	1:4000	<i>Overnight a 4°C</i>
Ing4	Policlonal NBP2- 33828	Novus Biologicals	1:4000	<i>Overnight a 4°C</i>
Ing5	Monoclonal sc-2025	Santa Cruz Biothechnology	1:200	<i>Overnight a 4°C</i>
p53	Monoclonal D07	Invitrogen	1:1500	<i>60 minutos</i>

4.8.2 Marcação pelo método imuno-histoquímico

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito a seguir:

- 1) Em um recipiente, todas as amostras foram imersas em solução preparada contendo *Trilogy*[®] (1:100), seguindo, então, as amostras teciduais para panela Pascal para desparafinização, reidratação e recuperação dos sítios antigênicos (Quadro 1);
- 2) Lavagem do material em água corrente por 3 minutos e duas passagens por água destilada (1 minuto cada);
- 3) Incubação dos cortes, pelo período de 15 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (3%) para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- 4) Lavagem em água destilada;
- 5) Imersão em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada;
- 6) Incubação com a proteína *Background Block* (Cell Marque, Rocklin, Califórnia, EUA) por 10 minutos;
- 7) Lavagem em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos;
- 8) Incubação dos cortes com anticorpos primários diluídos (Dako Envision Flex Antibody Diluent DM830) com tempo de incubação estabelecido seguindo as especificidades constadas no Quadro 3.
- 9) Imersão em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada;
- 10) Incubação com anticorpo secundário com sistema de detecção *Hidex* (Cell Marque; Rocklin, Califórnia, EUA) com aplicação de solução amplificadora por 20 minutos;
- 11) Imersão em solução de *Tween20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos;
- 12) Aplicação do polímero HRP do sistema de detecção *Hidex* por 20 minutos

- 13) Duas passagens em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 14) Aplicação do agente cromógeno DAB (diaminobenzidina; Scytek Laboratories; Logan, Utah, USA), durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 15) Imersão em solução de *Tween 20* a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos;
- 16) Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente, durante 5 minutos;
- 17) Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- 18) Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
- 19) Álcool etílico 80°GL (3 minutos);
- 20) Álcool etílico 95°GL (3 minutos);
- 21) Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- 22) Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- 23) Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- 24) Imersão em xilol I (5 minutos);
- 25) Imersão em xilol II (5 minutos);
- 26) Montagem da lamínula contra a lâmina em resina *Permount*® (Fisher Chemical Inc., Fair Lawn, NJ, USA) para observação em microscópio de luz.

4.8.3 Análise Imunoistoquímica

A análise foi realizada nos compartimentos nuclear e citoplasmático das células epiteliais dos AMBs, COs, TOAse FDs. Esta avaliação foi realizada por dois avaliadores, previamente calibrados.

Para a avaliação da imunorreatividade, foi adaptado o método proposto pelo estudo de Zhao et al. (2016). Sendo assim, a análise da imunomarcção foi realizada de forma quantitativa levando-se em consideração a localização celular (citoplasmática, nuclear ou núcleo-citoplasmática). Inicialmente, foram fotografados cinco campos representativos das lesões em alta ampliação (40X) em microscópio de luz convencional (Nikon Eclipse-E200, Tokyo, Japan) por um examinador previamente calibrado. Em seguida, com o auxílio do programa ImageJ® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), em cada um dos campos fotomicrografados,

foram contadas as células positivas e negativas para os anticorpos estudados, avaliando os compartimentos nuclear e citoplasmático separadamente, e assim, foi estabelecido o percentual de células exibindo imunopositividade citoplasmática e nuclear para cada caso.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, USA) e transferidos para o *Statistical Package for Social Sciences* para Windows (SPSS versão 22.0; IBM, USA). Os gráficos foram construídos no *GraphPad Prism* versão 8.0 (*GraphPad Software Inc, USA*). O teste de *Shapiro-Wilk* revelou que os dados não seguiram uma distribuição normal; portanto, foram utilizados testes não-paramétricos. O teste de *Kruskal Wallis* (KW) foi utilizado para comparar a expressão das proteínas entre os grupos de lesões ou folículo dentário, seguido da comparação entre os pares pelo pós-teste de *Dunn*. As correlações entre a expressão das proteínas estudadas, bem como a correlação entre elas e ING1 e ING2 foram avaliadas pelo teste de correlação de *Spearman*. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes realizados, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ING_s EM COs e AMBs

A marcação imuno-histoquímica para os marcadores anti- ING3 (Figura. 4), anti- ING4 (Figura 5) e anti- ING5 (Figura 6) evidenciou positividade variada no componente das lesões odontogênicas e dos FDs estudados. Considerando apenas os percentuais de positividade, independentemente da localização da marcação, observou-se uma redução na expressão da proteína ING3 nos AMBs quando comparados aos FDs ($p=0,003$). Em relação a proteína ING4, tanto os COs ($p=0,02$) quanto os AMBs ($p=0,001$) exibiram uma redução significativa na expressão desta proteína quando comparados aos FDs. Também foi observada uma redução na expressão da ING4 em AMBs ($p=0,036$) quando comparados aos TOAs (Figura 6).

ING3

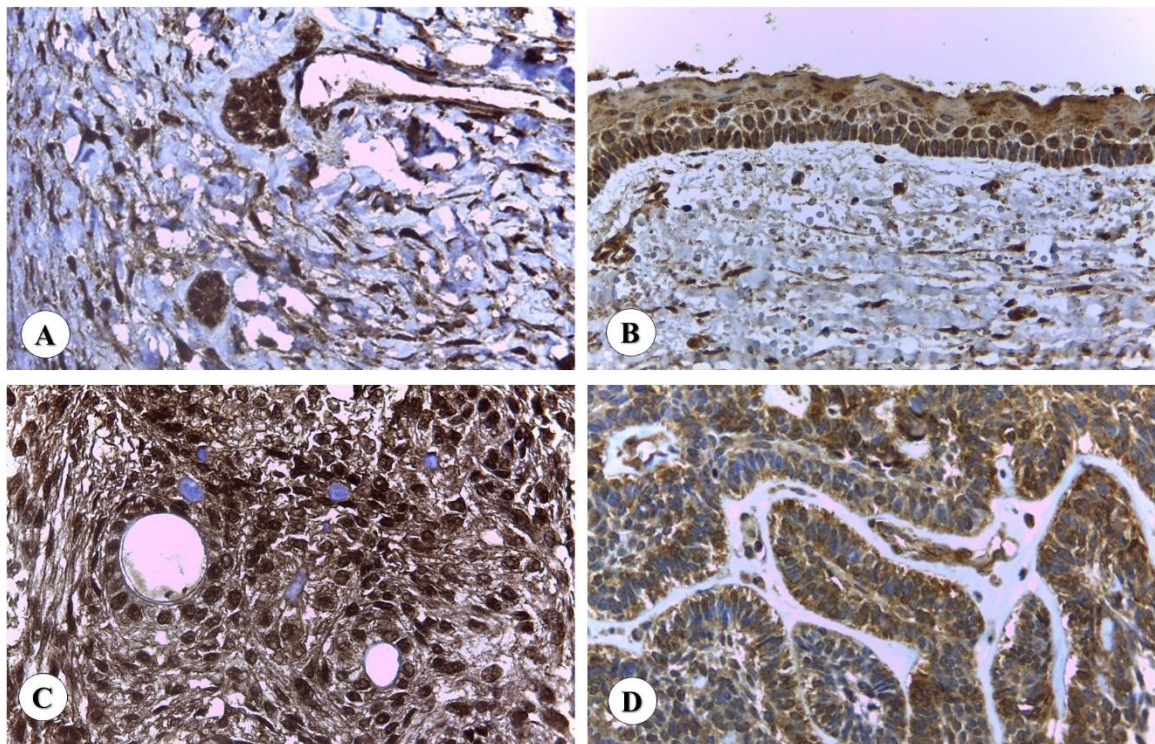


Figura 4. Fotomicrografias representativas da imunoexpressão nuclear e citoplasmática da proteína ING3 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C) Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.

ING4

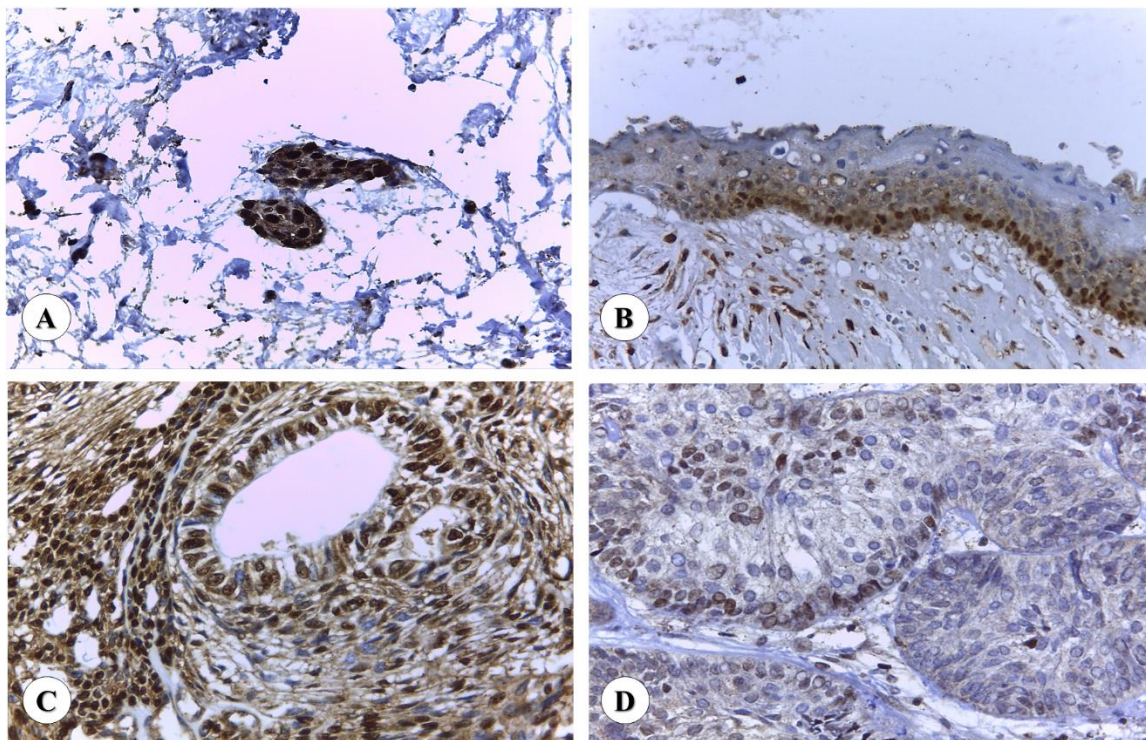


Figura 5 Fotomicrografias representativas da imunoposição nuclear e citoplasmática da proteína ING4 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C) Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.

