



Universidade Federal da Bahia

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde



LEONARDO DE ARAÚJO MELO

**EXPRESSÃO DE STAT3 EM TUMOR ODONTOGÊNICO
QUERATOCÍSTICO E AMELOBLASTOMA**

SALVADOR

2015

LEONARDO DE ARAÚJO MELO

**EXPRESSÃO DE STAT3 EM TUMOR ODONTOGÊNICO
QUERATOCÍSTICO E AMELOBLASTOMA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal da Bahia
para obtenção do Título de Doutor em
Odontologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Coorientadora: Prof^a Dra. Clarissa Araújo da Silva Gurgel

Salvador

2015

Dedico a realização deste sonho a Deus, que me proporcionou chegar até aqui, que me habilitou a enfrentar cada novo dia com coragem, sabedoria e perseverança.

A minha esposa, Carina, por sempre acreditar em mim, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

Aos meus pais, Antonio e Noraney, pela dedicação de uma vida inteira, pelos valores ensinados e por todo amor com que sempre me trataram.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), minha eterna Casa, obrigado por ter me acolhido novamente durante esta nova etapa da minha formação!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, agradeço pelos ensinamentos passados e pela doação ao programa.

Aos colegas da turma do doutorado, Adna, Braúlio, Cristiano, Isaac, Gardênia, Leonardo Provedel, Luana, Marcelo, Rebeca pela amizade e companheirismo durante o nosso curso.

À Sueli, secretária do programa, pelo apoio e amizade.

Aos bolsistas, Aderbal, Vanessa, Paula, Robson pela ajuda na fase experimental neste trabalho.

Às colegas, Ludmila Valverde e Rosane Borges pela significativa participação na fase experimental desta pesquisa.

À Carol Brandi, pela significativa participação nas reações de PCR e análise estatística, pelos ensinamentos passados e por me ajudar quando precisei.

Aos Laboratórios de Patologia Cirúrgica da FOUFBA e da FIOCRUZ, por ceder a estrutura necessária para a realização dos experimentos deste estudo.

À Equipe de Cirurgia e Traumatologia da Faculdade de Odontologia da UFBA, por permitir a coleta dos espécimes tumorais durante o tratamento das lesões no Hospital Santo Antônio.

Às professoras Dra Âguida Leitão, Dra. Flávia Caló e Dra. Luciana Ramalho pelo apoio durante a fase que eu fui professor substituto em Histologia e Estomatologia.

À professora Dra Flávia Caló, pela participação na banca de qualificação dos resultados deste trabalho e pelas excelentes sugestões e considerações trazidas.

Aos alunos das disciplinas de Patologia, Histologia e Estomatologia durante o meu tirocício e estágio como professor substituto, com os quais eu aprendi e me tornaram um melhor profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof Dr Jean Nunes dos Santos, por toda sua atenção e incentivo. Agradeço pela competência e dedicação a este trabalho, fundamental para a qualidade do mesmo. Agradeço pela confiança em mim depositada e por todo o conhecimento científico a mim oferecido desde a iniciação científica até a conclusão deste doutorado. Enfim, obrigado por me proporcionar crescimento profissional e pela amizade construída.

À minha coorientadora, Prof Dra Clarissa Gurgel, pela dedicação e por todo o conhecimento passado. Por ter me ajudado desde a iniciação científica, por ter permitido a realização dos experimentos na FIOCRUZ e ter colocado à disposição toda a sua equipe. Obrigado pelas considerações constantes que permitiram uma boa qualidade deste trabalho e pela participação na banca de qualificação com sugestões e considerações relevantes que foram somadas a este trabalho.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

MELO, Leonardo Araújo. Expressão de STAT3 em tumor odontogênico queratocístico e ameloblastoma, 79 f Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Stat3 é um fator de transcrição que está envolvido em diversos processos fisiológicos incluindo proliferação e sobrevivência celular. Expressão elevada da Stat3 tem sido encontrada em diversos tipos de neoplasias de mama, pulmão, próstata, esôfago, fígado e ovário. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão da Stat3 em uma série de tumores odontogênicos para adicionar mais informações ao conhecimento do perfil biológico deste grupo de neoplasias. Para isto, nós quantificamos a expressão do gene *Stat3* por qPCR em 30 amostras de tumores odontogênicos sendo 23 casos de tumor odontogênico queratocístico (TOQ) e 7 casos de ameloblastoma (AB) e comparamos esta expressão com a mucosa bucal não-neoplásica. Nós também mensuramos a expressão da proteína Stat3 por imuno-histoquímica em 43 casos de TOQ e 47 casos de AB. Transcritos de *Stat3* foram encontrados em 96,6% dos tumores estudados, no entanto este gene foi subexpresso nos TOQ e AB comparado a amostra bucal não-neoplásica. TOQs esporádicos apresentaram maiores níveis de transcritos de *Stat3* em relação aos TOQs síndrômicos ($p=0,04$). Não foi observada diferença na expressão do gene *Stat3* entre TOQ e AB ($p=0,88$). Na imunomarcação da Stat3, não foi observada diferença estatística na proporção de células positivas, intensidade de marcação e escore final entre os TOQs esporádicos e associados a SCBCN ($p=0,31$; $p=0,39$; $p=0,65$, respectivamente), bem como não foi observada diferença entre ABs sólidos e unicísticos ($p=0,35$; $p=0,13$; $p=0,37$, respectivamente). ABs apresentaram uma significativa maior imunomarcação da Stat3 em relação aos TOQs ($p=0,03$). Foi evidenciado que os TOQs com inflamação tiveram uma maior proporção de células marcadas pela Stat3 ($p=0,001$). Em TOQs e ABs, a marcação da Stat3 foi predominantemente citoplasmática não sendo observada diferença na localização celular da Stat3 entre estes tumores ($p=0,58$). Nossos achados mostraram uma baixa expressão de Stat3 nos TOQs e ABs. No entanto, foi observada uma maior imunomarcação da Stat3 nos ABs em comparação aos TOQs demonstrando que Stat3 pode contribuir no comportamento mais agressivo dos ABs. A presença de inflamação parece ter influenciado numa maior imunomarcação da Stat3 nos TOQs.

Palavras-chave: tumor odontogênico queratocístico; ameloblastoma; Stat3

MELO, Leonardo Araújo. STAT3 in odontogenic keratocystic tumor and ameloblastoma, 79 f Thesis (PhD degree). School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Stat3 is a transcription factor that is involved in diverse physiological processes including cell proliferation and survival. High expression of STAT3 has been found in many types of breast cancers, lung, prostate, esophagus, liver and ovary. The objective of this study was to investigate the expression of Stat3 in a series of odontogenic tumors to add more information to the knowledge of the biological profile of this group of neoplasms. For this, we quantified expression of Stat3 gene by qPCR in 30 odontogenic tumors samples, which 23 odontogenic tumors of keratocystic (OKT) and 7 cases of ameloblastoma (AB) and comparing this expression to non-neoplastic oral mucosa. We also measure of Stat3 protein expression by immunohistochemistry in 43 cases of OKT and 47 cases of AB. Transcripts of Stat3 were found in 96.6% of tumors studied, however this gene was subexpression in OKT and AB compared to non-neoplastic oral sample. Sporadic OKT had higher levels of Stat3 transcripts in relation to syndromic OKT ($p = 0.04$). There was no difference in the expression of Stat3 gene between OKT and AB ($p = 0.88$). In immunostaining of Stat3, there was no statistical difference in the proportion of positive cells, staining intensity and final score between sporadic and associated with syndromic ($p = 0.31$; $p = 0.39$; $p = 0.65$, respectively) and there was no difference between solids and unicystic ABs ($p = 0.35$; $p = 0.13$; $p = 0.37$, respectively). ABs showed a significantly higher immunostaining of Stat3 in relation to OKT ($p = 0.03$). It was shown that OKT with inflammation have a higher proportion of labeled cells by Stat3 ($p = 0.001$). In OKT and AB, immunostaining of Stat3 was predominantly cytoplasmic and it was not observed difference in cellular localization of Stat3 between these tumors ($p=0.58$). Our findings showed low expression of Stat3 in OKT and ABs. However, we observed a greater immunostaining of Stat3 in ABs compared to OKT demonstrating that Stat3 may contribute to more aggressive behavior of the ABs. The presence of inflammation seems to have influenced a higher immunostaining of Stat3 in OKT.

Keywords: odontogenic tumor keratocystic; ameloblastoma; Stat3

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura da STAT. Diagrama ilustra um dímero de STAT ligado ao DNA. O domínio helicoidal é mostrado em verde, o domínio de ligação ao DNA em vermelho, o domínio de ligação em laranja, o domínio SH2 e os segmentos da tirosina fosforilada são mostrados em azul. O DNA é colorido em cinza. As letras N e C indicam os domínios terminais. 12
- Figura 2 Sinalização Stat. Após ativação pelos receptores dos fatores de crescimento e receptores de citocinas, a STAT torna-se fosforilada e se transloca para o núcleo para ativar a transcrição de genes-alvo. 13
- Figura 3 Interação IL-6 com gp130 resulta na fosforilação da gp130 pelas quinases Jak. gp 130 estimulada nas tirosinas 767, 814,905 e 915 atrai Stat3 e, conseqüentemente, leva a fosforilação da Stat3. 15
- Figura 4 Diagrama esquemático da Stat3 α (92 kDa) e Stat3 β (84 kDa). O arranjo dos vários domínios da Stat3, em conjunto com os números de aminoácidos no domínio limite é indicado. Os aminoácidos 1-715 são idênticos nestas duas isoformas, e a sequência de aminoácidos da porção C-terminal é mais curta para Stat3 β . 17
- Figura 5 Representação esquemática dos genes-alvo da Stat3. Stat3 controla a expressão de genes que são necessários para a proliferação, sobrevivência e migração celular, angiogênese e inflamação. 22
- Figura 6 Demonstração dos genes de referência GAPDH e B2M nas amostras de TOQ e AB. 33

Figura 7	Cálculo matemático do método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$).	34
Figura 8	Expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ) e ameloblastomas (AB) em relação a amostra calibradora.	39
Figura 9	Comparação da expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs) esporádicos e associados a SCBCN.	40
Figura 10	Comparação da expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ) e ameloblastomas (AB).	40
Figura 11	Distribuição dos escores da intensidade e proporção de células marcadas pela Stat3 em TOQs e ABs.	43
Figura 12	Produto dos escores intensidade pela proporção de células marcadas pela Stat3 nos TOQs e ABs.	43
Figura 13	Imunomarcação da Stat3 no tumor odontogênico queratocístico (TOQ). (A) Epitélio do revestimento cístico exibindo imunomarcação citoplasmática da Stat3 em todas as camadas; (B) Marcação citoplasmática nas células da camada intermediária do epitélio do revestimento cístico do TOQ e cápsula fibrosa com intensa inflamação exibindo células inflamatórias e fibroblastos imunomarcados; (C) Marcação nuclear da Stat3 nas células da camada basal e intermediária do epitélio do revestimento cístico do TOQ.	47
Figura 14	Imunomarcação da Stat3 no ameloblastoma (AB). Ameloblastoma sólido (A, B, C) e ameloblastoma unicístico (D). (A) Marcação	49

predominantemente citoplasmática pela Stat3 nas áreas centrais e periféricas das ilhas tumorais; (B) Área cística com brotamentos epiteliais exibindo marcação citoplasmática pela Stat3; (C) Área de metaplasia escamosa imunomarcada; (D) Marcação citoplasmática pela Stat3 em todas as camadas do revestimento cístico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificações dos genes STAT3, GAPDH e B2M utilizados no estudo.	33
Tabela 2	Escore da intensidade da imunomarcção da Stat3.	37
Tabela 3	Escore da proporção das células marcadas pela Stat3.	37
Tabela 4	Escore final obtido pelo produto da multiplicação dos escores da intensidade pela proporção de células marcadas pela Stat3.	38
Tabela 5	Avaliação da proporção de células marcadas, intensidade, escore final e marcação celular em TOQ esporádico e sindrômico e AB sólido e unicístico.	44
Tabela 6	Imunomarcção da Stat3 de acordo com a distribuição histológica em TOQ e AB.	45
Tabela 7	Presença de inflamação em TOQs e ABs e sua relação com a proporção de células imunopositivas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	-	Unidade de medida de quantidade micrograma
µl	-	Unidade de medida de quantidade microlito
aa	-	Aminoácidos
AB	-	Ameloblastoma
ACTB	-	Gene actina beta
AKT ou PKB	-	Proteína quinase B
B2M	-	Gene Beta-2-microglobulina
BCL-2	-	Linfoma de células B (do inglês B cell lymphoma- 2)
BCL-XL	-	Linfoma de células B extra grande (do inglês B-cell lymphoma-extra large)
B-RAF	-	Isoforma B da proteína Raf
BRG1	-	Gene Brahma 1
CCND1	-	Ciclina D1
CDC2	-	Proteína do controle da divisão celular 2 (do inglês cell division control protein 2 homolog)
CDC25A	-	Proteína do controle da divisão celular 25a (do inglês cell division control protein 25A homolog)
CDK9	-	Quinases dependente de ciclina 9
cDNA	-	DNA complementar
c-fos	-	Do inglês finkel osteogenic sarcoma
CK13	-	Citoqueratina 13
c-myc	-	Do inglês myelocytomatosis viral oncogene
COX-2	-	Ciclooxygenase 2
CPqGM	-	Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz
Cq	-	Do inglês, Quantification Cycles
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
EGF	-	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	-	Receptor do fator de crescimento epidérmico

ET AL	-	Colaboradores
FGF	-	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês fibroblast growth factor)
FGF	-	Fator de crescimento de fibroblastos
FOUFBA	-	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FRIZZLED-2	-	Proteínas frizzled são receptores da sinalização Wnt
GAPDH	-	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (do inglês glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GCSF	-	Fator de estimulação de colônias de granulócitos
GLI1	-	Glioma, oncogene homólogo 1
GP130	-	Glicoproteína 130
GRIM-19	-	Proteína reguladora da apoptose induzida por ácido retinóico e interferon
HASCJ	-	Linhagem de células de carcinoma de ovário humano
HGF	-	Fator de crescimento de hepatócitos
HGFR	-	Receptor do fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1	-	Fator indutor de hipóxia-1
HPRT1	-	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (do inglês Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)
ICAM-1	-	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	-	Intérferons γ
IGFR	-	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	-	Interleucina 1
IL-6	-	Interleucina 6
JAK	-	Janus quinase (do inglês, Janus Kinase)
JAK1	-	Janus Kinase 1
JAK2	-	Janus Kinase 2
kDa	-	Quilodalton
Ki-67	-	Antígeno de proliferação celular (do inglês Kiel 67)
LYS685	-	Lisina 685
MAPK	-	Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês mitogen-activated protein kinases)

MCL-1	-	Do inglês Myeloid cell leukemia sequence
M-CSF	-	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MEC	-	Matriz extracelular
Mg	-	Miligrama
MIN	-	Minutos
miRNA	-	Micro RNA
MMP	-	Metaloproteinase de matriz
MMP-14	-	Metaloproteinase de matriz 14
MMP-2	-	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-7	-	Metaloproteinase de matriz 7
MMP-9	-	Metaloproteinase de matriz 9
mTOR	-	Alvo da rapamicina de mamíferos (do inglês mammalian target of rapamycin)
MUC-1	-	Mucina 1
NCOA-1 ^a	-	Receptor coativador de esteróide 1a
NF- κ B	-	Fator nuclear- κ B
ng	-	Nanograma
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
OVCAR-3	-	Linhagem de células de carcinoma de ovário humano
p21	-	Proteína 21 kDa
p27	-	Proteína 27 kDa
p53	-	Proteína 53kDa
pAKT	-	Proteína quinase B fosforilada
PBS	-	Solução salina fosfatada
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês polimerase chain reaction)
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	-	Potencial de hidrogênio
PIAS	-	Proteína inibidora da Stat ativada