ING5

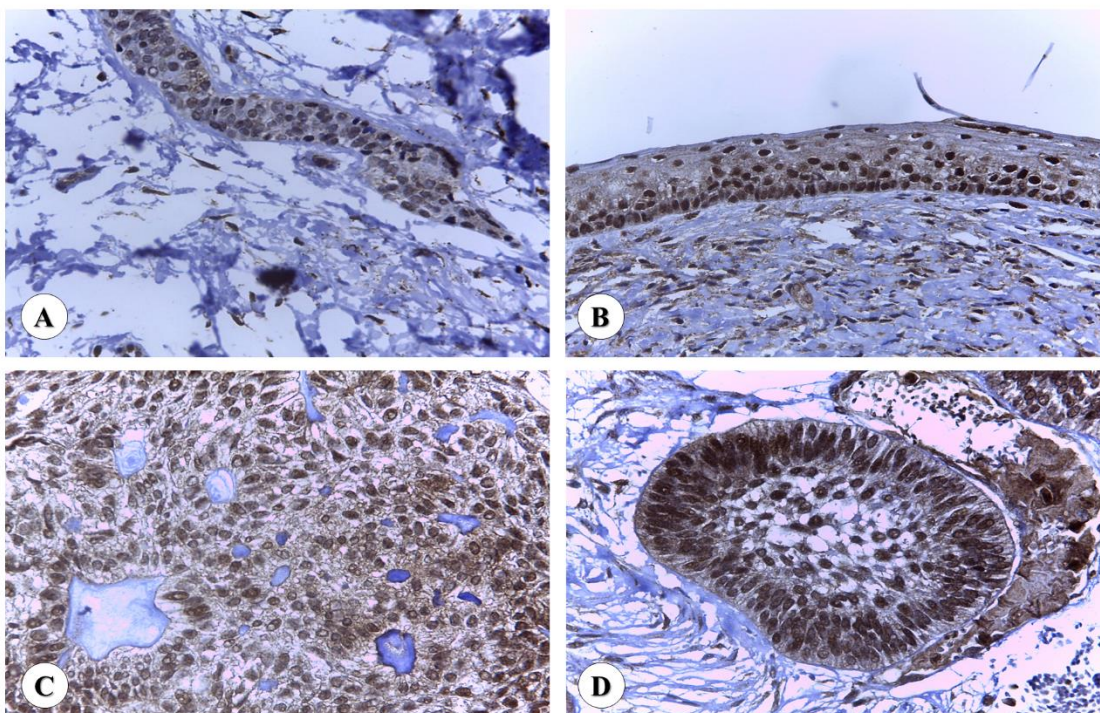


Figura 6. Fotomicrografias representativas da imunoposição nuclear e citoplasmática da proteína ING5 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C) Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.

Considerando a localização celular, a marcação imunohistoquímica para a proteína ING4 evidenciou que os COs demonstraram redução da expressão concomitante em núcleo/citoplasma ($p=0,009$) quando comparados aos FDs. Além disso, a comparação entre os AMBs e os FDs, também revelou redução da expressão núcleo/citoplasma ($p=0,006$), bem como redução da expressão apenas citoplasmática ($p=0,029$) para esta proteína (Tabela 1).

Em relação à imunoexpressão da proteína ING5 nas diferentes localizações intracelulares, tanto o ceratocisto odontogênico ($p=0,09$) quanto os AMBs ($p=0,012$) evidenciaram redução da expressão nuclear desta proteína, quando comparados aos FDs. Ademais, os AMBs também demonstraram menor expressão nuclear/citoplasmática ($p=0,029$) para esta proteína quando comparados aos FDs(Tabela 1).

Por fim, a marcação imunohistoquímica para proteína p53(Figura 7) não evidenciou diferenças significativas nos percentuais de positividade entre os TOAs e FDs, bem como entre os COs e AMBs (Figura 8 D). Em contrapartida, os COs ($p=0,002$) e os AMBs ($p=0,03$), demonstraram maior expressão da proteína p53 quando comparados aos FDs. Também se observou redução da expressão nuclear desta proteína em TOAsquando comparados aos COs ($p<0,0001$) e AMBs ($p<0,0001$).

P53

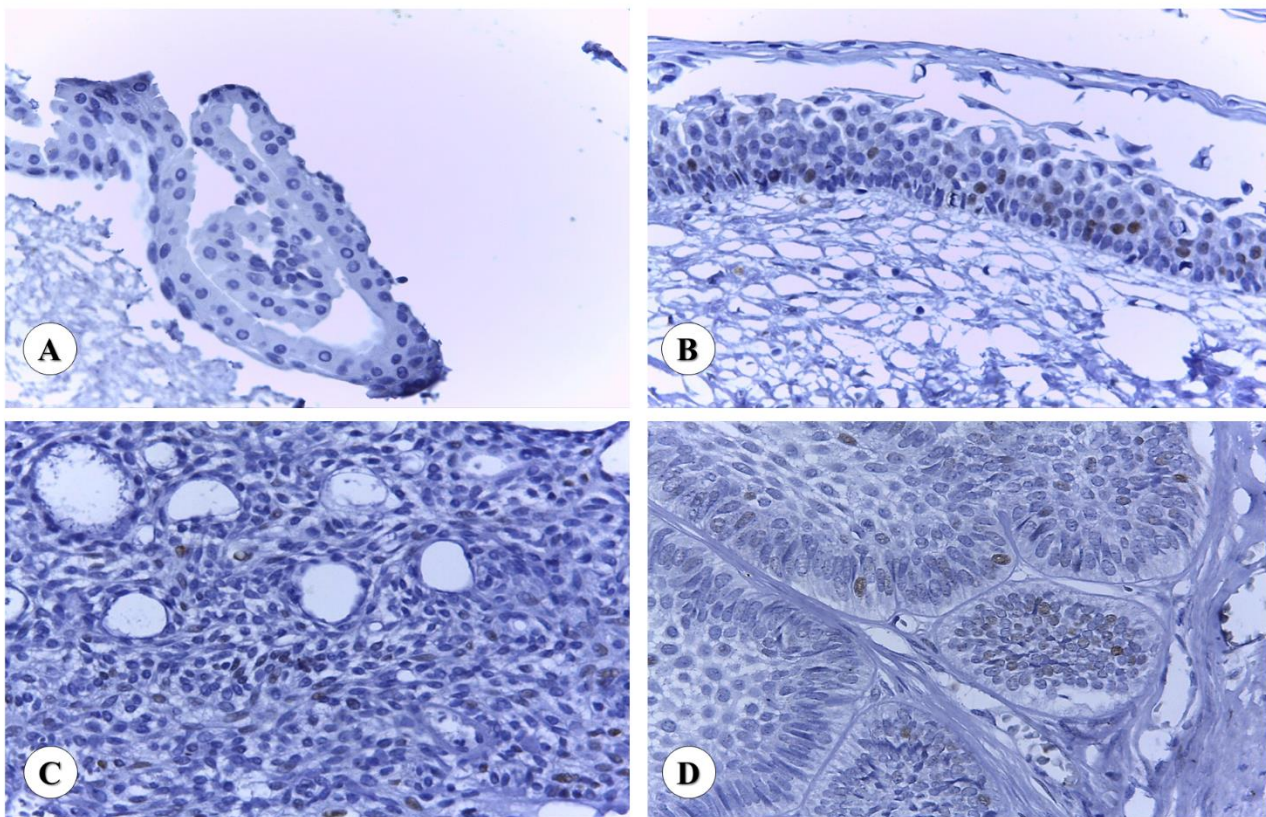


Figura 7. Fotomicrografias representativas da imunexpressão nuclear da proteína p53 no componente epitelial do (A) Folículo Dentário, (B) COs, (C) Tumor Odontogênico Adenomatoide e (D) Ameloblastoma.

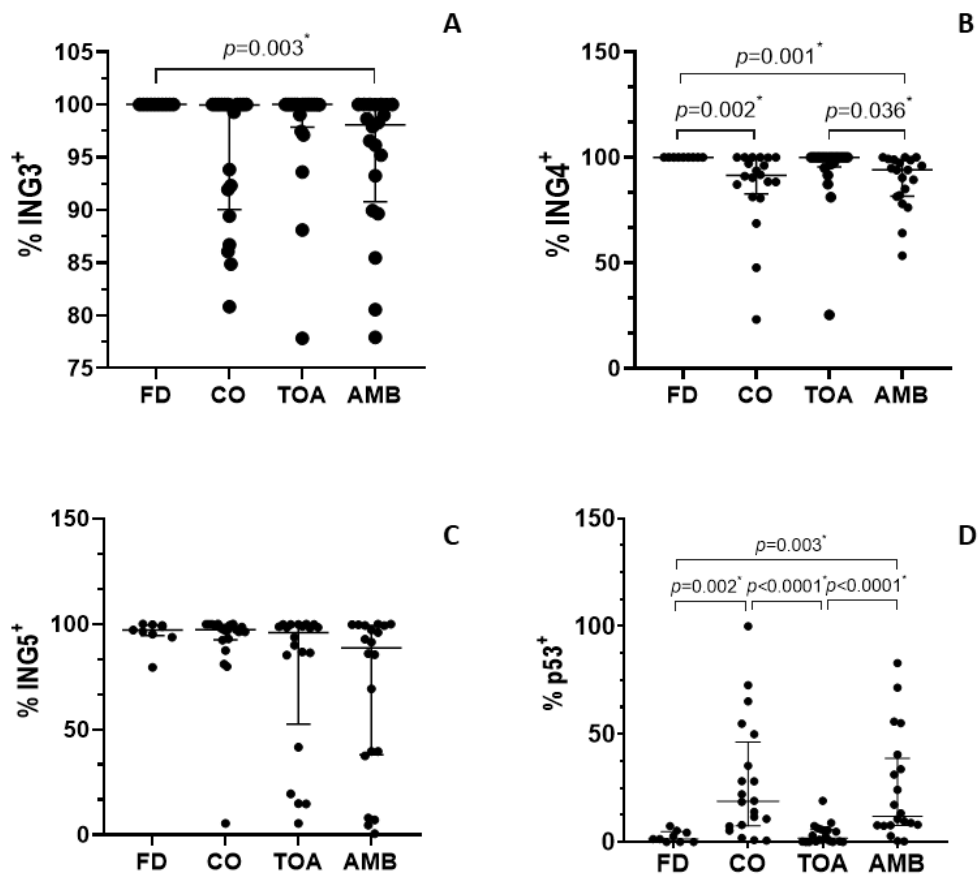


Figura 8. Comparação entre os percentuais de positividade para as proteínas INGs e para a p53 entre os folículos dentários e as lesões odontogênicas. (A) Redução na expressão da ING3 nos AMBs quando comparados aos FDs ($p=0,003$). (B) Redução na expressão da ING4 nos AMBs ($p=0,001$) e COs ($p=0,002$) quando comparados aos FDs e redução na expressão da ING4 nos AMBs quando comparados aos TOAs ($p=0,036$). (C) Não houveram diferenças significativas entre as imunoexpressões para a proteína ING5. (D) Aumento na expressão da p53 em AMBs ($p=0,003$) e COs ($p=0,002$) quando comparados aos FDs e aumento na expressão da p53 em AMBs ($p<0,0001$) e COs ($p<0,0001$) quando comparados aos TOAs.

Tabela 1. Mediana, quartil 25, quartil 75 e significância estatística (p-valor) para o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e teste Post-Hoc de Dunn para a expressão das proteínas ING nas diferentes localizações celulares comparadas entre os diferentes grupos. Natal-RN, 2019.

Proteína (localização celular)	FD Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	CO Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	TOA Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	AMB Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Kruskal- Wallis p-valor	Comparação por pares - <i>Post hoc</i> p-valor					
						FD x CO	FD x TOA	FD x AMB	CO x TOA	CO x AMB	AMB x TOA
ING3 (c+n)	87.43 (40.55-91.77)	56.45 (41.15-74.27)	64.75 (50.14-83.84)	56.49 (49.34-72.90)	0.144	-	-	-	-	-	-
ING3 (citoplasma)	12.57 (8.22-59.42)	39.87 (25.70-52.98)	32.05 (16.15-48.48)	35.84 (24.82-49.98)	0.260	-	-	-	-	-	-
ING4 (c+n)	87.26 (58.78-96.59)	48.60 (18.90-69.26)	66.56 (41.71-78.99)	39.58 (24.09-62.70)	0.003*	0.009*	0.486	0.006*	0.499	1.000	0.330
ING4 (citoplasma)	12.73 (3.40-40.92)	35.90 (25.14-61.93)	28.90 (17.90-47.23)	44.95 (25.17-65.18)	0.026*	0.091	0.796	0.029*	1.000	1.000	0.647
ING5 (c+n)	51.09 (22.58-64.09)	74.34 (41.62-88.41)	25.23 (2.47-70.66)	23.86 (1.51-87.31)	0.034*	0.816	1.000	1.000	0.029*	0.207	1.000
ING5 (núcleo)	25.39 (11.35-37.81)	5.16 (1.66-8.51)	8.48 (4.25-15.85)	4.28 (1.79-11.29)	0.007*	0.009*	0.161	0.012*	1.000	1.000	1.000
ING5 (citoplasma)	25.39 (11.35-37.81)	5.16 (1.66-8.51)	8.48 (4.25-15.85)	4.28 (1.79-11.29)	0.625	-	-	-	-	-	-

5.2 OS MECANISMOS COMPENSATÓRIOS ENTRE AS PROTEÍNAS ING_s SÃO MENOS EVIDENTES EM COs e AMBs

A marcação imunohistoquímica para as proteínas ING1 e ING2 foi avaliada em um estudo prévio (CAMPOS, 2019) e os dados foram considerados neste estudo apenas para as análises de correlação. Possíveis correlações entre as proteínas ING_s foram avaliadas entre os quatro grupos estudados. Desconsiderando a localização da marcação para estas proteínas (Tabela 2), foi observada correlação positiva entre a expressão das proteínas ING3 e ING1 em COs ($r=0,0452$; $p=0,045$), bem como entre as proteínas ING3 e ING2 em AMBs ($r=0,518$; $p=0,019$). Além disso, a proteína ING5 demonstrou correlação positiva com a proteína ING1 em FDs ($r=0,879$; $p=0,01$) e com a proteína ING2 em COs ($r=0,636$; $p=0,03$) e TOAs ($r=0,775$; $p<0,0001$).

Tabela 2. Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunexpressão de ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, desconsiderando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020

Variáveis	FD (n = 10)		CO (n = 20)		TOA (n = 20)		AMB (n = 20)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ING3 x ING1	-	-	0.452	0.045*	0.305	0.191	0.069	0.772
ING3 x ING2	-	-	-0.009	0.969	-0.046	0.848	0.518	0.019*
ING3 x ING4	-	-	0.225	0.340	0.002	0.993	0.424	0.063
ING3 x ING5	-	-	0.175	0.461	0.236	0.317	0.004	0.987
ING4 x ING1	-	-	0.011	0.964	0.042	0.865	-0.069	0.771
ING4 x ING2	-	-	0.246	0.297	-0.002	0.994	0.297	0.204
ING4 x ING5	-	-	0.264	0.261	0.086	0.717	-0.018	0.940
ING5 x ING1	0.879	0.001*	0.077	0.748	0.234	0.321	0.226	0.339
ING5 x ING2	0.273	0.446	0.636	0.003*	0.775	<0.0001*	0.427	0.060

*Resultado estatisticamente significativo.

Considerando as diferentes localizações intracelulares para as proteínas ING_s, as correlações para cada grupo estudado encontram-se discriminadas na tabela 3. Com relação à marcação citoplasma/núcleo da proteína ING3, observou-se uma correlação positiva com a marcação citoplasma/núcleo da proteína ING1 em FDs ($r=0,697$; $p=0,025$), TOAs ($r=0,776$; $p<0,0001$) e AMBs ($r=0,731$; $p<0,0001$), bem como uma correlação positiva com a marcação nuclear da proteína ING1 em COs ($r=0,451$; $p=0,046$). Em contrapartida, foi observada uma correlação negativa entre a expressão citoplasma/núcleo da proteína ING3 com a expressão citoplasmática da proteína ING1 em FDs ($r= -0,758$; $p=0,011$), TOAs ($r= -0,782$; $p<0,0001$) e

AMBs ($r = -0,762$; $p < 0,0001$). Ainda considerando expressão citoplasma/núcleo da proteína ING3, foi observada uma correlação positiva com a expressão citoplasma/ núcleo da ING4 ($r = 0,927$; $p < 0,0001$) e com a expressão nuclear da ING5 ($r = 0,648$; $p = 0,043$) em folículos dentários, bem como, correlação negativa com a expressão citoplasmática da ING4 em FDs ($r = -0,927$; $p < 0,0001$) e COs ($r = -0,605$; $p < 0,0001$).

Com relação a proteína ING4, a expressão citoplasma/núcleo desta proteína esteve negativamente correlacionada à expressão citoplasmática da proteína ING1 em FDs ($r = -0,782$; $p = 0,008$) e TOAs ($r = -0,516$; $p = 0,017$). Observou-se ainda que a expressão citoplasmática da proteína ING4 esteve negativamente correlacionada à expressão núcleo/citoplasma da proteína ING5 em TOAs ($r = -0,596$; $p = 0,06$) e AMBs ($r = -0,499$; $p = 0,025$).

Por fim, a expressão núcleo/citoplasma da proteína ING5 esteve positivamente correlacionada à expressão nuclear da proteína ING1 em COs ($r = 0,644$; $p = 0,02$) e AMBs ($r = 0,472$; $p = 0,036$). Além disso, a expressão citoplasmática da proteína ING5 também esteve positivamente correlacionada com a expressão citoplasmática da proteína ING1 em FDs ($r = 0,758$; $p = 0,01$), TOAs ($r = 0,648$; $p = 0,043$) e AMBs ($r = 0,549$; $p = 0,012$).

Tabela 3. Tamanho da amostra, coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística da imunexpressão de ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, considerando a localização da marcação intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020

Variáveis	FD (n = 10)		CO (n = 20)		TOA (n = 20)		AMB (n = 20)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ING3 (c+n) x ING1 (c+n)	0.697	0.025*	0.188	0.427	0.776	<0.0001*	0.731	<0.0001*
ING3 (c+n) x ING1 (núcleo)	-0.297	0.405	0.451	0.046*	0	1.000	0.302	0.195
ING3 (c+n) x ING1 (citoplasma)	-0.758	0.011*	-0.361	0.118	-0.782	<0.0001*	-0.762	<0.0001*
ING3 (c+n) x ING2 (c+n)	0.042	0.907	-0.125	0.600	0.286	0.222	0.358	0.121
ING3 (c+n) x ING2 (núcleo)	0.248	0.489	0.347	0.133	-0.450	0.047*	-0.340	0.143
ING3 (c+n) x ING2 (citoplasma)	-0.127	0.726	0.174	0.462	0.386	0.092	-0.352	0.128
ING3 (c+n) x ING3 (citoplasma)	-1.000	<0.0001*	-0.943	<0.0001*	-0.992	<0.0001*	-0.768	<0.0001*
ING3 (c+n) x ING4 (c+n)	0.927	<0.0001*	0.304	0.193	0.311	0.181	0.183	0.439
ING3 (c+n) x ING4 (citoplasma)	-0.927	<0.0001*	-0.104	0.663	-0.605	0.005*	-0.191	0.420
ING3 (c+n) x ING5 (c+n)	0.018	0.960	0.288	0.218	0.388	0.091	0.388	0.091
ING3 (c+n) x ING5 (núcleo)	0.648	0.043*	-0.183	0.441	0.383	0.095	0.005	0.985
ING3 (c+n) x ING5 (citoplasma)	-0.527	0.117	-0.035	0.882	-0.709	<0.0001*	-0.433	0.056
ING3 (citoplasma) x ING1 (c+n)	-0.697	0.025*	-0.123	0.605	-0.818	<0.0001*	-0.802	<0.0001*
ING3 (citoplasma) x ING1 (núcleo)	0.297	0.405	-0.567	0.009*	-0.056	0.816	-0.366	0.113
ING3 (citoplasma) x ING1 (citoplasma)	0.758	0.011*	0.406	0.076	0.809	<0.0001*	0.812	<0.0001*
ING3 (citoplasma) x ING2 (c+n)	-0.042	0.907	0.105	0.659	-0.337	0.146	-0.424	0.062
ING3 (citoplasma) x ING2 (núcleo)	-0.248	0.489	-0.361	0.118	0.451	0.046*	0.316	0.175
ING3 (citoplasma) x ING2 (citoplasma)	0.127	0.726	-0.176	0.458	-0.403	0.078	0.562	0.010*
ING3 (citoplasma) x ING4 (c+n)	-0.927	<0.0001*	-0.241	0.307	-0.351	0.130	-0.283	0.227