PIM-1	-	Proteínas serina-treonina 1 que estão envolvidas em crescimento, diferenciação e apoptose celular (do inglês Proviral Integration Moloney vírus)
PIM-2	-	Proteínas serina-treonina 2 que estão envolvidas em crescimento, diferenciação e apoptose celular (do inglês Proviral Integration Moloney vírus)
p-RPS6	-	Proteína ribossomal S6 fosforilada ((do inglês Ribosomal protein S6)
pSTAT3	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 fosforilada
PTCH1	-	Patched homolog 1
PTPRT	-	Tipo receptor de proteína tirosina fosfatase T (do inglês Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T)
PTPs	-	Proteína tirosina fosfatases
qPCR	-	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
QR	-	Quantificação Relativa
RAF	-	Proteína serina-treonina quinase conhecida como proto-oncogene que atua como transdutor de sinal na via das MAPK (do inglês Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
RAS	-	Vírus do sarcoma de rato (do inglês Rat Sarcoma virus), é uma subfamília GTPases envolvidas na transdução de sinais.
RNA	-	Ácido Ribonucleico
RNA _m	-	Ácido ribonucléico mensageiro (do inglês messenger ribonucleic acid)
RNA _{si}	-	RNA silenciador
RT-PCR	-	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
SCBCN	-	Síndrome do carcinoma basocelular nevíde
SH2	-	Src homólogo-2
SHH	-	Sonic Hedgehog homolog
SK-OV-3	-	Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário
SMO	-	Gene ou proteína smoothed
SOCS	-	Supressores de sinalização de citocinas
SOCS3	-	Supressores de sinalização de citocinas 3

Src	-	Tirosina quinase Src, é um proto-oncogene (Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase Src)
STAT	-	Do inglês signal transducer and activator of transcription, proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição
STAT1	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
STAT2	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 2
STAT3	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
STAT3 α	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 isoforma alfa
STAT3 β	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 isoforma beta
STAT4	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4
STAT5A	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5A
STAT5B	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5B
STAT6	-	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
SUMO	-	Pequeno modificador semelhante à ubiquitina
SW1990	-	Linhagem de adenocarcinoma pancreático humano
TGF- β	-	Fator de crescimento tumoral beta
TOM-20	-	Translocase da membrana externa mitocondrial 20
TOQ	-	Tumor odontogênico queratocístico
UBC	-	Gene ubiquitina C
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	-	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
WNT - 5a	-	Wingless type 5a
WNT	-	Do inglês, wingless type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Tumor Odontogênico Queratocístico	4
2.2 Ameloblastoma	7
2.3 Stat.....	10
2.4 Stat3.....	14
2.5 Genes/Proteínas alvos da Stat3	18
2.6 Papel da STAT3 em neoplasias	22
3. HIPÓTESES	27
4. PROPOSIÇÃO.....	28
4.1 Objetivo Geral.....	28
4.2 Objetivos específicos.....	28
5. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	29
5.2 Obtenção das amostras biológicas	29
5.3 Análise da expressão gênica	31
5.3.1 Extração de RNA total.....	31
5.3.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	32
5.3.3 Análise da expressão gênica.....	34
5.4 Análise da expressão imuno-histoquímica	34
5.4.1 Técnica imuno-histoquímica	34
5.4.2 Análise imuno-histoquímica	36
5.5 Análise estatística	38
6 RESULTADOS	39
6.1 Expressão do gene STAT3 em TOQ e AB.....	39
6.2 Expressão imuno-histoquímica da Stat3 em TOQ e AB	41
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO	78

1. INTRODUÇÃO

Tumor odontogênico queratocístico (TOQ) e ameloblastoma (AB) são neoplasias odontogênicas que frequentemente afetam os ossos maxilares. Embora sejam considerados tumores benignos, eles são caracterizados pela agressividade local devido ao crescimento destrutivo com envolvimento de tecidos adjacentes e alto potencial de recidiva após tratamento (Soluk Tekkesin et al., 2011; Soluk Tekkesin et al., 2012; Bologna-Molina et al., 2014; Rosa et al., 2014). Em adição, o TOQ pode se apresentar tanto esporadicamente ou associado à síndrome de carcinoma basocelular nevíide (SCBCN), também conhecida como síndrome de Gorlin, ocorrendo tipicamente como lesões múltiplas (Hong et al., 2014).

Stat3 (*signal transducers and activators of transcription*) constitui uma família de proteínas que atuam como fator de transcrição e exibem uma organização estrutural conservada de 750-850 aminoácidos (Schaefer, 1997). Foi descrita pela primeira vez como um fator ligante ao DNA, estimulada pela interleucina-6 (IL-6), capaz de regular a expressão de proteínas da fase aguda no fígado em resposta ao estresse (Akira et al., 1994; Kishimoto, 2005). O gene que codifica Stat3 está localizado no cromossomo 17q21 (Aggarwal et al., 2009).

Stat3 é uma proteína citoplasmática latente que é ativada através de fosforilação da tirosina por quinases Jak ou *Src* na presença de citocinas e fatores de crescimento. Stat3 fosforiladas (Stat3p) formam dímeros e se translocam para o núcleo onde se ligam à sequências promotoras específicas nos DNAs e regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e migração celular além de favorecer a angiogênese e

inflamação, eventos estes também fundamentais para o estabelecimento da oncogênese (Yu, Jove, 2004; Frank, 2007; Qi Qr et al., 2014; Bosch-Barrera e Menendez, 2015).

Stat3 ativada pode promover a proliferação celular através do controle da expressão dos genes ciclina D1 e c-myc. Stat3 ainda regula a expressão de genes anti-apoptóticos incluindo Bcl-2, p53, Bcl-xL, MCL-1 e fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) contribuindo para a sobrevivência celular (Kim et al., 2007; Bowman et al., 2000; Barré et al., 2007). Stat3 ainda pode estar envolvida no processo de invasão e metástase tumoral através da regulação de genes que controlam adesão celular, incluindo E-caderina (Suiqing et al., 2005), bem como pelo controle das metaloproteinases de matriz que promovem degradação da matriz extracelular (MEC) (Qiu, et al., 2007; Li et al., 2011). Siveen et al. (2011) ainda relatam que STAT3 desempenha um papel importante na regulação da resposta imune tumoral por ativar a expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento através do controle de genes que são fundamentais para a inflamação, incluindo a IL-6, IL-1 e COX-2.

Stat3 tem sido alvo de muitos estudos em uma variedade de tumores incluindo câncer de ovário (Gest et al., 2012), pâncreas (Huanh e Xie, 2012), mama (Wagner e Schmidt, 2012; Liao et al., 2014), próstata (Sun et al., 2012; Han et al., 2014), pulmão (Liu et al., 2012; Qian et al., 2014), hepatocelular (Chen et al., 2014), da cabeça e pescoço (Yadav et al., 2011) e das glândulas salivares (Araújo et al., 2008). Estes relatos têm demonstrado que Stat3 ativada, através do controle de genes-alvos, contribui para uma maior proliferação, sobrevivência e migração celular, além de promover angiogênese e inflamação favorecendo a formação e progressão tumoral.

Considerando que estudos prévios envolvendo TOQ e AB demonstram alterações em vias de sinalização que controlam proliferação e sobrevivência celular incluindo RAS-RAF-MAPK (Diniz et al., 2015; Malcic et al., 2015; Kurppa et al., 2014; Kumamoto e Ooya,

2007), Sonic Hedghog (Gurgel et al., 2014), Wnt (Siar et al.; 2012; Kibe et al., 2013). E, tendo em vista que Stat3 é um dos componentes de uma via de sinalização que também controla o ciclo celular e apoptose e que alteração na expressão da Stat3 tem contribuído para a progressão e invasividade em diversos tumores, o presente estudo se propõe a avaliar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 em uma série de tumores odontogênicos incluindo tumores odontogênicos queratocísticos esporádicos e associados a SCBCN, e ameloblastomas sólidos e unicísticos, na tentativa de adicionar mais informações ao conhecimento do perfil biológico deste grupo de neoplasias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor Odontogênico Queratocístico

Tumor odontogênico queratocístico (TOQ) é uma neoplasia odontogênica comum nos ossos gnáticos e requer atenção especial pelo seu comportamento biológico agressivo, alta taxa de recorrência, associação com a síndrome do carcinoma basocelular nevóide (SCBCN) e características histológicas típicas, tais como, alto potencial de mitose do revestimento epitelial e presença de cistos satélites na cápsula cística (Guler et al., 2012).

TOQ pode ocorrer em qualquer parte dos ossos maxilares, no entanto, apresentam predileção pela região posterior da mandíbula com pico de incidência em pacientes de 10 a 30 anos. Radiograficamente, apresenta-se como uma área radiolúcida unilocular ou multilocular, com bordas escleróticas uniformes, envolvendo normalmente dentes inclusos. Deslocamento de dentes, reabsorção de raízes, extrusão de dentes erupcionados podem estar presentes (Stoelinga, 2001; Chirapathomsakul et al., 2006; Mello et al., 2011).

Síndrome do carcinoma basocelular nevóide (SCBCN) também conhecida como síndrome de Gorlin-Goltz (GGS) é uma doença autossômica dominante rara, caracterizada por múltiplos carcinomas de células basais, TOQ, sinais palmares e plantares e calcificações ectópicas na foice cerebral. Estas manifestações clínicas surgem na primeira a terceira década de vida, sendo o TOQ uma das primeiras manifestações da síndrome (Mehta et al., 2014). O diagnóstico da SCBCN é baseado nos critérios propostos por Evans et al. (1993) que é estabelecido quando dois critérios maiores ou um maior e dois menores estão presentes. Os critérios maiores incluem: 1) múltiplos carcinomas de células basais ou um ocorrendo abaixo de 20 anos; TOQ nos maxilares histologicamente comprovados;

sinais palmares e plantares (três ou mais); calcificação na foice cerebral; histórico familiar de SCBCN. E como critérios menores: anormalidades esqueléticas, bossa frontal, fibroma ovarianos e cardíacos, cistos linfomesentéricos, fenda no lábio ou palato, polidactilia, catarata e coloboma.

Histopatologicamente, esta lesão caracteriza-se com um tumor cístico revestido por um epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado, atrófico (entre cinco a oito camadas), com células da camada basal disposta de forma paliçada e com núcleos intensamente basofílicos apresentando polaridade invertida. Em algumas lesões, pode-se observar presença de cistos satélites, displasia epitelial e figuras mitóticas (Shear 2002; Philipsen, 2005; Kolar et al., 2006).

Muitos estudos têm buscado avaliar a expressão de marcadores de proliferação, adesão e migração celular, bem como estudar componentes da via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) e MAPK para justificar o comportamento biológico agressivo do TOQ (Vera-Sirera et al., 2015; Amm et al. 2013; Gurgel et al., 2014; Gurgel et al., 2008; Malcic et al., 2015).

Vera-Sirera et al. (2015) observaram imunomarcção de ciclina D1 predominantemente na camada suprabasal dos TOQs e relataram que esta expressão sugere desregulação da progressão do ciclo celular de G1 para a fase S e pode contribuir para a agressividade destas lesões.

Gurgel et al. (2008) observaram imunomarcção de Ki-67 e p53 na camada suprabasal em 97,3% e 91,9% dos casos de TOQ, respectivamente, e relatam que seja possível que o comportamento biológico do TOQs possa estar relacionado com o compartimento proliferativo subbasal do epitélio do revestimento cístico o que foi demonstrado pelos altos níveis de Ki-67 e p53. Moosvi e Rekha (2015) mostraram 80% de

positividade para a expressão de c-Myc principalmente nas camadas basal e suprabasal do TOQ sendo esta expressão significativamente superior a encontrada no cisto dentífero e cisto radicular demonstrando um maior potencial de crescimento do TOQ em relação aos demais cistos.

Amm et al. (2013) avaliaram a expressão de 18 MMPs humanas em células primárias do TOQ e observaram que 9 tipos de MMP foram expressas. MMP-2 e MMP-14 foram altamente expressas no TOQ, enquanto que a MMP-1, 3, 11, 12, 16, 17, e 19 foram moderadamente expressas. Os autores supracitados apesar de não ter encontrado diferenças significativas nos perfis de expressão das MMPs entre populações de células síndromicas e não-síndromicas, concluem relatando que populações de células primárias do TOQ expressam uma ampla gama de MMPs, que provavelmente desempenham um papel no carácter invasivo destes tumores.

Gurgel et al. (2014) observaram uma sobre-expressão de genes da via SHH incluindo PTCH1, SMO, GLI1, CCND1 e BCL2 em todos os casos de TOQ e AB estudados e relataram que a ativação constitutiva desta via no TOQ e AB que pode sugerir um dos mecanismos que participam no desenvolvimento destes tumores.

Malcic et al. (2015) relataram que a desregulação da via MAPK em TOQ leva a uma progressão do ciclo celular e, conseqüentemente, a um aumento da capacidade proliferativa das células epiteliais deste tumor e que seja possível que o envolvimento da sinalização MAPK no desenvolvimento do TOQ possa ser ainda mais agravado pela expressão de citocinas inflamatórias.

2.2 Ameloblastoma

Ameloblastoma (AB) é um tumor odontogênico de alta incidência nos ossos maxilares e a sua relevância clínica é devido ao seu comportamento agressivo e alto potencial de recidiva (Gadbail et al., 2012; Gomes et al., 2010). De acordo com a classificação de tumores da Organização Mundial de Saúde de 2005 as variantes do ameloblastoma são: sólido ou multicístico, unicístico, desmoplásico e periférico (Barnes et al., 2005).

Clinicamente, o AB se apresenta como um aumento de volume assintomático envolvendo a região posterior da mandíbula em indivíduos entre 30 a 60 anos de idade no momento do primeiro diagnóstico. Imaginologicamente, pode apresentar-se como uma área radiolúcida unilocular ou multilocular, normalmente associada a dentes inclusos, deslocando unidades dentárias e reabsorvendo raízes. O padrão sólido pode exibir aspectos característicos descritos como “favos de mel” ou “bolhas de sabão” (Arotiba et al., 2005; Hertog et al., 2012).

Histologicamente, o ameloblastoma sólido pode ser dividido em dois tipos básicos: folicular e plexiforme. O padrão folicular consiste em ilhas epiteliais dentro de um estroma fibroso. Tipicamente, as células da camada periférica dessas ilhas são colunares, dispostas em paliçada e núcleos com polarização invertida, enquanto que as células centrais são arranjadas frouxamente lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte. O padrão plexiforme contém células basais arranjadas em forma de cordões anostomosantes. O estroma nos dois padrões é delicado com frequentes áreas de degeneração cística (Barnes et al., 2005).

Dois padrões histopatológicos também podem ser observados no ameloblastoma unicístico: o luminal e o mural. A variante luminal é uma lesão cística limitada por um epitélio ameloblastomatoso e não existe infiltração tumoral dentro do estroma fibroso. No padrão mural, o epitélio ameloblastomatoso infiltra-se na cápsula cística (Barnes et al., 2005).

Ameloblastomas sólidos frequentemente apresentam um comportamento mais infiltrativo enquanto que os ABs unicísticos são geralmente tumores encapsulados. Em relação ao tratamento, ressecção cirúrgica com margem de segurança de 1,5 a 2 cm tem sido sugerido para o AB sólido, no entanto uma abordagem mais conservadora incluindo marsupialização seguida de enucleação completa tem sido defendida por alguns autores para o AB unicístico (Hertog et al., 2010).

Para Pogrel e Montes (2009), ABs sólidos têm uma alta taxa de recorrência (60-80%) após enucleação simples e exigem um tratamento mais agressivo. O tratamento de escolha é a ressecção com margens de 1cm. Isso pode exigir a ressecção segmentar na mandíbula e maxilectomia parcial. Para o ABs unicísticos, taxas de recorrência também são altas para enucleação simples. O subtipo intraluminal do AB unicístico pode ser tratado com enucleação, mas o subtipo intramural não pode, e uma vez que estes podem não ser identificados é recomendado o tratamento mais agressivo, incluindo enucleação com ostectomia periférica ou enucleação com o tratamento subsequente do osso circundante com nitrogênio líquido ou solução de Carnoy.

Diversos estudos têm buscado avaliar a expressão de marcadores de prognóstico tumoral e componentes de vias de sinalização incluindo RAS-RAF-MAPK, SHH e Wnt para fornecer dados que possam ajudar na compreensão sobre a patogênese do

ameloblastoma (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014; Pereira et al., 2015; Kibe et al., 2013; Siar et al., 2012).

Diniz et al. (2015) avaliaram em AB a mutação no gene BRAF, um potente ativador da MAPK a qual coordena um amplo espectro de processos celulares, incluindo crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose e está desregulada em tumores malignos. Estes autores observaram que 82% dos ameloblastomas mostraram mutação no gene BRAF.