ING3 (citoplasma) x ING4 (citoplasma)	0.927	<0.0001*	-0.084	0.724	0.641	0.002*	0.367	0.112
ING3 (citoplasma) x ING5 (c+n)	-0.018	0.960	-0.306	0.189	-0.408	0.075	-0.517	0.020*
ING3 (citoplasma) x ING5 (núcleo)	-0.648	0.043*	0.226	0.337	-0.408	0.075	0.149	0.531
ING3 (citoplasma) x ING5 (citoplasma)	0.527	0.117	0.074	0.755	0.715	<0.0001*	0.532	0.016*
ING4 (c+n) x ING1 (c+n)	0.770	0.009*	0.284	0.225	0.378	0.100	0.295	0.207
ING4 (c+n) x ING1 (núcleo)	-0.321	0.365	0.209	0.376	0.433	0.056	0.023	0.925
ING4 (c+n) x ING1 (citoplasma)	-0.782	0.008*	-0.358	0.121	-0.526	0.017*	-0.323	0.164
ING4 (c+n) x ING2 (c+n)	0.176	0.627	0.212	0.369	0.196	0.407	0.541	0.014*
ING4 (c+n) x ING2 (núcleo)	0.394	0.260	0.383	0.096	0.200	0.398	0.308	0.186
ING4 (c+n) x ING2 (citoplasma)	-0.297	0.405	-0.292	0.212	0.041	0.863	-0.320	0.169
ING4 (c+n) x ING4 (citoplasma)	-1.000	<0.0001*	-0.666	<0.001*	-0.774	<0.0001*	-0.872	<0.0001*
ING4 (c+n) x ING5 (c+n)	0.273	0.446	0.385	0.094	0.338	0.145	0.591	0.006*
ING4 (c+n) x ING5 (núcleo)	0.685	0.029*	-0.319	0.171	0.263	0.264	0.083	0.729
ING4 (c+n) x ING5 (citoplasma)	-0.697	0.025*	0.002	0.995	-0.332	0.152	-0.126	0.596
ING4 (citoplasma) x ING1 (c+n)	-0.770	0.009*	-0.247	0.295	-0.642	0.002*	-0.250	0.288
ING4 (citoplasma) x ING1 (núcleo)	0.321	0.365	0.173	0.466	-0.314	0.177	-0.119	0.618
ING4 (citoplasma) x ING1 (citoplasma)	0.782	0.008*	0.114	0.631	0.744	<0.0001*	0.283	0.227
ING4 (citoplasma) x ING2 (c+n)	-0.176	0.627	0.053	0.826	-0.196	0.407	-0.531	0.016*
ING4 (citoplasma) x ING2 (núcleo)	-0.394	0.260	-0.396	0.084	0.092	0.700	-0.179	0.450
ING4 (citoplasma) x ING2 (citoplasma)	0.297	0.405	0.038	0.875	-0.314	0.178	0.418	0.067
ING4 (citoplasma) x ING5 (c+n)	-0.273	0.446	-0.046	0.848	-0.596	0.006*	-0.499	0.025*
ING4 (citoplasma) x ING5 (núcleo)	-0.685	0.029*	0.083	0.726	-0.407	0.075	-0.033	0.890
ING4 (citoplasma) x ING5 (citoplasma)	0.697	0.025	-0.168	0.480	0.642	0.002*	0.171	0.470
ING5 (c+n) x ING1 (c+n)	0.515	0.128	0.182	0.442	0.280	0.232	0.475	0.034*
ING5 (c+n) x ING1 (núcleo)	-0.321	0.365	0.644	0.002*	0.174	0.462	0.472	0.036*
ING5 (c+n) x ING1 (citoplasma)	-0.382	0.276	-0.357	0.122	-0.286	0.222	-0.615	0.004*
ING5 (c+n) x ING2 (c+n)	0.079	0.829	0.490	0.028*	0.328	0.158	0.570	0.009*
ING5 (c+n) x ING2 (núcleo)	0.527	0.117	-0.064	0.789	-0.176	0.458	-0.164	0.490
ING5 (c+n) x ING2 (citoplasma)	-0.406	0.244	-0.387	0.092	0.469	0.037*	-0.484	0.031*
ING5 (c+n) x ING5 (núcleo)	0.079	0.829	-0.171	0.472	0.489	0.029*	0.320	0.169
ING5 (c+n) x ING5 (citoplasma)	-0.442	0.200	-0.500	0.025*	-0.478	0.033*	-0.528	0.017*
ING5 (citoplasma) x ING1 (c+n)	-0.770	0.009*	0.205	0.387	-0.575	0.008*	-0.483	0.031*
ING5 (citoplasma) x ING1 (núcleo)	-0.006	0.987	-0.274	0.243	0.115	0.629	-0.457	0.043*
ING5 (citoplasma) x ING1 (citoplasma)	0.758	0.011*	-0.142	0.550	0.627	<0.0001*	0.549	0.012*
ING5 (citoplasma) x ING2 (c+n)	-0.321	0.365	-0.403	0.078	-0.042	0.860	-0.438	0.054
ING5 (citoplasma) x ING2 (núcleo)	-0.164	0.651	0.029	0.902	0.565	0.009*	0.281	0.230
ING5 (citoplasma) x ING2 (citoplasma)	0.394	0.260	0.285	0.223	-0.105	0.659	0.528	0.017*
ING5 (citoplasma) x ING5 (núcleo)	-0.806	0.005*	-0.443	0.050*	-0.376	0.102	0.093	0.696
ING5 (núcleo) x ING1 (c+n)	0.745	0.013*	-0.156	0.510	0.349	0.132	-0.235	0.318
ING5 (núcleo) x ING1 (núcleo)	0.091	0.803	-0.102	0.668	0.161	0.498	-0.032	0.892
ING5 (núcleo) x ING1 (citoplasma)	-0.697	0.025*	0.256	0.275	-0.251	0.286	0.149	0.531
ING5 (núcleo) x ING2 (c+n)	0.745	0.013*	0.394	0.086	0.421	0.064	-0.069	0.772
ING5 (núcleo) x ING2 (núcleo)	-0.091	0.803	-0.179	0.450	-0.074	0.758	0.038	0.875
ING5 (núcleo) x ING2 (citoplasma)	-0.200	0.580	-0.253	0.281	0.418	0.067	-0.132	0.578

***Resultados estatisticamente significativos**

5.3 A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ING_s NÃO ESTÁ RELACIONADA À EXPRESSÃO DA P53 EM LESÕES ODONTOGÊNICAS

Possíveis correlações entre a proteína p53 e as proteínas INGs foram avaliadas em todos os grupos de lesões estudados. Foi observada correlação positiva entre a expressão nuclear da proteína p53 com os percentuais de positividade das proteínas ING2 ($r=0,498$; $p=0,025$) e ING3 ($r=0,555$; $p=0,011$) em AMBs, bem como com os percentuais de positividade para proteína ING5 ($r=0,0445$; $p=0,049$) em TOAs (Tabela 4).

Quando considerada a imunomarcação em diferentes localiza es intracelulares pra as proteínas INGs, foram evidenciadas correla es positivas entre a expressão nuclear da p53 com a expressão citoplasma/núcleo da proteína ING1 ($r=0,603$; $p=0,05$) em COs, e com a expressão citoplasma/ núcleo das proteínas ING3 ($r=0,475$; $p=0,034$) e ING4 ($r=0,448$; $p=0,047$) em AMBs (Tabela 5).

Tabela 4. Tamanho da amostra, coeficiente de correla o de Spearman (r) e significância estatística da imunoexpressão da p53, ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontogênico (CO), tumor odontogênico adenoma, desconsiderando a localiza o da marca o intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020

Variáveis	FD (n = 10)		CO (n = 20)		TOA (n = 20)		AMB (n = 20)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
p53 x ING1	-0.423	0.223	0.303	0.194	0.107	0.654	0.321	0.168
p53 x ING2	0.607	0.063	0.310	0.184	0.318	0.172	0.498	0.025*
p53 x ING3	-	-	0.339	0.144	0.239	0.311	0.555	0.011*
p53 x ING4	-	-	0.377	0.101	0.246	0.297	0.084	0.724
p53 x ING5	-0.387	0.270	0.180	0.448	0.445	0.049*	0.059	0.803

Tabela 5. Tamanho da amostra, coeficiente de correla o de Spearman (r) e signific ncia estatística da imunoexpressão da p53, ING3, ING4, ING5, ING1 e ING2 nos espécimes de folículo dentário (FD), ceratocisto odontog nico (CO), tumor odontog nico adenoma, considerando a localiza o da marca o intracelular para estas proteínas. Natal-RN, 2020

Variáveis	FD (n = 10)		CO (n = 20)		TOA (n = 20)		AMB (n = 20)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
p53 x ING1 (c+n)	-0.104	0.774	0.603	0.005*	0.113	0.635	0.386	0.093
p53 x ING1 (núcleo)	0.104	0.774	0.242	0.304	-0.060	0.801	-0.131	0.582
p53 x ING1 (citoplasma)	-0.043	0.906	-0.595	0.006*	-0.069	0.772	-0.328	0.158
p53 x ING2 (c+n)	0.006	0.987	0.320	0.186	0.286	0.221	0.207	0.382
p53 x ING2 (núcleo)	-0.436	0.208	0.308	0.186	0.258	0.273	-0.165	0.486
p53 x ING2 (citoplasma)	0.190	0.599	-0.310	0.184	0.413	0.071	-0.181	0.446
p53 x ING3 (c+n)	-0.031	0.933	0.194	0.413	0.184	0.438	0.475	0.034*
p53 x ING3 (citoplasma)	0.031	0.933	-0.101	0.673	-0.175	0.461	-0.261	0.266
p53 x ING4 (c+n)	-0.067	0.853	0.269	0.251	0.312	0.181	0.448	0.047*
p53 x ING4 (citoplasma)	0.067	0.853	-0.373	0.105	-0.444	0.050*	-0.453	0.045*
p53 x ING5 (c+n)	-0.399	1.000	0.282	0.228	0.363	0.116	0.063	0.791

p53 x ING5 (citoplasma)	0.129	0.723	-0.105	0.661	-0.025	0.917	-0.089	0.710
p53 x ING5 (núcleo)	-0.178	0.623	0.246	0.296	0.377	0.102	-0.164	0.490

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que a desregulação do ciclo celular representa um evento importante no processo de tumorigênese. Alterações na expressão da proteína p53 têm sido evidenciadas tanto em neoplasias malignas quanto benignas (HANNAN e WEINBERG, 2011; GURPINAR e VOUSDEN, 2015; SABAPATHY e LANE, 2017). Desde de a descoberta dos genes da família ING, estudos tem demonstrado o papel das proteínas por eles codificadas na regulação do ciclo celular de maneira dependente da proteína p53 (THALAPILLY et al., 2011; LIU et al., 2013; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre as vias envolvidas no processo de tumorigênese das lesões odontogênicas e não há nenhum relato prévio sobre a correlação entre a imunexpressão das proteínas INGs com a proteína p53 nestas lesões. O presente estudo evidenciou redução da expressão nuclear e citoplasmática das proteínas ING3, ING4 e ING5 em COs e AMBs, lesões que apresentam comportamento biológico mais agressivo e maiores índices de recorrência. Além disso, em alguns casos, a perda da expressão nuclear das INGs esteve negativamente correlacionada à expressão da proteína p53.

A proteína ING3 desempenha papel fundamental na supressão tumoral, uma vez que parece estar associada à parada do ciclo celular por meio da ativação da via PI3K/AKT que consequentemente ocasiona a inativação da ciclina D1 (THALAPILLY et al., 2011; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019). Neste estudo, foi observada a diminuição da expressão da proteína ING3 em AMBs ($p=0,003$) quando comparados aos FDs. Dentre as lesões odontogênicas estudadas, o ameloblastoma se destaca por exibir um comportamento clínico mais agressivo e maiores taxas de recorrência (LEDESMA-MONTES et al., 2007; ALVES et al., 2008; HENRIQUES et al., 2009). Li et al.(2020) demonstraram redução da expressão nuclear e aumento da expressão citoplasmática da proteína ING3 em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, quando comparados à epitélio displásico e epitélio de mucosa saudável na mesma região. Os autores evidenciaram ainda, que a perda de expressão nuclear e o acúmulo citoplasmático desta proteína podem estar relacionados à aceleração do processo tumorigênico por meio de uma maior ativação de proteínas, como a p300 e a p21, nas células neoplásicas. Desta forma, é possível estabelecer uma hipótese de que a diminuição da expressão da ING3 em AMBs possa favorecer à progressão da tumorigênese nesta lesão.

Em contrapartida, alguns estudos evidenciam que o aumento da expressão da proteína ING3 pode estar relacionado à maior proliferação celular e piores prognósticos em câncer de próstata (NABBI et al., 2017) e melanoma (WANG et al., 2007). Em um recente e interessante estudo, Fink et al. (2020) avaliaram as consequências da mutação do gene ING3 no desenvolvimento embrionário de ratos transgênicos, onde observaram que à mutação homozigótica para o gene ING3 resultou em desordens letais ou retardo severo na embriogênese, enquanto a mutação heterozigótica deste gene não ocasionou consequências ao desenvolvimento embrionário dos ratos estudados. Os autores discutem que expressão da proteína ING3 nos ratos com mutação heterozigótica foi suficiente para estimular a proliferação e promover o desenvolvimento embrionário. Contudo, a ausência completa da proteína ING3 resultou em inibição do crescimento celular e em distúrbios na diferenciação de tecidos de origem ectodérmica. Este é um achado interessante, uma vez que a lâmina dentária se origina deste folheto embrionário, e está associada à histogênese de todas as lesões odontogênicas aqui estudadas.

Com relação a proteína ING4, o presente estudo evidenciou redução na expressão desta proteína em COs e AMBs quando comparados aos FDs. A perda de expressão da ING4 esteve relacionada com a perda de diferenciação e à aceleração do processo de tumorigênese em células epiteliais isoladas da próstata. Berguer et al. (2014) evidenciaram a expressão da ING4 como um evento concomitante à expressão da proteína Myc durante o processo de diferenciação destas células. Os autores demonstraram que a inativação da proteína Myc resulta em redução da expressão da ING4, e indicam que há uma associação entre superexpressão destas duas proteínas, onde a Myc parece ativar a ING4 e desencadear eventos que resultam em aceleração do processo de diferenciação celular.

Por sua vez, Moosvi e Rheka (2013) evidenciaram uma alta expressão da oncoproteína c-Myc em COs, TOAs e AMBs. No estudo de Berguer et al. (2014), os autores observaram que o aumento da expressão da Myc associada à perda de expressão da ING4 foi um evento frequente na tumorigênese induzida em modelos experimentais utilizando ratos, indicando que a redução na expressão desta proteína pode estar relacionada à distúrbios na diferenciação, bem como promoção da proliferação celular.

Considerando a localização da expressão da proteína ING4, os resultados deste estudo evidenciaram que há uma diminuição da expressão nuclear e um aumento da expressão citoplasmática em COs e AMBs quando comparados aos FDs. A perda da expressão nuclear desta proteína também é um fenômeno relatado em outras neoplasias, como carcinoma de

células escamosas de cabeça e pescoço (GUNDUZ et al., 2005) e carcinoma renal de células claras (DANTAS *et al.*, 2019).

Em um estudo recente, Quian et al. (2019) evidenciaram que a perda de expressão da proteína ING4 resultou em uma hiperacetilação da área codificante da proteína Nf- κ B em células neoplásicas isoladas de carcinoma hepatocelular, e este evento esteve associado à maior proliferação e migração celular. Santos et al. (2011) observaram um aumento da expressão da proteína Nf- κ B em COs, quando comparados à cistos dentígeros e cistos radiculares. Em um outro estudo, Cecim et al. (2013) evidenciaram uma alta expressão da Nf- κ B em AMBs, e apontaram uma correlação positiva entre a expressão desta proteína com a COX-2 e a AKT fosforilada. Os autores indicam a possibilidade de uma via envolvendo estas proteínas que resulte em maiores índices de proliferação celular, e conseqüentemente na progressão tumorigênica.

Vale também ressaltar os resultados do estudo de Sun et al. (2015), os quais evidenciaram que a superativação dos genes RAS está associada à inativação da ING4–timina-DNA glicosilase (TDG)–Fas, um domínio da proteína ING4 que possui como principal função, a ativação da apoptose. Os autores evidenciam que a atividade aberrante da proteína Ras parece estar associada à perda de expressão da proteína ING4 e, por conseqüência, está relacionada à maior sobrevivência das células neoplásicas durante o processo de tumorigênese. Kumamoto et al. (2004) observaram a presença da superexpressão da proteína Ras em espécimes parafinados de AMBs. Além disso, vários estudos genéticos demonstram a presença de alterações importantes envolvendo genes da família RAS em AMBs (KURPPA *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.* 2014).

Com base nisso, é possível estabelecer a teoria de que a diminuição da expressão da proteína ING4 possa estar associada à etiopatogênese de COs e AMBs. Vale ressaltar que estas lesões apresentam comportamento biológico mais agressivo e maiores índices de recidiva (ALVES et al., 2008; HENRIQUES et al., 2009 BISWAS *et al.*, 2017; BORGHESI *et al.*, 2018) comparado aos outros grupos aqui estudados, nos quais não foi observada redução significativa na expressão da ING4.

Este estudo evidenciou ainda a diminuição da expressão nuclear da proteína ING5 em COs e AMBs, quando comparados aos FDs. Cengiz et al (2010) evidenciaram redução nos níveis de RNAm da ING5 em casos de carcinoma de células escamosas oral, quando comparados à amostras de tecidos normais. Li et al (2010) encontraram uma maior expressão nuclear da proteína ING5 em casos de carcinoma de células escamosas oral bem diferenciados, enquanto a perda de expressão nuclear desta proteína foi observada em casos

menos diferenciados. Além disso, os autores evidenciaram uma correlação positiva entre a expressão nuclear da ING5 e a expressão da proteína p21, indicando que a perda da expressão nuclear desta proteína pode favorecer a sobrevivência das células neoplásicas. Em um estudo mais recente, Liu et al (2017) demonstraram que a inibição da expressão da proteína ING5 resultou em maiores índices de proliferação, migração celular e invasão tecidual em células isoladas de câncer de pulmão. Os autores observaram que a inibição da ING5 esteve associada à super ativação das vias EGFR/PI3K/Akt e IL-6/STAT3, as quais resultam na desregulação de proteínas envolvidas do ciclo e adesão celular.

Interessantemente, Kumamoto e Ooya (2007) evidenciaram aumento da expressão da PI3K em AMBs quando comparados à germes dentários. Levando em consideração estes achados, é possível acreditar que a redução da expressão nuclear da proteína ING5, assim como a redução da expressão das outras proteínas da família ING aqui estudadas, parecem estar envolvidas na etiopatogênese de lesões odontogênicas de comportamento mais agressivo, como os COs e AMBs. Uma vez que os TOAs não evidenciaram perda de expressão significativa de nenhuma destas proteínas, quando comparados aos FDs.

Todas as proteínas da família ING se localizam constitutivamente no citoplasma celular, porém estas proteínas possuem em sua estrutura um domínio de interação com a laminina (LID) e uma sequência de localização nuclear (NLS) que permitem que haja uma translocação destas proteínas para o núcleo (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; DANTAS *et al.*, 2019). A localização nuclear das INGs é de grande importância para as funções regulatórias do ciclo celular e apoptose que estas proteínas exercem. Isto porque o seu papel consiste, em grande parte, na regulação epigenética que realizam por integrarem complexos de acetilação ou deacetilação de histonas que, por sua vez, regulam a transcrição de genes envolvidos em nessas funções celulares (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; LEIGHTON *et al.*, 2017; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019).