Kurppa et al. (2014) ao avaliar a expressão do gene EGFR e mutação no BRAF em 24 amostras de ameloblastomas, observaram um sobreexpressão gênica e proteica de EGFR em AB comparado ao TOQ e amostras da mucosa bucal. Os autores ainda relatam que o gene BRAF estava mutado em 63% dos casos de ABs o que sugere envolvimento da sinalização RAS-RAF-MAPK na patogênese destes tumores.

Kumamoto e Ooya (2007) relataram que a expressão alterada de MAPK foi mais alta em ameloblastoma do que nos germes dentários em formação, o que sugere que esta via de sinalização pode contribuir na proliferação celular, diferenciação e apoptose tanto no tecido odontogênico em desenvolvimento quanto na formação neoplásica. Segundo estes autores, a expressão alterada da MAPK fosforilada em ameloblastoma sinaliza o envolvimento desta proteína na patogênese deste tumor.

Pereira et al. (2015) mostraram que 12 casos de ameloblastoma dos 14 estudados exibiram localização nuclear de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) sendo a coloração observada principalmente nas células semelhante a ameloblastos e que a ciclina D1 estava no mesmo compartimento celular do EGRF. Para estes autores, EGFR nuclear ocorre em ameloblastomas em associação com a expressão de ciclina D1 e esta coloração foi evidente nos compartimentos mais proliferativos do AB.

Kibe et al. (2013) avaliaram a expressão de componentes da via Wnt e metaloproteinases de matriz por qPCR em uma linhagem de células derivadas de ameloblastoma (AM-3) e observaram que as células derivadas de ameloblastoma sobreexpressaram RNAm de Wnt-5a, frizzled-2, MMP-2 e MMP-9 e os autores sugerem que a sinalização Wnt induz a expressão de MMP-9 em células de ameloblastoma.

Siar et al. (2012) ao examinar a expressão imuno-histoquímica de Wnts incluindo, Wnts 1, 2, 3, 8a, 8b, 10a e 10b em 72 casos de ameloblastomas sendo 19 unicísticos, 35 sólidos, 8 desmoplásicos e 10 recorrentes, relataram expressão de todas Wnts, exceto Wnt-10b, nos ameloblastomas e sobreexpressão de Wnt-1 em todos os subtipos de ABs. Para os autores, a via Wnt é uma importante via de transdução de sinais nos ABs e a Wnt-1 é molécula sinalizadora chave envolvida na tumorigênese deste tumor.

2.3 Stat

Stat (*signal transducers and activators of transcription*) são proteínas citoplasmáticas que exibem domínios conservados contendo de 750 a 850 aminoácidos (Aggarwal et al., 2009). Estruturalmente, Stat apresentam seis domínios conservados: domínio amino-terminal (NH₂), um domínio helicoidal importante para a interação com outros fatores de transcrição e co-reguladores; domínio de ligação ao DNA; domínio de ligação; domínio Src homólogo-2 (SH₂), que é essencial para a interação com locais específicos de tirosina fosforilada para formar dímeros paralelos importantes na sinalização da Stat ativada; e um domínio carboxi-terminal conhecido como domínio ativador da transcrição o qual sofre fosforilação na tirosina ou serina (Zouein et al., 2013; Kisseleva et al., 2002; Chen et al., 1998) (Fig 1). Stat quando ativada por receptores de superfície celular

se translocam para o núcleo e podem regular a expressão de genes envolvidos em diversas funções fisiológicas das células incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular (Darnell, 1997; Siveen et al., 2014).

Foram descritos sete membros da família das proteínas Stat em mamíferos: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5A, Stat5B, Stat6. Estes membros foram descritos em 3 cromossomos humanos distintos: Stat1 e Stat4 no cromossomo 2, Stat3, Stat5a e Stat5b no cromossomo 17, enquanto que Stat2 e Stat6 no cromossomo 12 (Copeland et al., 1995). Stat estão envolvidas em diversos eventos biológicos tais como desenvolvimento embrionário, morte celular programada, imunidade inata e adaptativa e regulação do crescimento celular (Mali, 2015). Com base nas suas funções, a família Stat pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo consiste de Stat2, Stat4, e Stat6 e estão envolvidos no desenvolvimento de células T e sinalização de interferons- γ (IFN- γ). O segundo grupo inclui Stat1, Stat3, Stat5 e estão envolvidos no desenvolvimento das glândulas mamárias e embriogênese. Este segundo grupo de Stat também desempenha um papel chave na oncogênese uma vez que podem regular o ciclo celular e apoptose (Bromberg e Darnell, 2000; Subramaniam, et al., 2013).

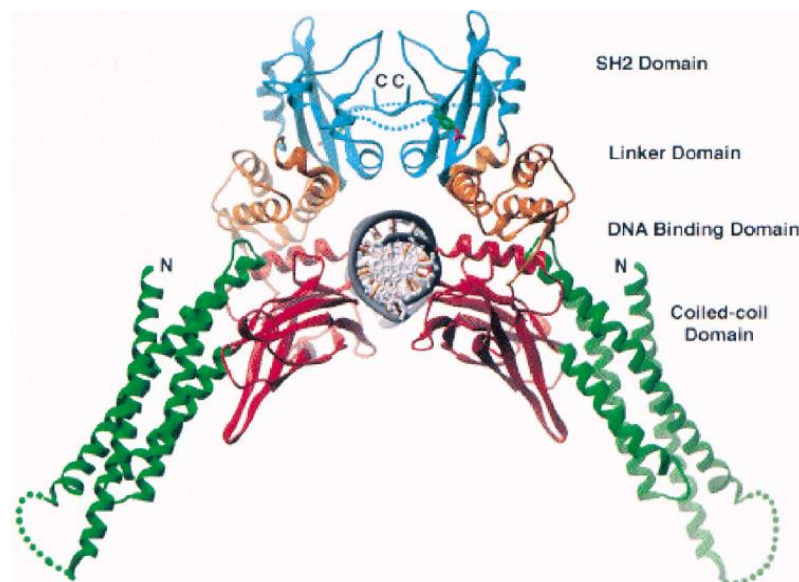


Figura 1. Estrutura da STAT. Diagrama ilustra um dímero de STAT ligado ao DNA. O domínio helicoidal é mostrado em verde, o domínio de ligação ao DNA em vermelho, o domínio de ligação em laranja, o domínio SH2 e os segmentos da tirosina fosforilada são mostrados em azul. O DNA é colorido em cinza. As letras N e C indicam os domínios terminais (Chen et al., 1998).

As Stat são ativadas através da fosforilação de tirosinas após a ligação e estimulação do complexo de quinases com receptor de citocinas ou do complexo receptor com fator de crescimento tais como EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), GCSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) e Interleucina-6 (IL-6). Outras classes de proteínas tirosina quinase não-receptoras também podem estimular a ativação da Stat incluindo quinases da família *Src* e quinases Jak da família Janus, as quais podem ativar diretamente a Stat (Leaman et al., 1996; Devarajan e Huang, 2009) (Fig. 2). Stat1, Stat3, Stat5 podem ser ativadas diretamente pelo receptor de EGF independente de Jak ou *Src* (Mali et al., 2015). Adicionalmente, a ativação da Stat também pode acontecer pela fosforilação dos resíduos de serina (Chung et al., 1997; Ouédraogo et al., 2015). Stat fosforiladas formam

homo ou heterodímeros, se translocam para o núcleo onde se ligam a regiões promotoras específicas de genes alvos conduzindo a um aumento da atividade transcricional (Bowman et al., 2000; Bromberg e Darnell, 2000).

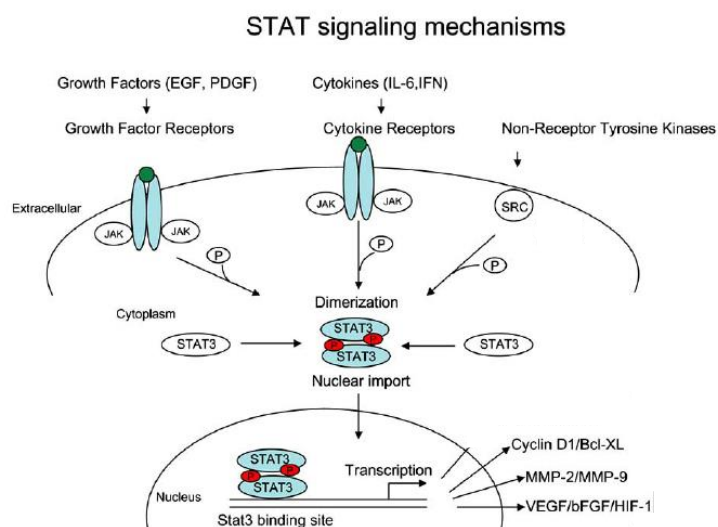


Figura 2. Sinalização Stat. Após ativação pelos receptores dos fatores de crescimento e receptores de citocinas, a STAT torna-se fosforilada e se transloca para o núcleo para ativar a transcrição de genes-alvo (Devarajan e Huang, 2009).

Degradação proteossômica dos componentes da via de transdução Stat, assim como dos receptores e das quinases Jak contribuem para a diminuição da expressão da Stat. Este feedback negativo também pode ser mediado pelas proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) a partir de três mecanismos: 1) ligação com o domínio SH2 das proteínas da família *Src* inativando-as; 2) ligação com as quinases Jak, inativando-as; 3) competição com sítios receptores da Stat impedindo a fosforilação (Groner et al., 2008; Grivennikov e Karin, 2010).

Outro mecanismo de retroalimentação negativa é através das enzimas fosfatases que desfosforilizam a Stat e quinases Jak. A fosfatase 1 e 2 tem mostrado agir diretamente na desfosforilação de quinases Jak e Stat5, respectivamente. A fosfatase, PTPRT, é capaz especificamente de desfosforilar e inativar a Stat3 (Gröner et al., 2008; Grivennikov e Karin, 2010).

2.4 Stat3

Foi descrita pela primeira vez como um fator ligante ao DNA, estimulada pela interleucina-6 (IL-6), capaz de regular a expressão de proteínas da fase aguda no fígado em resposta ao estresse (Akira et al., 1994; Kishimoto, 2005). O gene que codifica Stat3 está localizado no cromossomo 17q21. Stat3 medeia diversas funções biológicas incluindo proliferação, diferenciação e crescimento celular (Aggarwal et al., 2009). No entanto, inativação deste gene causa letalidade embrionária devido a deleção do timo, e em adultos, leva a diminuição da sobrevivência de linfócitos T e das células epiteliais do timo, deleção das células apresentadoras de antígenos e excessiva proliferação de granulócitos (Takeda et al., 1997; Sano et al 2001; Lee et al., 2002).

Stat3 é encontrada no citoplasma da célula normalmente na forma inativa podendo ser ativada por IL-6, EGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Grivennikov e Karin, 2010). A interação das citocinas com receptores na superfície celular (gp130) resulta na ativação da gp130 devido a associação com Janus quinases, especialmente Jak1 e 2, as quais promovem a fosforilação da gp130. Esta molécula fosforilada atrai Stat3 e leva, conseqüentemente, a fosforilação da Stat3. Monômeros de Stat3 fosforilados se combinam para formam dímeros e translocam

para o núcleo para induzir a transcrição dos genes envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Hirano et al., 2000) (Fig 3).

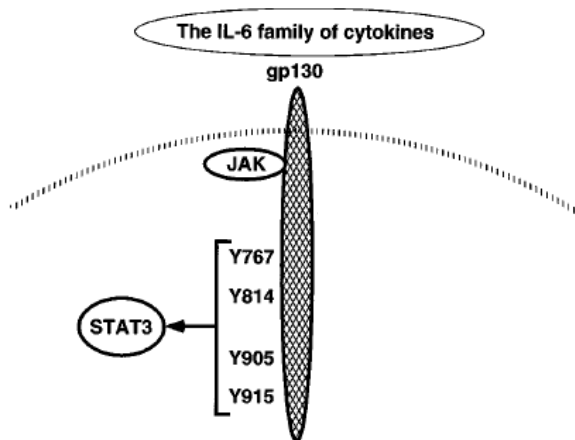


Figura 3. Interação IL-6 com gp130 resulta na fosforilação da gp130 pelas quinases Jak. gp130 estimulada nas tirosinas 767, 814, 905 e 915 atrai Stat3 e, conseqüentemente, leva a fosforilação da Stat3 (Hirano et al., 2000).

A fosforilação da Stat3 pode ocorrer na tirosina 705 ou na serina 727 (Aggarwal et al., 2009). Além disso, Stat3 pode ser ativada pelo mecanismo de acetilação da lisina 685 (Lys⁶⁸⁵) por histona acetiltransferase. A Lys⁶⁸⁵ reside em uma região altamente hidrofílica entre o domínio SH2 e o domínio ativador da transcrição. Acetilação da Stat3 é reversível por histona desacetilase do tipo I (Yuan et al., 2005).

Para ativar genes alvos, dímeros de Stat3 translocados para o núcleo se ligam com vários coativadores complexos tais como, receptor coativador de esteróide 1a (NCOA-1a), quinases dependente de ciclina 9 (CDK9) ou gene Brahma 1 (BRG1). Estas ligações induzem a remodelação local de cromatina em promotores alvos para iniciar o processo de transcrição (Barré et al., 2007).

Stat3 não exerce seus efeitos unicamente como fator de transcrição nuclear. A constatação de que a Stat3 também se localiza nas mitocôndrias e modula a respiração, abriu um novo caminho através do qual Stat3 pode regular o metabolismo celular (Wegrzyn et al., 2009). Em situações de excesso de citocinas e fatores de crescimento, ou estresse oxidativo, Stat3 pode sofrer translocação para a mitocôndria. A importação mitocondrial da Stat3 é dependente de translocases de membrana externa (TOM-20) e interna (GRIM-19). Uma vez importada, Stat3 regula DNA mitocondrial e controla respiração celular, transporte de cadeia de elétrons, potencial de membrana mitocondrial e transformação e crescimento celular (Gianotti et al., 2011; Meir e Larner, 2014).

Duas isoformas principais da Stat3 são encontradas nas células: Stat3 α , a mais abundante de comprimento total (770aa, 92 kDa); e Stat3 β , menos abundante e de comprimento truncado (722aa, 84 kDa) (NG et al., 2012). Estas duas isoformas diferem estruturalmente nos seus domínios de transativação na porção carboxi-terminal, resultando em atividades funcionais distintas. Stat3 β não apresenta 55 aminoácidos que formam o domínio de transativação na porção carboxi-terminal e, em substituição, apresenta a inserção de 7 aminoácidos únicos na sua extremidade carboxi-terminal (Shao et al., 2001) (Fig. 4).

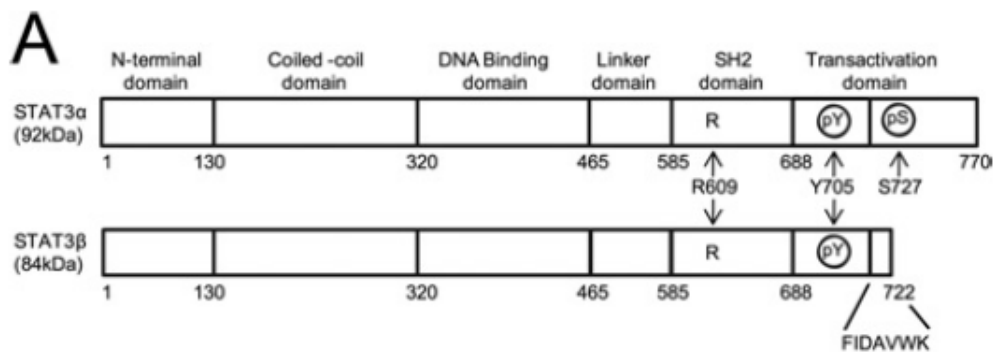


Figura 4. Diagrama esquemático da Stat3 α (92 kDa) e Stat3 β (84 kDa). O arranjo dos vários domínios da Stat3, em conjunto com os números de aminoácidos no domínio limite é indicado. Os aminoácidos 1-715 são idênticos nestas duas isoformas, e a sequência de aminoácidos da porção C-terminal é mais curta para Stat3 β (NG et al., 2012).