Neste estudo, observou-se uma correlação negativa entre a expressão núcleo/citoplasma e a expressão citoplasmática das proteínas ING3, ING4 e ING5 em todos os grupos de lesões odontogênicas estudados. Estes dados indicam que a perda de expressão nuclear está diretamente associada à um acúmulo citoplasmático destas proteínas. Desta forma, é possível que haja alguma alteração funcional ou estrutural que iniba o processo de translocação destas proteínas para o núcleo no processo de patogênese das lesões odontogênicas aqui estudadas. Este foi um achado também observado para as proteínas ING1 e ING2, no estudo de Campos (2019). A perda de expressão nuclear e o acúmulo citoplasmático das proteínas INGs parece estar envolvida na desregulação de diversas funções celulares e tem sido relatado como um

achado frequente em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, bem como em outras neoplasias de diversas localizações (COLES et al., 2009; LI, KIKUCHI e TAKANO, 2011; LI et al., 2020).

Tendo em vista que as proteínas da família ING possuem domínios estruturais conservados entre si, alguns autores estabelecem que podem existir mecanismos compensatórios associados à expressão destas proteínas, desta forma, é possível que um distúrbio envolvendo a expressão de uma ING possa resultar no aumento da expressão de outra (GUÉRILLON; BIGOT; PEDEUX, 2014; LEIGHTON et al., 2017; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019). Considerando os TOAs avaliados neste estudo, foram observadas correlações negativas entre a expressão núcleo/citoplasma da proteína ING3 com a expressão nuclear da ING2, citoplasmática da ING4 e citoplasmática da ING5. Além disso, observou-se correlação negativa entre a expressão núcleo/citoplasma da proteína ING4 com a expressão citoplasmática da ING1. Estas correlações não foram encontradas nos COs e AMBs aqui avaliados. Levando em consideração que o tumor odontogênico adenomatoide representa uma lesão de comportamento biológico indolente (BILODEAU; COLLINS, 2017), é possível estabelecer a teoria de que nesta lesão as proteínas INGs possuem um mecanismo compensatório entre si, o que corrobora com o fato de não terem sido observadas reduções na expressão das proteínas ING3, ING4 e ING5 para os TOAs neste estudo.

Considerando-se os FDs aqui avaliados, observou-se correlação positiva entre a expressão núcleo/citoplasma das proteínas: ING3 e ING4; ING4 e ING1. Também foi evidenciada correlação positiva entre a expressão nuclear da proteína ING5 e a expressão com a expressão citoplasma núcleo das proteínas ING1 e ING2. Esses achados são interessantes, uma vez que apontam que as proteínas INGs se mantem expressas concomitantemente no núcleo celular em tecidos normais. Essas correlações não foram observadas em nenhum outro grupo de lesão odontogênica aqui avaliado. Desta forma, se fortalece a hipótese de que parece haver uma redução dos mecanismos compensatórios envolvidos na expressão nuclear das proteínas da família ING em COs e AMBs.

A proteína p53 atua como um importante ponto de checagem do ciclo celular e está envolvida na regulação de processos secundários como a apoptose, a senescência e a autofagia (MULLER et al., 2011; SUI et al., 2015). A mutação do gene TP53 tem sido evidenciada como um marcador importante do processo de carcinogênese, tendo em vista que a maioria dos cânceres humanos exhibe aumento na expressão da forma da proteína p53 (ONEL & CORDON-CARDO, 2004; HANAHAN & WEINBERG, 2011; WALERYCH et al., 2015).

O presente estudo evidenciou uma maior expressão da p53 em AMBs quando comparados a todos os outros grupos de lesões aqui estudadas. O aumento da expressão desta proteína tem sido associado a um maior potencial proliferativo das células neoplásicas.. A alta expressão da p53 é um achado mais frequente em neoplasias malignas, incluindo o carcinoma de células escamosas oral (GONZALEZ et al., 2016; VALLONTHAIE et al., 2016). Sendo assim, estes achados corroboram com o fato de que o ameloblastoma apresenta crescimento mais expansivo e maiores índices de recorrência quando comparados às outras lesões aqui estudadas (ALVES et al., 2008; HENRIQUES et al., 2009 BISWAS *et al.*, 2017).

Tenório et al. (2018) demonstraram não haver diferenças significativas na expressão da p53 entre COs, TOAs e AMBs. Em contrapartida, os resultados do presente estudo demonstram diferenças significativas na expressão da p53 entre todos os grupos de lesões estudadas. Sendo a expressão mais alta em AMBs, seguida pelo COs e TOA. Acredita-se que a diferença entre estes resultados tenha se dado devido à análise quantitativa da marcação nuclear da proteína p53, uma vez que no estudo de Tenório et al (2018), foi realizada análise semiquantitativa.

Sabe-se que as proteínas INGs podem regular funções específicas de maneira dependente da proteína p53. Vários estudos evidenciam que as proteínas da família ING, parecem desempenhar funções relacionadas à ativação transcricional da p53, e a partir daí, regular funções celulares referentes ao ciclo celular e à apoptose, de maneira dependente desta proteína (COLES e JONES, 2009; THALAPILLY et al., 2011 LIU et al., 2013; ARCHAMBEAU; BLONDEL; PEDEUX, 2019). No presente estudo, foram observadas correlações positivas entre a expressão da proteína p53 com as proteínas ING2 e ING3 em AMBs e com a proteína ING5 em TOAs. Tendo em vista que a expressão das proteínas ING2 (CAMPOS, 2019) e ING3 apresenta-se reduzida significativamente em AMBs, e a expressão da ING5 não apresenta alterações significativas em TOAs, possivelmente o aumento da expressão da p53 nestas lesões não está relacionado à regulação transcricional pelas proteínas INGs.

O presente estudo evidenciou ainda, correlações positivas entre a expressão da proteína p53 e a expressão núcleo/citoplasma da proteína ING1 em COs. Contudo, Campos (2019) evidenciou redução da expressão núcleo/citoplasma da proteína ING1 nestas lesões quando comparadas aos FDs. Além disso, os resultados aqui apresentados demonstraram um aumento da expressão da p53 em COs quando comparados aos FDs. Ademais, também foi demonstrada uma correlação positiva entre a expressão da p53 com a expressão núcleo/citoplasma das proteínas ING3 e ING4 em AMBs. Desta forma, diferente do esperado, a redução da expressão

nuclear das proteínas INGs não parece estar relacionada à regulação transcricional da proteína p53 nas lesões odontogênicas aqui estudadas. Com isso, é possível estabelecer a hipótese de que as alterações funcionais desencadeadas pela perda de expressão nuclear das proteínas INGs, em COs e AMBs, estejam associadas à funções independentes da proteína p53.

7 CONCLUSÕES

- Os COs e AMBs exibiram menor expressão nuclear das proteínas INGs quando comparados aos TOAs e FDs;
- Há um aumento na expressão nuclear da p53 em todas as lesões odontogênicas estudadas, porém os AMBs exibem maior expressão da p53, seguido pelos COs e TOAs;
- Acredita-se que o aumento da expressão nuclear da p53 não está relacionado à regulação transcricional pelas proteínas INGs nas lesões odontogênicas.
- De forma geral, a perda de expressão nuclear exibida pelas proteínas INGs parece ser um evento envolvido na etiopatogênese de lesões odontogênicas mais agressivas, como COs e AMBs. Sugere-se que as alterações funcionais desencadeadas por esta perda de expressão das INGs devam acontecer de maneira independente da proteína p53.

REFERÊNCIAS

- ALCHALABI, N.J.; MERZA, A.M.; ISSA, S.A. Using Carnoy's Solution in Treatment of Keratocystic Odontogenic Tumor. **Ann Maxillofac Surg.** v.7, n.1, p.51-56. 2017.
- ARCHAMBEAU J., BLONDEL, A., PEDEUX, A. Focus-ING on DNA Integrity: Implication of ING Proteins in Cell Cycle Regulation and DNA Repair Modulation. **Cancers (Basel)** v.24, n1, p.58, 2019
- BARNES, L. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.** Lyon, France: IARC Press. 2005.
- BARRETO, D. C. *et al.* PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **J Dent Res,** v. 79, n. 6, p. 1418-22, 2000.
- BILODEAU, E. A.; COLLINS, B. M. Odontogenic Cysts and Neoplasms. **Surg. Pathol. Clin.** v. 10, n. 1, p. 177-222, 2017.
- BISWAS, S. N. *et al.* Quantitative assessment of silver-stained nucleolar organizer region in odontogenic cysts to correlate the growth and malignant potentiality. **J Oral Maxillofac Pathol.** v.21, n.3, p. 460–461
- BLACK, C. C.; ADDANTE, R. R.; MOHILA, C. A. Intraosseous ameloblastoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 110, n. 5, p. 585-92, 2010.
- BOLOGNA-MOLINA, R *et al.* Detection of MAPK/ERK pathway proteins and KRAS mutations in Adenomatoid Odontogenic Tumors. **Oral Diseases.** 2017 [epub ahead of print]
- BORGHESI, A. *et al.* Odontogenic keratocyst: imaging features of a benign lesion with an aggressive behaviour. **Insights Imaging.** v.9, n.5, p. 883–897, 2018
- 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.
- BORKOSKY, S.S. *et al.* Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. **J Cancer Res ClinOncol,** v.135, n.5, p.703-13, 2009.
- BOSE P. *et al.* ING1 induces apoptosis through direct effects at the mitochondria. **Cell Death Dis.**v.4, p.788, 2013
- BROWN, N. A.; BETZ, B. L. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. **Biomark Cancer.** v. 7, n. 2, p. 19-24, 2015.
- CAMPOS, C. M. **Expressão Imuno-Histoquímica Das Proteínas Ing1 e Ing2 em Lesões Odontogênicas Epiteliais Benignas.** Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal-RN, 2019. Disponível em:
https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/28460/1/Expressaoimunohistoquimica_Campos_2019.pdf
- CECIM, R. L. *et al.* Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. **Journal of Oral Pathology & Medicine,** v.43, n.2, p. 143–147, 2013.
- CENGIZ, B. *et al.* Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma. **Int J Cancer.** v.127, n.9, p.2088-94, 2010.

- COLES A.H. *et al.* Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. **Cancer Res.** 2007
- COLES, A. H.; JONES, S.N. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. **Journal of cellular physiology**, v. 218, p. 45-57, 2009.
- CONTZLER R. *et al.* Histone acetyltransferase HBO1 inhibits NF- κ B activity by coactivator sequestration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.350, p.208–213, 2006.
- CUNHA, J. F. *et al.* Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst: a cohort retrospective analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** v.121, n.6, p.629-35, 2016
- DANTAS, A. *et al.* Biological Functions of the ING Proteins. **Cancers (Basel)** v.19, n.11, p.1817, 2019.
- 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.
- DURMAZ, C.D. *et al.* A Novel PTCH1 Frameshift Mutation Leading to Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. **Cytogenet Genome Res.** v.154, n.2, p.57-61, 2018.
- EFFIOM, O.; OGUNDANA, O.; AKINSHIPO, A.; AKINTOYE, S. Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. **Oral Diseases**, v.24, n.3, p.307–316, 2017.
- ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours. WHO/IARC Classification of Tumours**, 4 ed. Lyon, France: IARC Press. 2017.
- ESMAEILI, M *et al.* A novel crosstalk between the tumor suppressors ING1 and ING2 regulates androgen receptor signaling. **J Mol Med (Berl).** v.94, n.10, p.1167-1179, 2016
- FINK, D. *et al.* Loss of Ing3 Expression Results in Growth Retardation and Embryonic Death **Cancers (Basel)**, v.12, n.1, p. 80, 2020
- 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.; KAZAROV, A.; GUDKOV, A.; RIABOWOL, K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. **Nature Genetics**, v.14, n.4, p.415–420, 1996.
- GOMES CC, GOMEZ RS. PTCH1 gene inactivation is not a Keratocystic odontogenic tumor exclusive alteration. **Oral Oncol** v.47, n.3, p. 226 -27, 2011
- GOMES, C. C. *et al.* Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets. **J Oral Pathol Med.**, 2017. [Epub ahead of print].

- GONZALEZ, J.C.C. *et al.* p53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A study of 208 cases. **Indian J Pathol Microbiol**, v.59,n.2, p.153, 2016
- GOU W.F. *et al.* ING5 suppresses proliferation, apoptosis, migration and invasion, and induces autophagy and differentiation of gastric cancer cells: a good marker for carcinogenesis and subsequent progression. **Oncotarget**. v.14, n.6, p.19552-79, 2015
- GUÉRILLON, C.; BIGOT, N.; PEDEUX, R.. The ING tumor suppressor genes: status in human tumors. **Cancer letters**, v. 345, n. 1, p. 1-16, 2014.
- GUÉRILLON, C.; BIGOT, N.; PEDEUX, R.. The ING tumor suppressor genes: status in human tumors. **Cancer letters**, v. 345, n. 1, p. 1-16, 2014.
- GUÉRILLON, C.; LARRIEU, D.; PEDEUX, R.. ING1 and ING2: multifaceted tumor suppressor genes. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 20, p. 3753-3772, 2013.
- GUNDUZ, E. *et al.* Role of ING Family Genes in Head and Neck Cancer and Their Possible **Applications in Cancer Diagnosis and Treatment. In: Head and Neck Cancer. InTech**, 2012.
- 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.* The inhibitor of growth (ING) gene family: Potential role in cancer therapy. **Curr. Cancer Drug Targets**. 2008.
- GURPINAR, E.; VOUSDEN, K. H. Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. **Trends in Cell Biology**, v.25, n.8, p.486-495, 2015.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, n.5, p.646-74, 2011.
- HASSAN, M. *et al.* Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**, 2014. [Epub ahead of print].
- HAUPT, S. *et al.* Apoptosis - the p53 network. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 20, p. 4077-85, Oct 2003.
- HE, G. H. *et al.* Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 1, p. 104-116, 2005.
- HEIKINHEIMO, K.; KURPPA, K. J.; ELENIOUS, K. Novel targets for the treatment of ameloblastoma. **J Dent Res**. v. 94, n. 2, p. 237-40, 2015.
- HENRIQUES, A. C. G. *et al.* Considerações sobre a classificação e o comportamento biológico dos tumores odontogênicos epiteliais: revisão da literatura. **Rev. Bras. Cancerol**. v. 55, n. 2, p. 175-84, 2009.
- HERTOG, D. *et al.* Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. v. 17, n. 1, p. 76-82, 2012.

- HERTOG, D.; VAN-DER-WAAL, I. Ameloblastoma of the jaws: a critical reappraisal based on a 40-years single institution experience. **Oral Oncol.** v. 46, n. 1, p. 61-4, 2010.
- 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.
- JUSSILA, M. ; THESLEF, I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v.4, n.4, 2012.
- KAHRAMAN, D.; GUHAN, O.; CELASUN, B. A series of 240 odontogenic keratocysts: Should we continue to use the terminology of “keratocystic odontogenic tumour” for the solid variant of odontogenic keratocyst? **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery,** v.46, n.6, p. 942–946, 2018.
- KARACA, C. *et al.* Recurrence rate of odontogenic keratocyst treated by enucleation and peripheral ostectomy: Retrospective case series with up to 12 years of follow-up. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.23, n.4, p.e443-e448, 2018.
- KIM, Michael Paul; ZHANG, Yun; LOZANO, Guillermina. Mutant p53: multiple mechanisms define biologic activity in cancer. **Frontiers in oncology,** v. 5, p. 249, 2015.
- KREPPPEL, M. e ZÖLLER, J. Ameloblastoma-Clinical, radiological, and therapeutic findings. **Oral Diseases,** v.24, n.1-2, p. 63–66, 2018.
- KUMAMOTO, H E OOYA, K.. Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K, and PTEN in ameloblastic tumors **Oral Dis,** v.13, n.5, p.461-7.
- KUPHAL S. e BOSSERHOFF A. Reduced expression and novel splice variants of ING4 in human gastric adenocarcinoma. **J. Pathol.** v.219, p.400–409, 2009.
- LI, T. J. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm? **J Dent Res.** v. 90, n. 2, p.133-42
- LI, X *et al.* Downregulation of nuclear ING3 expression and translocalization to cytoplasm promotes tumorigenesis and progression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Histol Histopathol,** v.35, n.7, p.681-690, 2020
- LI, X, KIKUCHI,K. e TAKANO, Y. ING Genes Work as Tumor Suppressor Genes in the Carcinogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J Oncol.** 2011;
- 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.1573-83, 2010.
- LI, X.H. *et al.* Cytoplasmic expression of p33ING1b is correlated with tumorigenesis and progression of head and neck squamous cell carcinoma. **Histology and Histopathology,** v.26, n.5, p.597-607, 2011.
- 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. 2001, p. 963, 2011.
- LIMA-VERDE-OSTERNE, R. *et al.* The relative frequency of odontogenic tumors: A study of 376 cases in a Brazilian population. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal,** v.22, n.2, p.193-200, 2017

- LIU, Nansong et al. ING5 is a Tip60 cofactor that acetylates p53 in response to DNA damage. **Cancer research**, v. 73, n. 12, p. 3749-3760, 2013.
- LIU, X. *et al.* ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways. **Oncotarget**, v.8, n.33, p.54265-54276, 2017
- LU L *et al.*. Inhibitor of growth 4 (ING4) inhibits hypoxia-induced EMT by decreasing HIF-1 α and snail in HK2 cells. **Acta Histochem.** v.121, p.695–703, 2019.
- LUDWIG, S. *et al.* The ING tumor suppressors in cellular senescence and chromatin. **Cell & Bioscience**, v.1, n.1, p.25, 2005.
- MAHADESH, J. *et al.* Unicystic ameloblastoma with diverse mural proliferation - a hybrid lesion. **Imaging Sci Dent.** v. 41, p. 29-33, 2011.
- METGUD, R.; GUPTA, K. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. **Annals of Diagnostic Pathology**, v.17, n.6, p. 518–521, 2013.
- MOUCHE, A. *et al.* ING3 is required for ATM signaling and DNA repair in response to DNA double strand breaks. **Cell Death & Differentiation**. 2019[epub ahead of print]
- MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H.; NORMAN, J. C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. **J Cell Biol**, v. 192, n. 2, p. 209-18, Jan 2011.
- NABBI, A. *et al.* ING3 promotes prostate cancer growth by activating the androgen receptor. **BMC Med.** 2017
- NAGASHIMA M. *et al.* DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.98, p.9671–9676, 2001
- NEVILLE, B.W. *et al.* Patologia oral e maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
- NOURANI, A. *et al.* Role of an ING1 Growth Regulator in Transcriptional Activation and Targeted Histone Acetylation by the NuA4 Complex. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, n.22, p.7629–7640, 2001.
- NOURANI, A. *et al.* Opposite Role of Yeast ING Family Members in p53-dependent Transcriptional Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.21, 2003
- NOZELL, S. *et al.* The ING4 Tumor Suppressor Attenuates NF- κ B Activity at the Promoters of Target Genes. **Molecular and Cellular Biology**, v.28, n.21, p.6632–6645, 2008.
- OKANO, T *et al.* Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. **Oncol Rep.**, v. 15, n.3, p.545-9, 2006.
- ONEL, K.; CORDON-CARDO, C. MDM2 and prognosis. **Mol. Cancer Res.** v.2, p. 1–8, 2004.
- OSTERNE, R. L. V. *et al.* The relative frequency of odontogenic tumors: A study of 376 cases in a Brazilian population. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v. 22, n.2, p. 193-200, 2017.