Stat3 α e β desempenham funções distintas (Bharadwaj et al., 2014; Shao et al., 2001). A Stat3 β não possui o domínio de transativação, desta forma, ela funciona como uma isoforma negativa reduzindo a função transcricional da Stat3 α (Caldenhoven et al., 1996). Porém, esta isoforma também desempenha outras funções atuando na modulação da resposta de citocinas inflamatórias (Maritano et al., 2004) e diferenciação de granulócitos (Hevehan et al., 2002).

Em células normais, a ativação da Stat3 é rigorosamente controlada para evitar desregulação na expressão gênica. Sob condições fisiológicas, tanto a amplitude quanto a duração da ativação da Stat3 induzida por receptor são processos rigidamente controlados. O pico de fosforilação da Stat3 ocorre no prazo de 15-60 minutos de exposição à citocina ou fator de crescimento, e até mesmo na presença de citocina contínua, a ativação da Stat3 diminui ao longo várias horas (Frank, 2007; Subramaniam et al., 2013).

Em contrapartida, mecanismos regulatórios negativos limitam a atuação da Stat3. Estes mecanismos envolvem os supressores de sinalização de citocinas (SOCS), proteína inibidora da Stat ativada (PIAS), proteínas fosfatases, e degradação proteossômica

dependente de ubiquitinação (Aggarwal et al., 2009). As proteínas SOCS, se ligam a quinases Jak ativadas bloqueando a ligação com o domínio SH2 da Stat3. Oito proteínas SOCS com estruturas semelhantes foram identificadas, no entanto, SOCS3 regula negativamente Stat3 (He et al., 2003; Yoshimura et al., 2007). He et al. (2003) demonstraram que em linhagem de células de carcinoma de pulmão onde o gene SOCS3 foi silenciado por metilação exibiam altos níveis de pStat3 e maior crescimento tumoral, em contraste com células normais que expressavam SOCS3 e apresentavam baixa ou nenhuma expressão de pStat3.

A função da Stat3 também pode ser bloqueada através das PIAS3 que se ligam à Stat3 e inibe a sua interação com o DNA, interferindo na ativação de genes específicos (Kotaja et al., 2000; Chung et al., 1997). Outro mecanismo de inativação da Stat3 é dado pelas proteínas tirosina fosfatases (PTPs). Esta família de proteínas pode ser classificada em três subgrupos: a clássica proteína tirosina fosfatases (PTPs), fosfatases de dupla especificidade, e fosfatases de baixo peso molecular (Chen et al., 2004). Em adição, a Stat3 sofre inibição por degradação proteossômica mediada pela ubiquitina (Perry et al., 2004).

2.5 Genes/Proteínas alvos da Stat3

A progressão tumoral envolve a capacidade combinada das células em se proliferar, resistir a apoptose, manter a angiogênese e invadir tecido adjacentes. A Stat3 tem se mostrado um alvo importante em diversos estudos por controlar a expressão de genes envolvidos nestes passos fundamentais para o estabelecimento da oncogênese (Yu, Jove, 2004; Frank, 2007; Subramaniam et al., 2013).

Stat3 ativada promove a proliferação celular principalmente por estimulação da transcrição de genes-chaves associados com a proliferação de células tumorais, tais como ciclina D1, ciclina B, c-myc, Pim-1 e Pim-2 que estão envolvidos na regulação do ciclo celular. A forma ativa da Stat3 favorece a transição da fase G1 para a S por meio da expressão da ciclina D1 (Jarnicki et al., 2010; Kanda et al., 2004; Shirogane et al., 1999). Segundo Fukada et al. (1998), Stat3 também pode favorecer o bloqueio do ciclo celular da fase G1 para S através da regulação positiva de ciclinas D2, D3 e A, bem como, pela concomitante regulação negativa de p21 e p27. Células neoplásicas com ativação constitutiva de Stat3 também tem mostrado níveis elevados de RNAm de ciclina D1 e RNAm de c-myc em comparação com células não-neoplásicas (Bromberg et al., 1999).

Uma das características principais das células tumorais é a capacidade de evitar a morte celular programada. Stat3 também contribui para o processo tumorigênico pela regulação de genes anti-apoptóticos incluindo Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 e survivina contribuindo para a sobrevivência das células tumorais (Kim et al., 2007; Bowman et al., 2000).

Uma das primeiras indicações de que a sinalização Stat3 está envolvida na apoptose veio a partir de estudos com células de mieloma múltiplos os quais mostraram que o aumento da expressão de Bcl-xL ocorre devido a ativação constitutiva da Stat3. Várias outras proteínas anti-apoptóticas, tais como survivina e outros membros da família Bcl (Bcl-xL, Bcl-2 e Mcl-1), que são conhecidas por exercerem papel na sobrevivência da célula tumoral, são genes que podem ser regulados pela Stat3 (Catlett-Falcone, 1999). Mcl-1 é outro gene anti-apoptótico da família Bcl-2, que é um alvo da Stat3. O bloqueio da Stat3 em células tumorais humanas tem mostrado sub-regular a expressão de Mcl-1 e, conseqüentemente, induz a célula tumoral à apoptose (Yu e Jove, 2004). Stat3 ativada

também pode induzir o fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) que subsequentemente inibe a apoptose. Além disso, tem sido mostrado que Stat3 reprime a transcrição do gene p53, ligando-se ao promotor do p53, inibindo, desta forma, a apoptose das células tumorais (Barré et al., 2007).

A capacidade das células do tumor em proliferar e resistir a apoptose é muitas vezes necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento tumoral. Para que o tumor possa sustentar o seu crescimento é necessária a formação de novos vasos sanguíneos. Desta forma, a maioria dos tumores produzem fatores para estimular angiogênese. O mais potente fator angiogênico é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Yu e Jove, 2004; Jarnicki et al., 2010).

Stat3 regula a transcrição de fatores angiogênicos incluindo o VEGF, fator de crescimento de fibroblastos e do fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α), os quais participam da angiogênese por induzir a migração, proliferação e diferenciação das células endoteliais (Grivennikov e Karin, 2010). Alguns estudos envolvendo carcinoma de mama (Niu et al., 2002), esofágico (Zhang et al., 2014), gástrico (Deng et al., 2014) têm demonstrado que a ativação constitutiva da Stat3 aumenta a expressão do VEGF e atividade angiogênica do tumor, enquanto que o bloqueio da sinalização Stat3 inibe a sobre-regulação do VEGF e leva a uma diminuição da permeabilidade vascular.

Inflamação também contribui para formação dos carcinomas humanos. A resposta inflamatória pode induzir a morte celular por necrose acompanhada por ativação de numerosas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas que facilitam a proliferação celular e sobrevivência (Coussens e Werb, 2002). Stat3 pode desempenhar um papel importante na regulação da resposta imune tumoral pelo controle da expressão de citocinas inflamatórias, responsáveis por ativar a imunidade inata e adaptativa anti-tumor (Huang,

2007). Células do microambiente tumoral são capazes de induzir um grande número de genes que exercem influência na inflamação, incluindo a IL-6, IL-1, M-CSF e COX-2 através da ativação da Stat3. Estas citocinas e fatores de crescimento liberadas pelas células tumorais se associam com receptores das células inflamatórias estromais ativando Stat3 destas células que acabam por liberar mais mediadores inflamatórios criando assim um ciclo (Siveen et al., 2014).

Stat3 ainda pode estar envolvida no processo de invasão e metástase tumoral através da regulação de genes que controlam adesão celular, bem como pelo controle de genes que promovem degradação da matriz extracelular (MEC) e membrana basal (Siveen et al., 2014). Diversos estudos demonstram que Stat3 pode participar destes processos através do controle das metaloproteinases de matriz (MMPs) (Qiu, et al., 2007; Li et al., 2011) e E-caderina (Suiqing et al., 2005). Suiqing et al. (2005) demonstraram que a expressão de p-Stat3 correlacionou-se com a profundidade de invasão tumoral e com metástases o que foi demonstrado com uma correlação negativa entre a intensidade de expressão de p-Stat3 e E-caderina em carcinoma escamocelular cutâneo. Qiu et al. (2007) observaram que o silenciamento do gene STAT3 por RNA de interferência em uma linhagem celular de carcinoma pancreático levou a um decréscimo de MMP-2 em nível do RNAm e de proteínas. Li et al. (2011) relataram que a expressão de MMP-7 foi reduzida em tumores silenciados para STAT3 e que a taxa de invasão neste tumores foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle. A figura 5 ilustra o papel da Stat3 ativada no controle de genes-alvo.

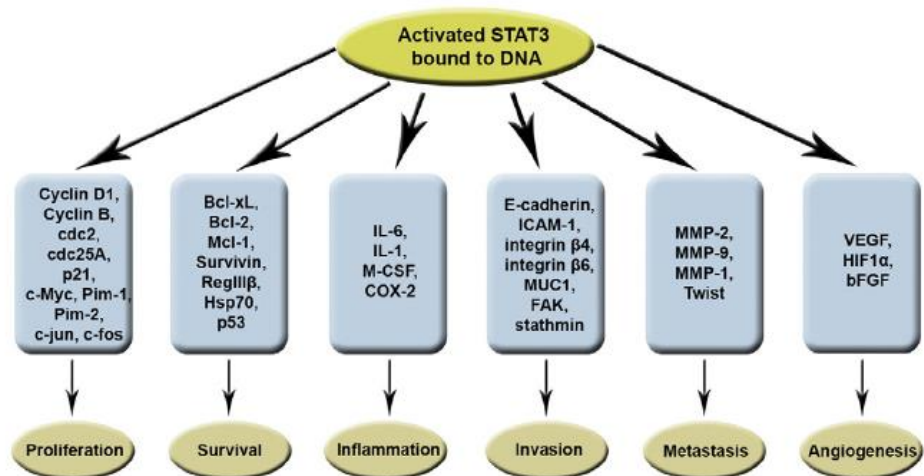


Figura 5. Representação esquemática dos genes-alvo da Stat3. Stat3 controla a expressão de genes que são necessários para a proliferação, sobrevivência e migração celular, angiogênese e inflamação (Siveen et al., 2014).

2.6 Papel da STAT3 em neoplasias

Devido ao importante papel da Stat3 sobre o ciclo e sobrevivência celular, vários estudos têm demonstrado a ativação constitutiva da Stat3 em diversos cânceres humanos incluindo de ovário (Gest et al., 2012), pâncreas (Huanh e Xie, 2012), mama (Wagner e Schmidt, 2012), próstata (Sun et al., 2012), pulmão (Liu et al., 2012), cabeça e pescoço (Yadav et al., 2011) e das glândulas salivares (Araújo et al., 2008).

O aumento do nível da Stat3 fosforilada em neoplasias não tem sido relacionado com mutação no gene STAT3. Esta ativação constitutiva de Stat3 pode surgir de maneira parácrina através da oferta de citocinas e fatores de crescimento, como IL-6 e EGF, dentro do microambiente tumoral, ou de maneira autócrina devido a eventos genéticos que ocorrem no DNA das células neoplásicas incluindo ativação de oncogenes, inativação de

genes supressor de tumor, mutações em EGFR, alta expressão de *Src* e mutações em genes que levam a Jak hiperativas (Johnston e Grandis, 2011).

Hiperativação da Stat3 também pode resultar de mutações em qualquer regulador negativo da Stat3, por exemplo, o silenciamento da região promotora das SOCS3 por hipermetilação (Greenhalgh e Hilton, 2001; He et al., 2003). Para Kortylewski e Yu (2008), embora a ativação constitutiva da Stat3 possa ser atribuída à subexpressão de proteínas que agem negativamente na via de sinalização Stat3, tais como, as proteínas SOCS1 e 3 e as PIAS, esta ativação ocorre principalmente em resposta a superexpressão de citocinas e fatores de crescimento, a exemplo das IL-6 e EGF que estão excessivamente expressas nas neoplasias. Além disso, oncoproteínas, como as *Src*, que estão frequentemente ativas em vários tipos de cânceres, também são ativadoras da Stat3.

O papel da Stat3 na formação e progressão tumoral tem motivado muitos estudos a desenvolver abordagens para inibir a via de sinalização Stat3. Diversos inibidores da sinalização Stat3 incluindo, *Eriocalyxin B* em linhagem de adenocarcinoma de pulmão (Yo et al., 2015), *Stattic* em linhagem de carcinoma de mama (Schust et al., 2006), *Bigelovin* em linhagem de carcinoma hepático (Zhang et al., 2015); *Cryptotanshinone* em linhagem de carcinoma colorretal (Li et al., 2015) têm sido investigadas e os resultados apontam que a inibição de sinalização da Stat3 pode causar supressão do crescimento tumoral.

Tu et al. (2012) identificaram importantes funções da IL-6 e Stat3 e suas implicações para vários aspectos no desenvolvimento do osteossarcoma. Eles mostraram que a IL-6 produzida pelas células-tronco mesenquimais ativam a Stat3 nas células do tumor. Esta interação IL-6/Stat3 estimula a proliferação, migração e invasão celular, além de inibir a apoptose das células tumorais. Os autores também demonstraram que a inibição

do STAT3 por RNAsi reduz significativamente metástases pulmonares de osteossarcomas *in vitro*.

Gest et al. (2012) ao comparar a expressão da Stat3 em uma linhagem de carcinoma de ovário pouca agressiva (OVCAR-3) com duas linhagens de carcinoma de ovário altamente agressiva (SK-OV-3 e HASCJ) confirmaram, por imunofluorescência, que a Stat3 está ativada em células altamente agressivas de carcinoma de ovário e que a localização da Stat3 nestas células foi nuclear.

Sun et al. (2012) relataram que o aumento da ativação da Stat3 ocorre frequentemente em câncer de próstata e que esta ativação está associada com a progressão tumoral. Os autores demonstraram que o bloqueio da ativação da Stat3 resulta na supressão de crescimento do câncer de próstata. Neste estudo, foi identificado que a inativação da Stat3 se dá por mecanismos inibitórios da fosforilação.

Li et al. (2011) ao avaliar uma linhagem de carcinoma pancreático humano (SW1990) tratada com vetor lentiviral contendo RNA silenciador do STAT3, observaram que a taxa de proliferação das células tumorais, a densidade microvascular e a expressão de metaloproteinase de matriz-7 (MMP-7) foram significativamente reduzidas em comparação ao grupo controle.

Deng et al. (2013) verificaram que a expressão de RNAm de STAT3 e a expressão da proteína Stat3 foi significativamente maior em células de carcinoma gástrico em comparação com as células adjacentes ao tumor e com células gástricas normais. Os autores ainda observaram que pacientes com alta expressão do gene e da proteína Stat3 apresentavam uma média de sobrevida muito menor do que os pacientes com expressão reduzida ou negativa.

Xuan et al. (2015) ao examinar 100 casos de carcinoma escamocelular esofágico, observaram alta expressão da Stat3 (89%) e da pStat3 (71%) nas células tumorais quando comparadas com a mucosa esofágica normal. Ainda para estes autores, alta expressão da Stat3 e pStat3 foi correlacionada positivamente com altos níveis de metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) e que a supressão da expressão do RNAm de STAT3 e da proteína Stat3 por RNAsi de STAT3 reduziu a invasão celular significativamente.

Huang et al. (2000) relatam que a ativação constitutiva da Stat3 está presente em linhagem celular de carcinoma de ovário, mas esta ativação não está presente na superfície epitelial do ovário normal. Para estes autores, a ativação da Stat3 mostrou relação com alta expressão de Bcl-x e ciclina D1.

Santillán-Benítez et al. (2014) avaliaram a expressão dos genes STAT3 e SOCS3 utilizando RT-qPCR em 43 biópsias de pacientes com tumores benignos da mama e 26 biópsias de carcinoma mamário e observaram baixa expressão do gene STAT3 e alta expressão de SOCS3 nos tumores benignos em comparação com os carcinomas de mama sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Lee et al. (2012) avaliaram a expressão de Stat3 em tumor benigno e maligno de cólon. Segundo estes autores, a expressão e intensidade de marcação da Stat3 foi significativamente menor em adenomas colorretais do que nos adenocarcinomas.

Min e Wei-hong (2009) ao investigar as expressões de Stat3 e pStat3 em tumores ovarianos benignos e em carcinoma epitelial do ovário (CEO) por imuno-histoquímica, observaram que os tumores ovarianos benignos apresentaram uma menor expressão significativa de Stat3 e pStat3 em comparação com o CEO. Os autores também encontraram uma correlação entre as expressões da Stat3 e pStat3 em CEO. A expressão da

Stat3 e pStat3 foram significativamente maiores nos estadiamentos III e IV do que nos estágios de I e II.