- OSTERNE, R. L. V. et al. The relative frequency of odontogenic tumors: A study of 376 cases in a Brazilian population. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v. 22 , n.2, p. 193-200, 2017.
- PEDEUX R., *et al.* ING2 Regulates the Onset of Replicative Senescence by Induction of p300-Dependent p53 **Acetylation.** **Mol. Cell. Biol.** v.25, p.6639–6648, 2005.
- PHILIPSEN, H. P.; KHONGKHUNTHIANG, P.; REICHART, P. A. The adenomatoid odontogenic tumour: an update of selected issues. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.45, n.6,p. 394–398, 2016.
- PINDBORG, J.; KRAMER, I. **WHO international histological classification of tumours. histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts and allied lesions.** WHO, Geneva. 1971.
- POLAK, K. *et al.* Odontogenic keratocyst of the mandible: A case report and literature review. **Dent Med Probl.** v. 56, n.4, p.433-436, 2019.
- QIAN, F. *et al.* ING4 suppresses hepatocellular carcinoma via a NF- κ B/miR-155/FOXO3a signaling axis **Int J Biol Sci**, v.15, n.2, p. 369–385, 2019.
- RAJARAJACHOLAN, U.K. THALAPPILLY, S. e RIABOWOL, K. ING1 regulates rRNA levels by altering nucleolar chromatin structure and mTOR localization. **Nucleic Acids Res.** v. 45, n.4, p. 1776–1792, 2017.
- REICHART, P.; PHILIPSEN, H.; KHONGKHUNTHIAN, P.; SCIUBBA, J. Immunoprofile of the adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Diseases**, v.23, n.6, p. 731–736, 2016.
- REN, X.*et al.* Co-expression of ING4 and P53 enhances hypopharyngeal cancer chemosensitivity to cisplatin *in vivo*. **Molecular Medicine Reports** v.14,p. 2431-2438, 2016
- RUFINI, A.; TUCCI, P.; CELARDO, I.; MELINO, G. Senescence and aging: the critical roles of p53.**Oncogene**, v.32, p.5129–5143, 2013
- RUI, Z. *et al.* Smoothed gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. **Head and Face Med.** v. 10, p. 36, 2014.
- RUSLIN, M., *et al.*The Epidemiology, treatment, and complication of ameloblastoma in East-Indonesia: 6 years retrospective study. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2017. [epub ahead of print]
- RUSSELL M. et al.. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. **Exp. Cell Res.**v.312,p.951–961, 2006.
- SABAPATHY, K.; LANE, D. P. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.15, n.1, p.3–30, 2017.
- SANTOS, P. P. A. *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear factor κ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112,n.4, p.476-83, 2011
- SANTOS, T.S. *et al.* Ameloblastoma em población del noreste de Brasil: um estudo retrospectivo de 60 casos. **Rev. cuba. Estomatol.** v. 47, p. 199-206, 2010.
- SEINTOU, A., MARTINELLI-KLÄY, C. P., & LOMBARDI, T. Unicystic ameloblastoma in children: systematic review of clinicopathological features and

- treatment outcomes. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.43, n.4, p. 405–412, 2014.
- SENGUPTA, S.; HARRIS, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 44-55, Jan 2005.
- SHISEKI, M.i et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. **Cancer research**, v. 63, n. 10, p. 2373-2378, 2003.
- SIRIWARDENA, B. S. M. *et al.* Unicystic ameloblastoma: Analysis of 370 cases in a single center in Sri Lanka. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.47, n.7, p. 706–709, 2018.
- SLUSARENKO DA SILVA, Y.; STOELINGA, P.J.W.; NAELÉRIO-HOMEM, M.D.G. Recurrence of nonsyndromic odontogenic keratocyst after marsupialization and delayed enucleation vs. enucleation alone: a systematic review and meta-analysis. **Oral Maxillofac Surg**. v.3, n.1, p.1-11, 2019.
- SOLIMAN M.A. *et al.* ING1a expression increases during replicative senescence and induces a senescent phenotype. **Ageing Cell**. v.7,p.783–794, 2008.
- 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.
- SPEIDEL, Daniel. The role of DNA damage responses in p53 biology. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 4, p. 501-517, 2015.
- SPEIGHT, P. *et al.* Odontogenic keratocyst. In: EL-NAGGAR AK, CHAN JKC, GRANDIS JR, TAKATA T, SLOOTWEG PJ, editors. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 4 ed., p. 235, 2017.
- STOELINGA, P.J.W.. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT) has again been renamed odontogenic keratocyst (OKC). **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.8, n.3, p.415-416, 2019.
- SUI, X.; HAN, W.; PAN, H. p53-induced autophagy and senescence. **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 11723-4, May 2015.
- SUN, J. *et al.* Oncogenic Ras suppresses ING4-TDG-Fas axis to promote apoptosis resistance. **Oncotarget**, v.6, p.41997–42007, 2015.
- TAKATA, T.; SLOOTWEG, G. P. WHO classification of odontogenic and maxillofacial bone tumours – Introduction. In: EL-NAGGAR AK, CHAN JKC, GRANDIS JR, TAKATA T, SLOOTWEG PJ, editors. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, , 4 ed., p. 205, 2017.
- TALLEN, Gesche; RIABOWOL, Karl. Keep-ING balance: tumor suppression by epigenetic regulation. **FEBS letters**, v. 588, n. 16, p. 2728-2742, 2014.
- TENÓRIO, J.R. *et al.* Apoptosis and cell cycle aberrations in epithelial odontogenic lesions: An evidence by the expression of p53, Bcl-2 and Bax. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v.23, n.2, p.120–e125, 2018.
- THAKUR, A.; TUPKARI, J. V., JOY, T.; HANCHATE, A. V. Adenomatoid odontogenic tumor: What is the true nature? **Medical Hypotheses**, v. 97, p.90–93, 2016
- THAKUR, S. *et al.* ING1 and 5-Azacytidine Act Synergistically to Block Breast Cancer Cell Growth. **PLoS ONE**, v.7 n.8, 2012.

- THAKUR, S. et al. Reduced Ing1 Levels In Breast Cancer Promotes Metastasis. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 4244, 2014.
- VALLEJO-ROSETO, K.A. *et al.* Conservative management of odontogenic keratocyst with long-term 5-year follow-up: Case report and literature review. **Int J Surg Case Rep.**, v.66, p.8-15, 2020.
- VALLONTHAIE, A. *et al.* Expression of Cell Cycle-associated Proteins p53, pRb, p16, p27, and Correlation With Survival: A Comparative Study on Oral Squamous Cell Carcinoma and Verrucous Carcinoma **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.24, n.3, p.193-200, 2016
- WALERYCH, Dawid; LISEK, Kamil; DEL SAL, Giannino. Mutant p53: one, no one, and one hundred thousand. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 289, 2015.
- WANG Y. et al. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. **Clin. Cancer Res**, v. 13, p.4111–4116, 2007.
- WILLIS, S.N.; ADAMS, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.7, p. 617–625, 2005.
- WRIGHT D.G. *et al.* Human T-cell leukemia virus type-1-encoded protein HBZ represses p53 function by inhibiting the acetyltransferase activity of p300/CBP and HBO1. **Oncotarget**. v.7, p.1687–1706, 2016.
- 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, p. 68–77, 2017
- YAMAMOTO, K. *et al.* A Keratocyst in the Buccal Mucosa with the Features of Keratocystic Odontogenic Tumor. **Open Dent J.** v.7, p. 152–156, 2013.
- YANG, R.; LIU, Z.; PENG, C., CAO, W.; JI, T.. Maxillary ameloblastoma: Factors associated with risk of recurrence. **Head & Neck**, v.39, n.5, p. 996–1000, 2017
- YTHIER, D. *et al.* The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer. **International Journal of Cancer**, v.123, n.7, p.1483–1490, 2008.
- ZHANG, F. *et al.* The Inhibitor of Growth Protein 5 (ING5) Depends on INCA1 as a Co-Factor for Its Antiproliferative Effects. **PLoS ONE**, v.6, n.7, 2011
- ZHANG, H, *et al.* Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. **Cancer letters**, v. 261, n. 2, p. 183-192, 2008.
- ZHAO, S. et al. Expression profiles of inhibitor of growth protein 2 in normal and cancer tissues: An immunohistochemical screening analysis. **Mol Med Rep.** v. 13, n. 2, p. 1881-1887, 2016.
- ZHAO, Y. Recurrent keratocystic odontogenic tumours: report of 19 cases. **Dentomaxillofac Radiol.** v.41, n.2, p. 96–102, 2012
- ZHENG, L. *et al.* The Tick Tock of Odontogenesis. **Exp Cell Res.** v.325, n.2, p. 83–89, 2014.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA
CAMPUS CENTRAL

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

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: 2

CAAE: 49318915.9.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.455.557

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa no qual já foram arrolados 100 participantes divididos em 4 grupos de pesquisa. Neste momento foi pedido uma emenda para prorrogação do prazo e para retirada de 3 participantes e a inclusão de dois participantes.

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.

Objetivo da Pesquisa:

o presente estudo terá como enfoque a investigação da perda de heterozigidade (LOH) da família ING (ING1-ING5) e a expressão imunohistoquímica das proteínas ING-1, ING-2, ING-3, ING-4 e ING-5 e marcadores de proliferação celular em uma série de casos de lesões

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA
CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 3.455.557

odontogênicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador, os riscos são mínimos pois serão utilizados os materiais que já estão no depto. de odontologia. E os benefícios serão indiretos para os participantes da pesquisa, mas trará novos aprimoramentos e conhecimentos científicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta emenda solicita a retirada de 3 membros do grupo e a inclusão de dois membros que realizarão os experimentos, com isso foi solicitado também uma prorrogação do prazo para desenvolver a pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos haviam sido anteriormente apresentados. Agora, pesquisadora pede a avaliação da emenda ao seu projeto, anteriormente aprovado por esse CEP, além de um novo termo de confidencialidade.

Recomendações:

Conforme procedimentos definidos na Resolução CNS 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde (MS), cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais, final ou de suspensão para avaliação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a análise ética da emenda a qual solicita a retirada de 3 membros do grupo e a inclusão de outros dois membros que realizarão os experimentos, além da prorrogação do prazo para desenvolver a pesquisa, o CEP Central/UFRN acatou aos pedidos da emenda.

A Emenda está aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP é da responsabilidade do pesquisador responsável:

1. elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE em duas vias. rubricadas em

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA
CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 3.455.557

todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinatura estar na mesma folha (Res. 466/12 - CNS, item IV.5d);

2. desenvolver o projeto conforme o delineado (Res. 466/12 - CNS, item XI.2c);
3. apresentar ao CEP eventuais emendas ou extensões com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP, Brasília - 2007, p. 41);
4. descontinuar o estudo somente após análise e manifestação, por parte do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que o aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes (Res. 446/12 - CNS, item III.2u) ;
5. elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais (Res. 446/12 - CNS, item XI.2d);
6. manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa (Res. 446/12 - CNS, item XI.2f);
7. encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Res. 446/12 - CNS, item XI.2g) e,
8. justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou não publicação dos resultados (Res. 446/12 - CNS, item XI.2h).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	termoconfidencialidade.docx	14/06/2019 10:38:28	Edgar Adre de Andrade	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_137728_0_E1.pdf	14/06/2019 08:14:36		Aceito
Outros	termoconfidencialidade.pdf	14/06/2019 08:00:38	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito
Outros	EMENDA.docx	14/06/2019 07:59:15	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	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 /	TCLE.pdf	09/09/2015 14:42:57	LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ	Aceito

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA
CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 3.455.557

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, 15 de Julho de 2019

Assinado por:

Daniella Regina Arantes Martins Salha
(Coordenador(a))