3. HIPÓTESES

H1. Stat3 está superexpresso em TOQs e ABs, em nível transcricional e proteico.

H2. ABs apresentam uma maior expressão da Stat3 que os TOQs.

H3. TOQs associados a SCBCN apresentam maior expressão da Stat3 quando comparados aos casos esporádicos.

4. PROPOSIÇÃO

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 em TOQs e ABs, na tentativa de contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese destas lesões.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 em TOQs.
- Avaliar e comparar expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 dos TOQs esporádicos e associados a SCBCN.
- Avaliar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 em ABs.
- Avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica da Stat3 dos subtipos histológicos sólidos e unicísticos dos ABs.
- Comparar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 dos TOQs com ABs.
- Avaliar presença de inflamação nos TOQs e ABs e associar inflamação com a imunomarcação da Stat3.

5. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa, atendendo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 196/96 (Brasil, 1996), foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia obtendo parecer favorável de número 646.051 (Anexo1).

5.2 Obtenção das amostras biológicas

Para a análise da expressão gênica, um total de 30 amostras de tumores odontogênicos foram utilizadas, sendo 7 amostras de ABs e 23 de TOQs. Das 23 amostras de TOQs, 14 foram esporádicos e 9 de associados a SCBCN e das 7 amostras de ABs, 5 foram sólidos e 2 unicísticos. Estas amostras, que foram cedidas para nosso estudo, fazem parte do Biorepositório de Amostras Biológicas do grupo de Pesquisa em Biopatologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM), Salvador, Bahia, e foram coletadas entre os anos de 2005-2013 durante os procedimentos cirúrgicos para tratamento destas lesões no Hospital Santo Antônio/Obras Sociais Irmã Dulce de Salvador, Bahia. Para preservação do material genético durante a coleta, as amostras eram criopreservadas em nitrogênio líquido ou mantidas em RNAlater (Ambiom ®) sendo, posteriormente, armazenadas em um freezer a -80°C até a extração do RNA. Apenas eram coletados os casos que já tinham uma confirmação prévia, após biópsia incisional, por diagnóstico histopatológico de TOQ e AB considerando os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em

2005 para o diagnóstico destes tumores. Após enucleação ou ressecção do TOQ e AB também era feita a confirmação do diagnóstico histopatológico do espécime tumoral completa. Foram excluídos do estudo os casos que apresentavam quantidade de RNA insuficiente e de baixa qualidade. A maioria dos casos utilizados para análise da expressão gênica não apresentavam os correspondentes blocos em parafina para análise imuno-histoquímica, devido a isto, não foram utilizados os mesmos casos para análise da proteína.

Sabendo que o calibrador das reações de qPCR deve ser uma amostra que expresse o gene estudado, investigamos e detectamos a expressão do STAT3 em 5 amostras de mucosa bucal não-neoplásica que apresentaram expressão do STAT3. As amostras foram agrupadas em um *pool* o qual foi utilizado como calibrador das reações. As amostras de mucosa bucal foram coletadas durante o procedimento cirúrgico de exodontia do terceiro molar sobre a região do capuz gengival.

Para análise da expressão imuno-histoquímica, um total de 90 casos de tumores odontogênicos foram incluídos neste estudo sendo 43 TOQs e 47 ABs. Dos 43 casos de TOQs, 35 foram TOQs esporádicos e 8 foram associados a SCBCN, e dos 47 casos de ABs, 30 foram do tipo histológico sólido, enquanto que 17 foram unicísticos. Todos estes casos foram selecionados dos arquivos do laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e do Biorepositório de Amostras Biológicas do CPqGM, Salvador, Bahia, após confirmação do diagnóstico histopatológico realizado por um patologista experiente considerando os critérios estabelecidos pela classificação da OMS (2005) para o diagnóstico do TOQ e do AB. Os registros dos tumores selecionados incluíam casos coletados entre os anos de 2002 a 2014. Foram incluídos no estudo os casos que exibiam quantidade suficiente de tecido tumoral no bloco parafinado disponível sendo excluídos do estudo os casos que não apresentavam

quantidade suficiente de epitélio no tumor considerando que os dois tumores avaliados são tumores de origem epitelial.

Foram considerados como sendo TOQs associados a SCBCN quando os pacientes apresentavam os critérios diagnósticos propostos por Evans et al. (1993). O diagnóstico era estabelecido quando dois critérios maiores ou um maior e dois critérios menores estavam presentes.

5.3 Análise da expressão gênica

5.3.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de 25-30 mg dos TOQs, ABs e mucosa bucal previamente congelados de acordo com as especificações do fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, DE). O DNA genômico foi eliminado utilizando a enzima DNase I (DNase I Amplification Grade kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). A pureza do RNA foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) sendo considerada satisfatória valores entre 1.9-2.05 (A260/280) e a quantidade de RNA total foi avaliada por fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA). A integridade do RNA total foi confirmada num gel de agarose contendo 1% de formaldeído sendo considerado ótimas bandas ribossômicas nítidas e intensas 18s e 28s nas proporções 2:1. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 de µg de RNA total utilizando primers oligo (dT) e Kit Transcriptase Reverse II Superscript II (Invitrogen) num volume de reação de 20 µl de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As misturas destes produtos foram incubadas a 42°C durante 2 min, seguido por 65°C durante 50 min, 42°C durante 55 min,

70°C durante 15 min, 37°C durante 20 min, e 4°C durante 5 min). A eficiência da transcriptase reversa foi avaliada através da amplificação dos genes de referência GAPDH e B2M.

5.3.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata utilizando TaqMan Gene Expression Assays™ inventoriados para o gene STAT3 (Hs00374280_m1), bem como para os genes de referência GAPDH (Hs02758991_g1) e B2M (Hs00984230_m1) (Tab. 1), os quais foram selecionados a partir de um grupo de 6 genes candidatos à referência (HPRT1, 18s, GAPDH, B2M, UBC e ACTB). As amostras foram normalizadas através da média geométrica dos genes de referência (GAPDH e B2M) (Fig. 6).

As reações foram conduzidas no aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA), utilizando placa de 96 poços e com um volume total de 20 µL. Cada um dos poços possuía: 2.5ng/µL de cDNA da amostra (4µL), 1µL de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, A), 10µL de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 5µL de água livre de RNase. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

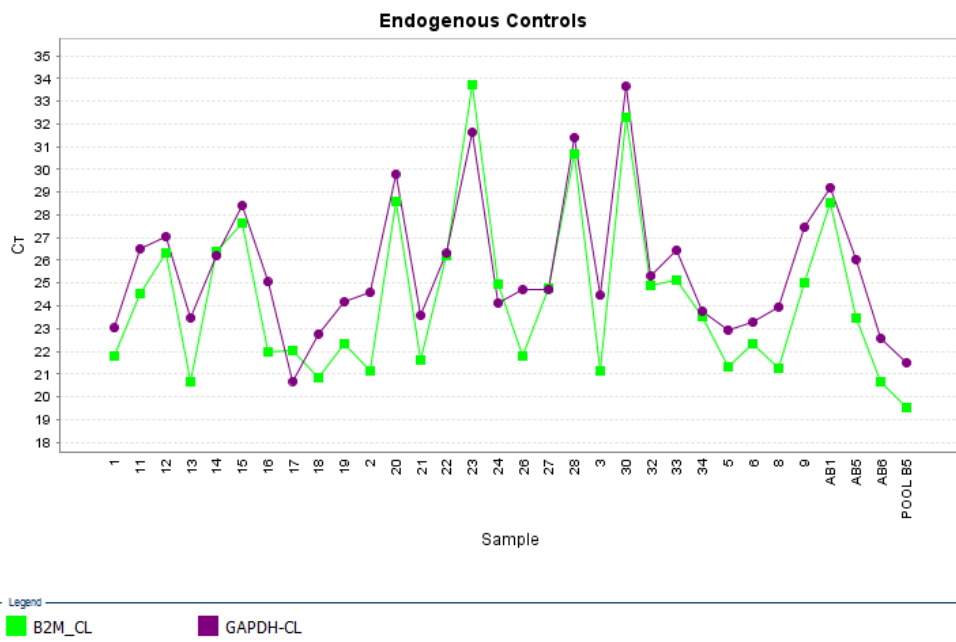


Figura 6. Demonstração dos genes de referência GAPDH e B2M nas amostras de TOQ e AB.

Tabela 1. Especificações dos genes STAT3, GAPDH e B2M utilizados no estudo.

Gene	Assay	RefSeq	Proteína traduzida
STAT3	Hs00374280_m1	NM_003150.3	NP_003141.2
		NM_139276.2	NP_644805.1
		NM_213662.1	NP_644805.1
GAPDH	Hs02758991_g1	NM_001256799.1	NP_001243728.1
		NM_002046.4	NP_002037.2
B2M	Hs00984230_m1	NM_004048.2	NP_004039.1

5.3.3 Análise da expressão gênica

Após as corridas de amplificação, os valores de Quantificação Relativa (QR) foram obtidos com o auxílio do software Expression Suite v.1.0.3 (Applied Biosystems, USA), o qual utiliza o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$) (Fig 7). O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando a média geométrica dos valores de Cq dos genes referências, GAPDH e B2M. O calibrador das reações consistiu de um “pool” de amostras da mucosa bucal não-neoplásica.

Figura 7. Cálculo matemático do método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$)

$$\begin{array}{l} \Delta CQ_{\text{alvo}} = Cq_{\text{alvo}} - Cq_{\text{referência}} \\ \Delta CQ_{\text{calibrador}} = Cq_{\text{calibrador}} - Cq_{\text{referência}} \end{array} \Rightarrow \Delta\Delta CQ = \Delta CQ_{\text{alvo}} - \Delta CQ_{\text{calibrador}} \Rightarrow 2^{-\Delta\Delta CQ} \Delta CQ$$

5.4 Análise da expressão imuno-histoquímica

5.4.1 Técnica imuno-histoquímica

Cortes de três micrometros de espessura foram obtidos a partir dos espécimes emblocados em parafina e acondicionados sobre lâminas previamente silanizadas. Para desparafinização, os cortes foram submetidos a imersão em xilol em temperatura ambiente, em dois tempos de dez minutos e, em seguida, álcool absoluto, em dois tempos de cinco minutos e, posteriormente, foram lavados em água destilada por trinta segundos.

Para a recuperação antigênica foi utilizada uma solução de citrato (pH 6.0) durante 10min (Dako, Carpinteria, USA) para Stat3. As lâminas foram lavadas em água destilada e a área do corte histológico foi demarcada com o auxílio de uma caneta hidrofóbica apropriada (Dako, Carpinteria, USA). Em seguida, os cortes foram embebidos em solução salina fosfatada (PBS) 0,01 molar, pH 7.4. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em água destilada durante 15 minutos, em temperatura ambiente e sob proteção de luz direta. Após lavagem com água destilada, os cortes foram imersos em PBS, em dois tempos de cinco minutos cada.

O anticorpo primário Stat3 (clone F-2, Santa Cruz Biotechnology) foi incubado overnight, à temperatura de 4°C, na diluição de 1:100. Em seguida, os reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. Para revelação das reações, utilizou-se 3,3-diaminobenzidina (Dako ,Carpinteria, USA) por 5 minutos, em câmara escura. Após nova lavagem em água destilada, as seções histológicas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas com álcool absoluto e diafanizadas com xilol para então preceder as montagens das lâminas em *permount*.

Todas as reações foram acompanhadas por um controle positivo sendo utilizados cortes histológicos de carcinoma escamocelular de pulmão. Para controle negativo das reações, o anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo.

5.4.2 Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi feita por um examinador previamente treinado usando microscopia de luz acoplado a um sistema de câmara digital (AXIOCAM ICC3; 2008; ZEISS, Goetingen, Germany, 2008) usando o software (Axio Vision4.8; ZEISS, Goetingen, Germany, 2008). As células imunopositivas foram identificadas como uma cor castanha e foram classificadas quanto a intensidade da marcação seguindo os seguintes critérios: escore 0, nenhuma marcação; escore 1, marcação discreta; escore 2, marcação moderada; ou escore 3, marcação intensa (Tab. 2). A proporção da imunomarcação foi definida de acordo com a proporção de células positivas e também seguiu escores de 0-3: 0, até 5% de células positivas; 1, 6-25% de células positivas; 2, 26-75% de células positivas; 3, >75% de células positivas (Tab. 3). A multiplicação dos escores da intensidade (0-3) pela proporção de células marcadas (0 a >75%) resultou nos seguintes escores finais: quando o produto dos escores era 0, o caso foi classificado como negativo; quando o produto dos dois escores variou de 1 a 3 o caso foi classificado como baixa expressão imuno-histoquímica; e quando o produto era ≥ 4 o caso foi classificado como alta expressão imuno-histoquímica (Tab. 4). (Escore baseado em Dultra et al., 2012).

A distribuição das proteínas foi avaliada particularmente nas camadas basal, intermediária e superficial dos TOQs esporádicos e associados a síndrome (SCBCN), bem como nas ilhas tumorais, epitélio do revestimento cístico e nas áreas de metaplasia escamosa dos ABs. Também foi observado se a imunomarcação era citoplasmática ou nuclear. Ainda foi observado presença de inflamação no estroma tumoral sendo a

inflamação classificada como ausente, não-significante (presença de inflamação discreta) ou significativa (quando a inflamação era moderada ou intensa).

Tabela 2. Escores da intensidade da imunomarcção da Stat3

Escores	Definição
0	Ausência de marcação
1	Marcação discreta
2	Marcação moderada
3	Marcação intensa

Tabela 3. Escores da proporção das células marcadas pela Stat3.

Escores	Definição
0	<5% das células positivas
1	6-25% das células positivas
2	26-75% das células positivas
3	>75% das células positivas

Tabela 4. Escore final obtido pelo produto da multiplicação dos escores da intensidade pela proporção de células marcadas pela Stat3.

Produto escores	Definição
0	Caso negativo
1-3	Baixa expressão
≥ 4	Alta expressão

5.5 Análise estatística

Os dados da expressão gênica e proteica foram avaliados quanto a normalidade segundo a teste de Shapiro-Wilk e Kolgomorov-Smirnov. Devido aos dados não seguirem uma distribuição normal na curva de Gauss foram realizados os testes não paramétricos:

- teste de Mann-Whitney: utilizado para analisar os dados da expressão gênica.
- teste de Fisher: utilizado para analisar os dados da expressão imuno-histoquímica.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como sendo estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão do gene STAT3 em TOQ e AB

Expressão de RNAm de STAT3 foi encontrado em 29 (96,66%) dos 30 dos tumores odontogênicos estudados. Nos TOQs, transcritos de STAT3 estavam presentes em todos os casos com QR variando entre 0,095 a 19,39 e uma mediana de QR= 0,402 (DP= 1,807) estando este gene subexpresso comparado a amostra calibradora (Fig. 8). Vale ressaltar que em dois casos de TOQ os valores de QR dispersavam dos valores das outras amostras sendo de 9,021 e 19,394 e representaram casos de TOQ esporádicos/recorrentes. TOQs esporádicos apresentaram maiores valores de QR em relação aos TOQs síndrômicos ($p=0,04$; teste de Mann Whitney) (Fig. 9). Em ABs, transcritos de STAT3 não foi presente em um caso com valores de QR variando de 0 a 1,315 e uma mediana de QR de 0,325 (DP=1,975) estando este gene subexpresso comparado ao calibrador (Fig. 8). Não foi observada diferença na expressão do gene STAT3 entre TOQ e AB ($p=0,88$; teste de Mann Whitney. Fig. 10).

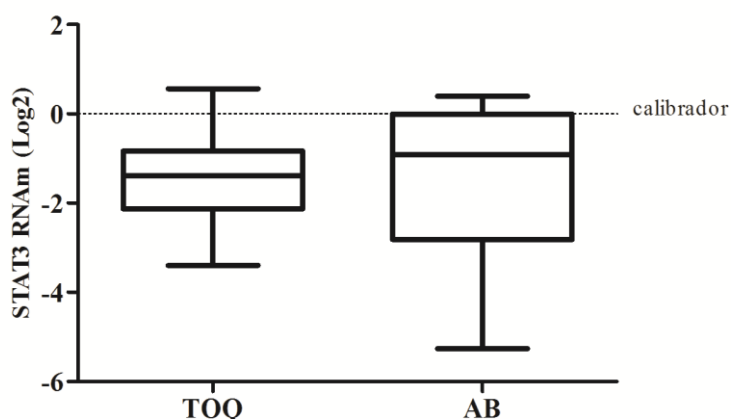


Figura 8. Expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ) e ameloblastomas (AB) em relação a amostra calibradora.

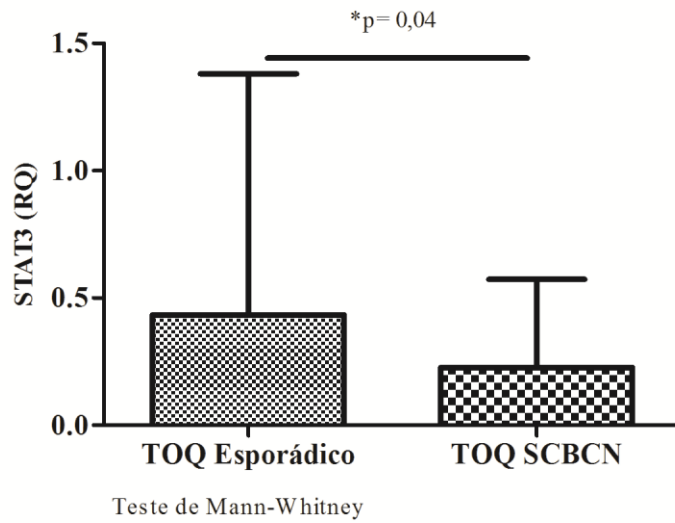


Figura 9. Comparação da expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs) esporádicos e associados a SCBCN.

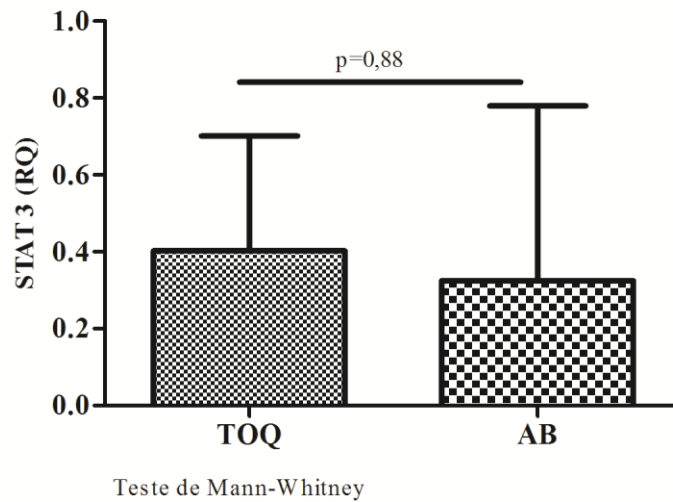


Figura 10. Comparação da expressão do gene STAT3 nos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ) e ameloblastomas (AB).

6.2 Expressão imuno-histoquímica da Stat3 em TOQ e AB

Nós avaliamos a imunomarcagem da Stat3 em 90 casos de tumores odontogênicos sendo 43 TOQs e 47 ABs. Dos 47 casos de TOQs estudados, 35 foram tumores esporádicos e 8 associados a SCBCN. Stat3 foi detectada em 29 casos (67,44%) de TOQ, sendo que 8 casos exibiram escore 3, 9 casos exibiram escore 2 e em 12 casos o escore foi 1. Em relação a intensidade da marcação, 5 casos exibiram marcação intensa, 8 casos exibiram marcação moderada e em 16 casos a marcação foi discreta (Fig. 11). Considerando o escore final obtido pela multiplicação da intensidade pela proporção de células marcadas, 14 casos (32,55%) de TOQ foram negativos, 19 casos (44,18%) foram classificados como baixa expressão imuno-histoquímica da Stat3 e 10 casos (23,25%) foram categorizados como alta expressão (Fig. 12).

A imunomarcagem no TOQ foi evidente principalmente nas camadas basal e intermediária do revestimento epitelial da parede cística fibrosa (Tab. 6 e Fig. 13). Marcação citoplasmática apenas foi evidenciada em 58,62% (n=17) dos casos de TOQs que Stat3 foi detectada, enquanto que marcação citoplasmática e nuclear, simultaneamente, foi observada em 41,37% (n=12) dos casos. Não foi observada diferença estatística na proporção de células positivas, intensidade de marcação e escore final da Stat3 entre os TOQs esporádicos e associados a SCBCN ($p=0,31$; $p=0,39$; $p=0,65$, respectivamente; teste de Fisher). Assim como, não foi observada diferença na marcação nuclear da Stat3 entre os TOQs esporádicos e sindrômicos ($p=0,66$; teste de Fisher) (Tab 5).

Dos 47 casos de ABs avaliados, 17 foram unicísticos e 30 sólidos. Stat3 foi detectada em 37 casos (78,72%) dos casos de ameloblastoma sendo que 19 (51,35%) casos exibiram escore 3, 7 casos (18,91%) exibiram escore 2 e em 11 casos (29,72%) o escore foi

1. Esta marcação foi intensa (n=13), moderada (n=11) e discreta (n=13) em 35,13%, 29,72% e 35,13% dos casos, respectivamente (Fig. 11). Considerando o escore final, 10 casos (21,27%) de AB foram negativos, 16 casos (34,04%) foram classificados como baixa expressão imuno-histoquímica da Stat3 e 21 casos (44,68%) foram categorizados como alta expressão (Fig. 12).

Nos ABs, as células imunomarcadas foram mais frequentemente evidentes no parênquima tumoral das ilhas epiteliais e em todas as camadas de revestimento cístico quando presentes. Por vezes, a marcação nas células periféricas das ilhas tumorais era mais evidente que nas células centrais. Imunoreatividade para a Stat3 também foi observada em áreas de metaplasia escamosa (Tab. 6 e Fig. 14). Marcação citoplasmática apenas foi evidenciada 64,86% (n=24) dos casos de ABs imunoreativos, marcação citoplasmática e nuclear simultaneamente foi observada em 32,43% (n=12) dos casos, enquanto que em apenas um caso (2,7%) foi observado apenas marcação nuclear. Não foi observada diferença estatística na proporção de células positivas, intensidade de marcação e escore final da Stat3 entre os ABs sólidos e unicísticos (p=0,35; p=0,13; p=0,37, respectivamente; teste de Fisher). Também, não foi observada diferença na marcação nuclear da Stat3 entre os ABs sólidos e unicísticos (p=0,32; teste de Fisher) (Tab 5).

Houve diferença estatística na imunomarcação da Stat3 entre TOQ e AB, pode-se observar que os ABs apresentaram uma maior proporção de células marcadas pela Stat3 (p=0,03; teste de Fisher). No entanto, não houve diferença na marcação nuclear da Stat3 entre TOQ e AB (p=0,58; teste de Fisher).

Distribuição dos escores da intensidade e proporção de células marcadas pelo STAT3 nos TOQs e ABs

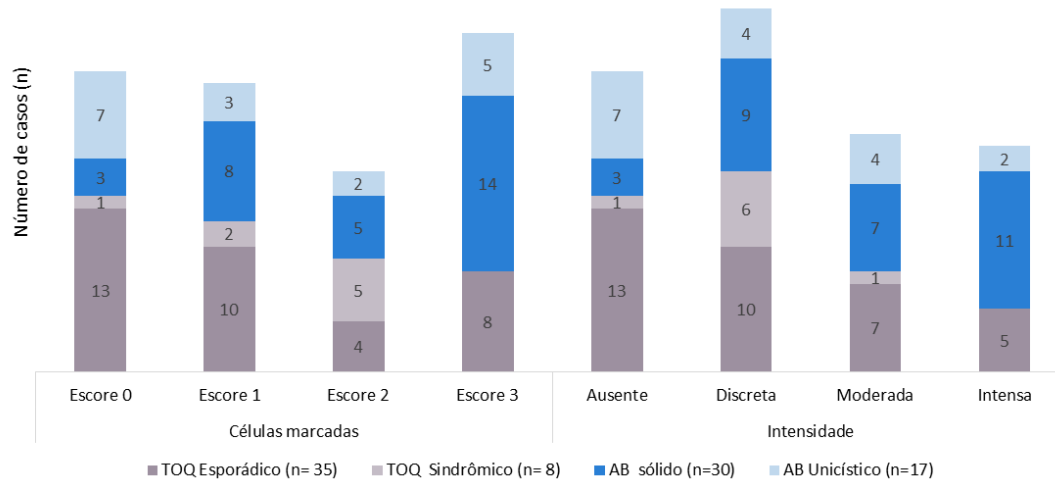


Figura 11. Distribuição dos escores da intensidade e proporção de células marcadas pela Stat3 em TOQs e ABs.

Escore final (intensidade da marcação X proporção de células marcadas)

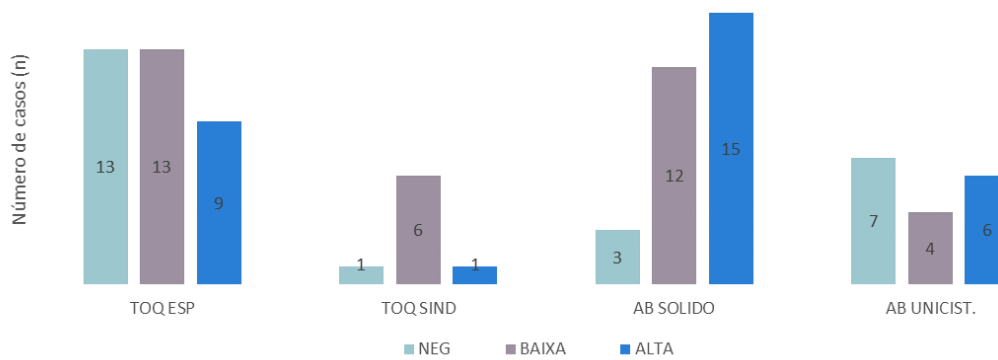


Figura 12. Produto dos escores intensidade pela proporção de células marcadas pela Stat3 nos TOQs e ABs.

Tabela 5. Avaliação da proporção de células marcadas, intensidade, escore final e marcação celular em TOQ esporádico e sindrômico e AB sólido e unicístico.

Tumor	Proporção de células marcadas			Intensidade da marcação		Produto dos Escores		Marcação Celular	
	Total	>75% células positivas (%)	p	Moderada/ Intensa (%)	p	Alta expressão (%)	p	Nuclear (%)	p
TOQ esporádico	35	8 (22,85%)	0,31	12 (34,28%)	0,39	9 (25,71%)	0,65	9 (25,71%)	0,66
TOQ sindrômico	8	0 (0)		1 (12,5%)		1 (12,45)		3 (17,64%)	
AB sólido	30	14 (46,66%)	0,35	18 (60%)	0,13	15 (50%)	0,37	10 (33,3%)	0,32
AB unicístico	17	5 (29,41%)		6 (35,29%)		6 (35,29%)		3 (17,64%)	

Dados estatísticos avaliados pelo teste de Fisher

Tabela 6. Imunomarcção da Stat3 de acordo com a distribuição histológica em TOQ e AB.

Tumor	Camada Epitelial			Ilhas tumorais	Áreas metaplásicas
	Basal	Intermediária	Superficial		
TOQ Esporádico	17	22	6	-	-
TOQ Síndrômico	6	7	5	-	-
AB Unicístico	7	7	7	5	3
AB Sólido	-	-	-	27	15

Dos 29 casos de TOQ imunomarcados, inflamação significativa foi encontrada em 11 casos, inflamação não-significativa em 16 casos, e em 2 casos não foi evidenciada presença de inflamação. Em 16 casos dos TOQs imunomarcados foram evidenciadas imunomarcção da Stat3 nas células inflamatórias. Dos 37 casos de ABs imunomarcados, inflamação significativa foi encontrada em 3 casos, inflamação não-significativa em 28 casos, e em 6 casos não houve inflamação. Em 3 casos de ABs foram evidenciadas imunomarcção da Stat3 nas células inflamatórias. A tabela 7 ilustra a presença de inflamação de acordo com os escores da proporção de células marcadas nos TOQs e ABs imunoreativos. Foi evidenciado associação estatística significativa entre a presença de inflamação com a imunomarcção da Stat3 nos TOQs sendo que TOQs com inflamação tiveram uma maior proporção de células marcadas pela Stat3 ($p=0,001$; teste de Fisher).

Tabela 7. Presença de inflamação em TOQs e ABs e sua relação com a proporção de células imunopositivas.

	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
TOQ				
Inflamação ausente	0	0	1	1
Inflamação não significativa	14	10	5	1
Inflamação significativa	0	2	3	6
AB				
Inflamação ausente	0	2	0	4
Inflamação não significativa	10	9	5	14
Inflamação significativa	0	0	2	1

Figura 13. Imunomarcção da Stat3 no tumor odontogênico queratocístico (TOQ). (A) Epitélio do revestimento cístico exibindo imunomarcção citoplasmática da Stat3 em todas as camadas; (B) Marcação citoplasmática nas células da camada intermediária do epitélio do revestimento cístico do TOQ e cápsula fibrosa com intensa inflamação exibindo células inflamatórias e fibroblastos imunomarcados; (C) Marcação nuclear da Stat3 nas células da camada basal e intermediária do epitélio do revestimento cístico do TOQ.

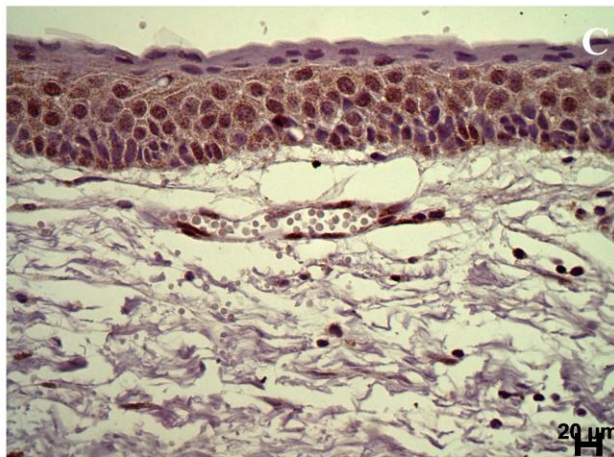
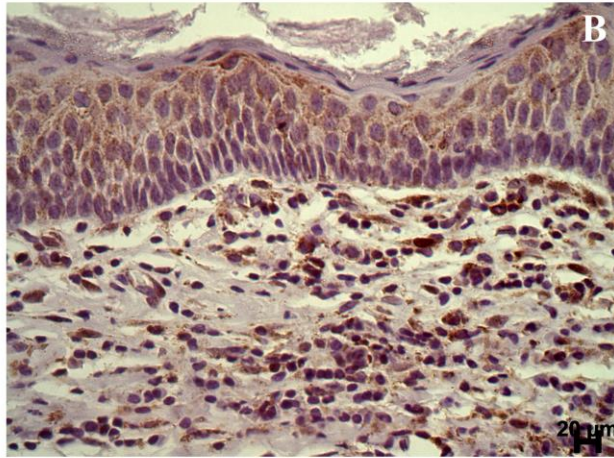
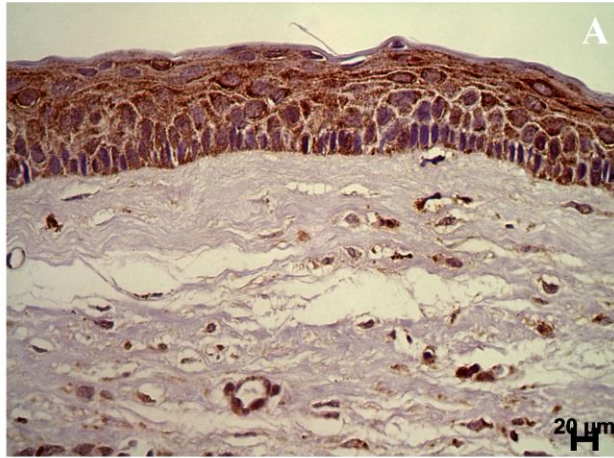
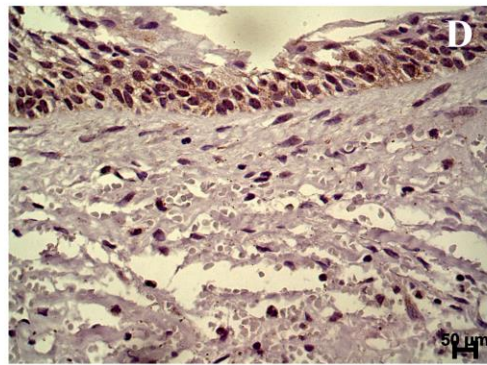
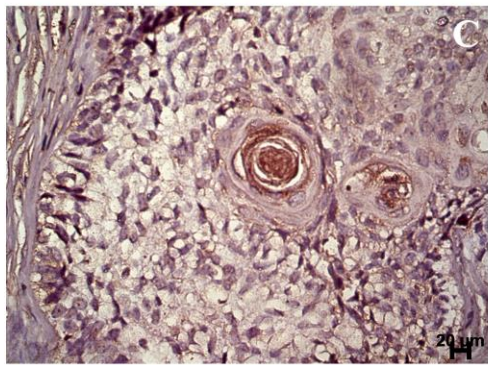
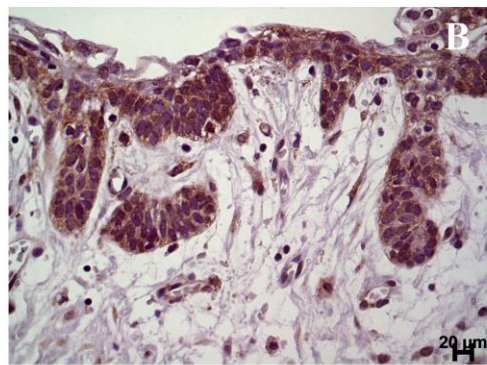
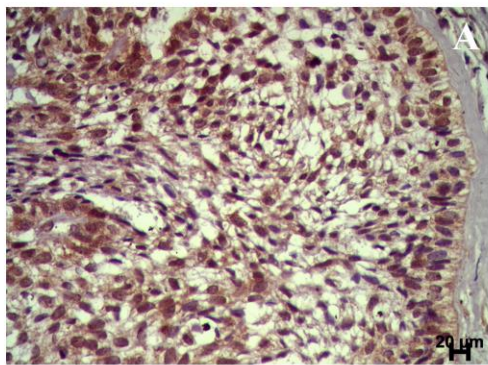


Figura 14. Imunomarcção da Stat3 no ameloblastoma (AB). Ameloblastoma sólido (A, B, C) e ameloblastoma unicístico (D). (A) Marcação predominantemente citoplasmática e eventual marcação nuclear da Stat3 nas áreas centrais e periféricas das ilhas tumorais; (B) Área cística com brotamentos epiteliais exibindo marcação citoplasmática pela Stat3; (C) Área de metaplasia escamosa imunomarcada; (D) Marcação citoplasmática pela Stat3 em todas as camadas do revestimento cístico.



7. DISCUSSÃO

Avanços recentes na compreensão da sinalização Stat3 e no seu papel na progressão e agressividade tumoral levaram ao estabelecimento dessa proteína como um alvo potencial em diversos estudos (Min e Wei-hong, 2009; Yadav et al., 2011; Lee et al., 2012; Gest et al., 2012; Huang e Xie, 2012; Sun et al., 2012; Peyser e Grandis, 2013; Zhang e Lai, 2014; Liao et al., 2014). Este estudo se propôs a avaliar a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 em TOQ e AB, dois tumores odontogênicos frequentes com diferentes graus de comportamento agressivo e distintas taxas de recorrência para adicionar conhecimento sobre o perfil molecular deste grupo de tumores.

Nós observamos uma subexpressão de RNAm de STAT3 em TOQ e AB, assim como observamos que 76,74% dos casos de TOQ e 55,31% dos casos de AB foram negativos ou apresentaram uma baixa expressão imuno-histoquímica da Stat3. Outros estudos que avaliaram a expressão do gene e da proteína Stat3 em tumores benignos também têm observado baixa expressão da Stat3 (Santillán-Benítez et al., 2014; Zhu et al., 2013; Lee et al., 2012; Min e Wei-hong, 2009). Santillán-Benítez et al. (2014) avaliaram a expressão dos genes STAT3 e SOCS3 utilizando RT-qPCR de 43 biópsias de pacientes com adenomas da mama e 26 biópsias de carcinoma mamário. Estes autores observaram baixa expressão do gene STAT3 e alta expressão de SOCS3 nos adenomas em comparação com os carcinomas de mama sendo esta diferença estatisticamente significativa. Zhu et al. (2013) observaram que a expressão imuno-histoquímica da Stat3 foi negativa em 80% dos casos de dos adenomas adrenocorticais, ao contrário dos tumores malignos que exibiram 79,17% dos casos positivos. Lee et al. (2012) compararam a expressão de STAT3 em tumor benigno e maligno de cólon. Segundo estes autores, a expressão e intensidade de marcação

da STAT3 foi significativamente menor em adenomas coloretais do que em adenocarcinomas. Em adição, Min e Wei-hong (2009) avaliaram por imuno-histoquímica a expressão da STAT e pSTAT3 em tumores ovarianos benignos e observaram que o STAT3 e pSTAT3 foi negativo em 45% e 80% dos casos, respectivamente, sendo predominante uma fraca marcação. No entanto, Andreasen et al. (2015) observaram superexpressão de RNAm e da proteína Stat3 tanto nas células ductais quanto nas células mioepiteliais em adenomas pleomórficos da glândula parótida quando comparada com a glândula salivar normal.

De forma interessante, a expressão imuno-histoquímica da Stat3 nos tumores odontogênicos estudados foi mais evidente que a expressão gênica. Stat3 tem duas isoformas predominantes: Stat3 α , a mais abundante de comprimento total e Stat3 β , menos abundante e de comprimento truncado (Shao et al., 2001). A isoforma beta tem sido relatada como uma isoforma negativa reduzindo a função transcricional da Stat3 α (Caldenhoven et al., 1996; Hevehan et al., 2002). Nós verificamos que o primer utilizado neste estudo era específico para as duas isoformas da Stat3 e descartamos a possibilidade de que esta subexpressão gênica tenha ocorrido em uma isoforma específica. Handel-Fernandez et al. (2009), também encontraram uma diferença entre a expressão do gene e da proteína Stat3 em linfócitos de ratos induzidos para desenvolver adenocarcinoma mamário. Estes autores encontraram baixa expressão proteica da Stat3 nos ratos portadores dos tumores após quatro semanas, no entanto, não observaram diferença nos níveis de transcritos do STAT3 em relação ao grupo controle após o mesmo período e justificam que esta diferença ocorreu devido a uma maior atividade de proteossomas nas células T dos ratos portadores de tumores.

No presente estudo, nós sugerimos que esta diferença entre a expressão gênica e imuno-histoquímica da Stat3 pode ter sido ocasionado por uma superexpressão de proteínas inibidoras da via incluindo proteínas SOCS e PIAS ou por uma superexpressão de miRNAs que ocasionavam uma diminuição da expressão gênica. Cheng et al. (2015) relataram que a superexpressão de miR-124 suprimiu significativamente a expressão da Stat3, bem como dos seus genes-alvo em células de carcinoma de esôfago *in vitro* e em tumores enxertados *in vivo*. Yang et al. (2013), reportaram que expressão de pStat3, Bcl-2, Mcl-1, ciclina D1 e MMP2 foram reduzidas em carcinoma hepatocelular que apresentavam superexpressão de miR-26a. Em adição, Koukos et al. (2013) avaliaram os níveis de miR-124 e de pStat3 em biópsias de pacientes pediátricos com colite ulcerativa ativa e inativa e observaram que os níveis de miR-124 estavam significativamente diminuídos e os níveis de RNAm de *Stat3* e pStat3 significativamente aumentadas em pacientes pediátricos com a forma ativa da doença. Ainda segundo estes autores, os miRs com o maior efeito sobre a ativação *Stat3* são miR-124, let-7, miR-125, miR-26 e miR-101.

Nós observamos que a imunomarcação da Stat3 nos TOQ e AB foi predominantemente citoplasmática sendo a marcação nuclear observada menos frequentemente. Baseado em estudos prévios os quais relatam que a importa o nuclear da Stat3   fundamental para a sua função como um fator de transcri o e controle de genes específicos (Schust et al., 2006; Rezende et al., 2009; Cimica et al., 2011; Reich, 2013), nós sugerimos que nos tumores odontogênicos estudados a Stat3 estava exibindo baixa atividade transcricional já que a imunomarcação foi predominantemente citoplasmática e a expressão do gene *Stat3* estava subexpresso.

Outros autores têm buscado avaliar a distribui o da marcação celular da Stat3 e correlacionar este achado com grau de displasia (Cury et al., 2007), agressividade e

prognóstico tumoral (Ryu et al., 2010; Berclaz et al., 2001). Cury et al. (2007) observaram expressão nuclear da Stat3 em lesões de queilite actínica com displasia moderada e severa, e marcação citoplasmática nas lesões com displasia leve. Ryu et al. (2010) demonstraram que os pacientes que apresentavam alta expressão nuclear da pStat3 apresentavam tempo de sobrevida mais curto em relação aos pacientes com baixa expressão nuclear da pStat3. No entanto, Berclaz et al. (2001) em uma análise imuno-histoquímica com 62 amostras de câncer de mama não observaram correlação entre os níveis de Stat3 nuclear e agressividade tumoral e sobrevida do paciente.

No presente estudo, apesar de não ter sido encontrado diferença estatística na expressão de RNAm entre TOQ e AB, foi observado uma maior expressão imuno-histoquímica da Stat3 no AB. Este achado sugere que Stat3 pode influenciar no comportamento mais agressivo dos ABs em relação aos TOQs. Outros estudos também têm buscado avaliar diferença entre marcadores de prognóstico tumoral entre TOQ e AB (Zhang et al., 2009; Chaisuparat et al, 2013; Gurgel et al., 2014). Zhang et al. (2009) realizaram imuno-histoquímica e RT-PCR para detectar expressão da proteína e os níveis de mRNA das metaloproteinases de matrix-2 (MMP-2) em TOQs, ABs e carcinomas ameloblásticos e constataram que a expressão imuno-histoquímica e dos níveis de mRNA das MMP-2 foi significativamente maior em AB e carcinoma ameloblástico em comparação aos TOQs. Chaisuparat et al. (2013) ao avaliar por imuno-histoquímica a sinalização Akt/mTOR em 30 cistos dentígeros, 30 TOQs e 30 ABs, observaram que os ABs apresentaram uma maior expressão da p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) p-RPS6 em comparação aos TOQs sendo a menor expressão encontrada nos cistos dentígeros. Gurgel et al. (2014) não observaram diferença estatística na expressão relativa dos genes envolvidos na via de sinalização Sonic hedgehog (SHH) entre TOQs e ABs.

Diversos estudos utilizando distintos marcadores moleculares têm buscado avaliar diferenças entre o comportamento biológico dos TOQs esporádicos e associados a SCBCN (Hakim et al., 2011; Leonardi et al., 2013; Gurgel et al., 2014). Nós observamos uma significativa maior expressão do gene *Stat3* nos TOQs esporádicos em relação aos associados a SCBCN. Corroborando com nosso estudo, Gurgel et al. (2014) mostraram uma superexpressão de outros genes, tais como, *SMO*, *PTCH1*, *CCND1*, e *BCL2* em TOQs recorrentes e atribuíram que a maior expressão destes genes nos TOQs recorrentes pode ser devido a um comportamento agressivo e uma maior atividade proliferativa das células tumorais neste tipo de TOQ. No entanto, Leonardi et al. (2013) relataram uma significativa menor expressão imuno-histoquímica de β -catenina e survivina nos TOQ esporádicos em relação aos TOQs síndrômicos sugerindo que estas proteínas estão relacionadas com recorrência e proliferação dos TOQs. Por outro lado, Hakim et al. (2011) não observaram diferença estatística na sinalização *Wnt-1* e *Wnt10A* entre TOQs esporádicos e síndrômicos.

Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística na imunomarcagem da *Stat3* entre ABs sólidos e unicísticos, foi observado que os ABs sólidos apresentaram uma maior imunoreatividade para *Stat3* em relação aos ABs unicísticos. Apesar de estudos prévios não terem avaliado a expressão da *Stat3* em ABs, alguns dos seus genes-alvo vem sendo avaliados incluindo survivina e *bcl-2* (González-González et al., 2015), *p53* (Sharifi-Sistani et al., 2011), ciclina D1 (Kumar et al., 2011) e *MMP-2* (Zhang et al., 2010). Alguns autores têm observado uma maior expressão destes marcadores em ameloblastoma sólidos em relação aos unicísticos (González-González et al., 2015; Zhang et al., 2010), enquanto outros, corroborando com o nosso estudo, não tem observado diferença estatística entre estes dois tipos histológicos (Kumar et al., 2011; Sharifi-Sistani et al., 2011).

Nós observamos imunomarcção da Stat3 em células semelhantes ao retículo estrelado e em áreas de metaplasia escamosa nos ABs, bem como, nas camadas intermediária e superficial dos TOQs sugerindo uma possível participação da Stat3 na morfogênese e diferenciação das células epiteliais neoplásicas desses tumores. Segundo Wu et al. (2003), Stat3 ativada participa do processo de diferenciação do epitélio escamoso estratificado através da regulação da expressão gênica da citoqueratina 13 (CK13) e estudos prévios demonstram que a CK13 é observada principalmente nas células semelhantes ao retículo estrelado do órgão dentário e áreas de metaplasia escamosa nos ABs (Criveline et al., 2003), bem como nas camadas intermediária e superficial do epitélio do revestimento cístico dos TOQs sugerindo uma completa diferenciação do componente epitelial do TOQ (Santos et al., 2009).

A imunomarcção para Stat3 foi observada nos compartimentos mais proliferativos dos TOQs e ABs. Nos TOQs, imunoreatividade esteve presente principalmente na camada suprabasal do revestimento epitelial da parede cística fibrosa, enquanto que nos ABs esta imunomarcção foi evidente principalmente nas células mais periféricas das ilhas epiteliais do parênquima tumoral. Outros estudos também têm observado marcação para Stat3 principalmente em áreas tumorais mais invasivas e com alto índice de proliferação (Lee et al., 2012; Chang et al., 2013, Mano et al., 2013).

No presente estudo, foi evidenciado que os TOQs com presença de inflamação apresentaram uma significativa maior imunomarcção da Stat3. Desta forma, é possível que a inflamação tenha influenciado a imunomarcção da Stat3 nos TOQs. Outros estudos também têm associado expressão da Stat3 com inflamação e carcinogênese (He e Karin, 2011; Yu et al., 2014; Kao et al., 2015). He e Karin (2011) relatam que a inflamação crônica pode promover o crescimento e progressão de carcinoma de carcinoma

hepatocelular por manter NF- κ B ativado nos hepatócitos, os quais produzem citocinas e quimiocinas, tais como, IL-6 que recrutam e ativam outras células inflamatórias, mantém um microambiente inflamatório e ativam Stat3. Yu et al. (2014) relatam que aumentos graduais na produção de citocinas devido a uma inflamação prolongada promove uma ativação persistente da Stat3 favorecendo a proliferação celular e crescimento tumoral. Em adição, Kao et al. (2015) relataram que a ativação da Stat3 pela IL-6 agrava a inflamação e carcinogênese em doenças do fígado.

Tem sido demonstrado que a Stat3 desempenha um papel fundamental no processo de transição epitélio-mesênquima por regular fatores de transcrição relacionados com este processo incluindo Snail, Zeb e Twist (Tania et al., 2014; Chen et al., 2015; de Jong et al., 2014). No presente estudo observamos eventualmente fibroblastos imunomarcados. Chang et al. (2013) relataram que a alta expressão de fibroblatos em carcinomas mamários foi relacionada com uma maior expressão de Stat3. Para Liu e Lin (2011) esta relação pode ser explicada pela produção de IL-6 pelos fibroblastos, uma citocina potente na ativação da Stat3. Segundo Hendrayani et al. (2014), Stat3 desempenha um papel importante na ativação de fibroblastos estromais de carcinoma de mama demonstrando que a Stat3 desempenha um grande papel na carcinogênese, não só em células do parênquima tumoral, mas também em fibroblastos do estroma e coordenação recíproca entre as células cancerígenas e as células mesenquimais promove o crescimento e disseminação tumoral.

8. CONCLUSÕES

- 1 - TOQs e ABs mostraram uma baixa expressão do gene *Stat3*;
- 2 - Não foi observada diferença na expressão do gene *Stat3* entre TOQs e ABs, no entanto ABs apresentaram uma maior imunomarcação da *Stat3* em comparação aos TOQs;
- 3 - TOQs esporádicos apresentaram maior expressão gênica de *Stat3* em relação aos síndrômicos;
- 4 - Imunomarcação da *Stat3* foi predominantemente citoplasmática nos TOQs e ABs;
- 5 - Presença de inflamação parece ter influenciado numa maior imunomarcação da *Stat3* nos TOQs.

REFERÊNCIAS

1. AGGARWAL BB, KUNNUMAKKARA AB, HARIKUMAR KB, GUPTA SR, THARAKAN ST, KOCA C, DEY S, SUNG B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann NY Acad Sci.* 2009 Aug;1171:59-76.
2. AKIRA S, NISHIO Y, INOUE M, WANG XJ, WEI S, MATSUSAKA T, YOSHIDA K, SUDO T, NARUTO M, KISHIMOTO T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994; 77: 63-71.
3. ANDREASEN S, THERKILDSEN MH, GRAUSLUND M, FRIIS-HANSEN L, WESSEL I, HOMØE P. Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *APMIS.* 2015 Jun 8.
4. ARAÚJO VC, FURUSE C, CURY PR, ALTEMANI A, DE ARAÚJO NS. STAT3 expression in salivary gland tumours. *Oral Oncol.* 2008; 5:439-45.
5. AROTIBA, G.T. et al. Ameloblastoma in Nigerian children and adolescents: a review of 79 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 63, n. 6, p.747-51, 2005.
6. BARNES L, EVERSON JW, REICHART P, SINDRANSKY D (EDS). World Health Organization Of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
7. BARRÉ B, VIGNERON A, PERKINS N, RONINSON IB, GAMELIN E, COQUERET O. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med.* 2007;13; 4-11.

8. BERCLAZ G, ALTERMATT HJ, ROHRBACH V, SIRAGUSA A, DREHER E, SMITH PD. EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer. *Int J Oncol.* 2001 Dec;19(6):1155-60.
9. BHARADWAJ U, KASEMBELI MM, ECKOLS TK, KOLOSOV M, LANG P, CHRISTENSEN K, EDWARDS DP, TWEARDY DJ. Monoclonal Antibodies Specific for STAT3 β Reveal Its Contribution to Constitutive STAT3 Phosphorylation in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2014 Sep 29;6(4):2012-34.
10. BOLOGNA-MOLINA R1, MOSQUEDA-TAYLOR A, MOLINA-FRECHERO N. Differential expression of glypican-1 in ameloblastoma variants. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015 Feb;23(2):153-60.
11. BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, JOVE R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000; 21:2474-88.
12. BROMBERG JF1, WRZESZCZYNSKA MH, DEVGAN G, ZHAO Y, PESTELL RG, ALBANESE C, DARNELL JE JR. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999 Aug 6;98(3):295-303.
13. BROMBERG, J., AND J. E. DARNELL, JR.. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000, 19: 2468–2473.
14. CALDENHOVEN, E.; VAN DIJK, T.B.; SOLARI, R.; ARMSTRONG, J.; RAAIJMAKERS, J.A.; LAMMERS, J.W.; KOENDERMAN, L.; DE GROOT, R.P. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 13221–13227.
15. CATLETT-FALCONE R, LANDOWSKI TH, OSHIRO MM, TURKSON J, LEVITZKI A, SAVINO R, CILIBERTO G, MOSCINSKI L, FERNÁNDEZ-LUNA JL, NUÑEZ G, DALTON WS, JOVE R. Constitutive activation of Stat3

- signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):105-15.
16. CHAISUPARAT R, YODSANGA S, MONTANER S, JHAM BC. Activation of the Akt/mTOR pathway in dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Sep;116(3):336-42.
 17. CHANG Q, BOURNAZOU E, SANSONE P, BERISHAJ M, GAO SP, DALY L, WELS J, THEILEN T, GRANITTO S, ZHANG X, COTARI J, ALPAUGH ML, DE STANCHINA E, MANOVA K, LI M, BONAFE M, CECCARELLI C, TAFFURELLI M, SANTINI D, ALTAN-BONNET G, KAPLAN R, NORTON L, NISHIMOTO N, HUSZAR D, LYDEN D, BROMBERG J. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2013 Jul;15(7):848-62.
 18. CHEN KF, TAI WT, CHU PY, SHIAU CW, CHEN YL, LI YS, HUNG MH, CHEN LJ, CHEN PL, SU JC, LIN PY, YU HC. STAT3 mediates regorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 23.
 19. CHEN W, GAO Q, HAN S, PAN F, FAN W. The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. *Tumour Biol*. 2015 Feb;36(2):973-81.
 20. CHEN X, VINKEMEIER U, ZHAO Y, JERUZALMI D, DARNELL JE JR, KURIYAN J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 1998 May 29;93(5):827-39.
 21. CHENG Y, LI Y, NIAN Y, LIU D, DAI F, ZHANG J. STAT3 is involved in miR-124-mediated suppressive effects on esophageal cancer cells. *BMC Cancer*. 2015 Apr 19;15(1):306.

22. CHIRAPATHOMSAKUL, D.; SASTRAVAHA, P.; JANSISYANONT, P. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, n. 101, p. 5-9, 2006.
23. CHUNG CD, LIAO J, LIU B, RAO X, JAY P, BERTA P, SHUAI K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 1997 Dec 5;278(5344):1803-5.
24. CHUNG J, UCHIDA E, GRAMMER TC, BLENIS J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1997 Nov;17(11):6508-16.
25. CIMICA V, CHEN HC, IYER JK, REICH NC. Dynamics of the STAT3 transcription factor: nuclear import dependent on Ran and importin- β 1. *PLoS One*. 2011;6(5):e20188.
26. COPELAND NG, GILBERT DJ, SCHINDLER C, ZHONG Z, WEN Z, DARNELL JE JR, MUI AL, MIYAJIMA A, QUELLE FW, IHLE JN, ET AL. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*. 1995 Sep 1;29(1):225-8.
27. COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
28. CRIVELINI MM, DE ARAÚJO VC, DE SOUSA SO, DE ARAÚJO NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis*. 2003 Jan;9(1):1-6.
29. CURY PR, FURUSE C, DE ARAÚJO NS, DE ARAÚJO VC. Signal transducer and activator of transcription-3 expression and activation is dysregulated in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2007 Aug;34(8):606-11.
30. DA ROSA MR1, FALCÃO AS, FUZII HT, DA SILVA KATAOKA MS, RIBEIRO AL, BOCCARDO E, DE SIQUEIRA AS, JAEGER RG, DE JESUS VIANA

- PINHEIRO J, DE MELO ALVES JÚNIOR S. EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. *Tumour Biol.* 2014 Nov;35(11):11107-20.
31. DARNELL JE JR. STATs and gene regulation. *Science.* 1997; 12; 1630-5.
 32. DE JONG PR, MO JH, HARRIS AR, LEE J, RAZ E. STAT3: An Anti-Invasive Factor in Colorectal Cancer? *Cancers (Basel).* 2014 Jul 3;6(3):1394-407.
 33. DENG J, CUI J, JIANG N, ZHANG R, ZHANG L, HAO X, LIANG H. STAT3 regulation the expression of VEGF-D in HGC-27 gastric cancer cell. *Am J Transl Res.* 2014 Nov 22;6(6):756-67. eCollection 2014.
 34. DENG J, LIANG H, ZHANG R, SUN D, PAN Y, LIU Y, ZHANG L, HAO X. STAT3 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2013 Oct;34(5):2791-800.
 35. DEVARAJAN E, HUANG S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases. *Curr Mol Med.* 2009 Jun;9(5):626-33.
 36. DINIZ MG, GOMES CC, GUIMARÃES BV, CASTRO WH, LACERDA JC, CARDOSO SV, DE FARIA PR, DIAS FL, EISENBERG AL, LOYOLA AM, GOMEZ RS. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015 Feb 18.
 37. DOS SANTOS JN, OLIVEIRA GQ, GURGEL CA, DE SOUZA RO, SALES CB, DE AGUIAR PIRES VALENÇA NETO A, RAMOS EA. Altered expression of cytokeratins in primary, recurrent and syndrome keratocystic odontogenic tumors. *J Mol Histol.* 2009 Aug;40(4):269-75.
 38. DROESCHER M, BEGITT A, MARG A, ZACHARIAS M, VINKEMEIER U. Cytokine-induced paracrystals prolong the activity of signal transducers and

- activators of transcription (STAT) and provide a model for the regulation of protein solubility by small ubiquitin-like modifier (SUMO). *J Biol Chem.* 2011 May 27;286(21):18731-46.
39. EVANS DG, LADUSANS EJ, RIMMER S, BURNELL LD, THAKKER N, FARNDON PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet.* 1993 Jun;30(6):460-4.
 40. FRANK DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.* 2007; 2:199-210.
 41. FUKADA T, OHTANI T, YOSHIDA Y, SHIROGANE T, NISHIDA K, NAKAJIMA K, HIBI M, HIRANO T. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6670-7.
 42. GADBAIL AR, MANKAR GADBAIL MP, HANDE A, CHAUDHARY MS, GONDIVKAR SM, KORDE S, GAWANDE MN, PATIL S, TEKADE S, SHARMA A. Tumor angiogenesis: Role in locally aggressive biological behavior of ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Head Neck.* 2012; 20.
 43. GEST C, MIRSHAHI P, LI H, PRITCHARD LL, JOIMEL U, BLOT E, CHIDIAC J, POLETTO B, VANNIER JP, VARIN R, MIRSHAHI M, CAZIN L, PUJADE-LAURINE E, SORIA J, SORIA. Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-IR as therapeutic targets. *Cancer Lett.* 2012; 28:207-17.
 44. GIANOTTI TF, CASTAÑO G, GEMMA C, BURGUEÑO AL, ROSSELLI MS, PIROLA CJ, SOOKOIAN S. Mitochondrial DNA copy number is modulated by genetic variation in the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Metabolism.* 2011 Aug;60(8):1142-9.

45. GOMES CC, DUARTE AP, DINIZ MG, GOMEZ RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010 Sep;39(8):585-91.
46. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ R, MOLINA-FRECHERO N, DAMIAN-MATSUMURA P, SALAZAR-RODRIGUEZ S, BOLOGNA-MOLINA R. Immunohistochemical expression of Survivin and its relationship with cell apoptosis and proliferation in ameloblastomas. *Dis Markers.* 2015;2015:301781.
47. GREENHALGH CJ1, HILTON DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol.* 2001 Sep;70(3):348-56.
48. GRIVENNIKOV SI, KARIN M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 1:11-9.
49. GRONER B, LUCKS P, BORGHOUTS C. The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 4:341-50.
50. GÜLER N, SENÇİFT K, DEMIRKOL O. Conservative management of keratocystic odontogenic tumors of jaws. *Scientific World Journal.* 2012:680397.
51. GURGEL CA, BUIM ME, CARVALHO KC, SALES CB, REIS MG, DE SOUZA RO, DE FARO VALVERDE L, DE AZEVEDO RA, DOS SANTOS JN, SOARES FA, RAMOS EA. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2014 Sep;43(8):619-26.
52. HAKIM SG, KOSMEHL H, SIEG P, TRENKLE T, JACOBSEN HC, ATTILA BENEDEK G, RIBBAT J, DRIEMEL O. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Investig.* 2011 Jun;15(3):321-8.

53. HAN Z, WANG X, MA L, CHEN L, XIAO M, HUANG L, CAO Y, BAI J, MA D, ZHOU J, HONG Z. Inhibition of STAT3 signaling targets both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate cancer. *Oncotarget*. Aug 6.
54. HANDEL-FERNANDEZ ME, ILKOVITCH D, IRAGAVARAPU-CHARYULU V, HERBERT LM, LOPEZ DM. Decreased levels of both Stat1 and Stat3 in T lymphocytes from mice bearing mammary tumors. *Anticancer Res*. 2009 Jun;29(6):2051-8.
55. HE B, YOU L, UEMATSU K, ZANG K, XU Z, LEE AY, COSTELLO JF, MCCORMICK F, JABLONS DM. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14133-8.
56. HE G, KARIN M. NF- κ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):159-68.
57. HENDRAYANI SF, AL-KHALAF HH, ABOUSSEKHRA A. The cytokine IL-6 reactivates breast stromal fibroblasts through transcription factor STAT3-dependent up-regulation of the RNA-binding protein AUF1. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7;289(45):30962-76.
58. HERTOGE D, BLOEMENA E, AARTMAN IH, VAN-DER-WAAL I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1):76-82.
59. HEVEHAN DL, MILLER WM, PAPOUTSAKIS ET. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1627-37.

60. HONG YY, YU FY, QU JF, CHEN F, LI TJ. Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and non-syndromic odontogenic tumors. *J Dent Res.* 2014 Sep;93(9):904-10.
61. HUANG C, XIE K. Crosstalk of Sp1 and Stat3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012; (1-2): 25-35.
62. HUANG M, PAGE C, REYNOLDS RK, LIN J. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2000 Oct;79(1):67-73.
63. HUANG S. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(5): 1362-1367.
64. JARNICKI A, PUTOCZKI T, ERNST M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? *Cell Div.* 2010 May 17;5:14
65. JOHNSTON PA, GRANDIS JR. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol Interv.* 2011 Feb;11(1):18-26.
66. KANDA N, SENO H, KONDA Y, MARUSAWA H, KANAI M, NAKAJIMA T, KAWASHIMA T, NANAKIN A, SAWABU T, UENOYAMA Y, SEKIKAWA A, KAWADA M, SUZUKI K, KAYAHARA T, FUKUI H, SAWADA M, CHIBA T. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene.* 2004 Jun 17;23(28):4921-9.
67. KAO JT, FENG CL, YU CJ, TSAI SM, HSU PN, CHEN YL, WU YY. IL-6, through p-STAT3 rather than p-STAT1, activates hepatocarcinogenesis and affects survival of hepatocellular carcinoma patients: a cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2015.

68. KIM DJ, CHAN KS, SANO S, DIGIOVANNI J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2007; 46(8):725-31.
69. KISHIMOTO T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:1–21.
70. KISSELEVA T, BHATTACHARYA S, BRAUNSTEIN J, SCHINDLER CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene.* 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
71. KOLAR, Z. et al. Immunohistochemical analysis of the biological potential of Odontogenic Keratocyst. *J Oral Pathol Med*, v. 35, p. 75-80, 2006.
72. KORTYLEWSKI M, YU H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 228-33.
73. KOTAJA N, AITTOMÄKI S, SILVENNOINEN O, PALVIMO JJ, JÄNNE OA. ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 2000 Dec;14(12):1986-2000.
74. KOUKOS G, POLYTARCHOU C, KAPLAN JL, MORLEY-FLETCHER A, GRAS-MIRALLES B, KOKKOTOU E, BARIL-DORE M, POTHOUKAKIS C, WINTER HS, ILIOPOULOS D. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2013 Oct;145(4):842-52.e2.
75. KUMAR H, VANDANA R, KUMAR G. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011 Sep;15(3):283-7

76. LEAMAN DW, LEUNG S, LI X, STARK GR. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J.* 1996 Dec;10(14):1578-88.
77. LEE CK, RAZ R, GIMENO R, GERTNER R, WISTINGHAUSEN B, TAKESHITA K, DEPINHO RA, LEVY DE. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity.* 2002 Jul;17(1):63-72.
78. LEE SW, AHN YY, KIM YS, KANG SB, NAM SW, LEE DS, JEONG HY, KIM JM. The Immunohistochemical Expression of STAT3, Bcl-xL, and MMP-2 Proteins in Colon Adenoma and Adenocarcinoma. *Gut Liver.* 2012 Jan;6(1):45-51.
79. LEONARDI R, MATTHEWS JB, LORETO C, MUSUMECI G, CAMPISI G, LO MUZIO L, DOS SANTOS JN, PASTORINO L, BUFO P, PANNONE G. Beta-catenin and survivin expression in keratocystic odontogenic tumor (KCOT). A comparative immunohistochemical study in primary, recurrent and nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-associated lesions. *Histol Histopathol.* 2013 Sep;28(9):1175-84.
80. LI W, SAUD SM, YOUNG MR, COLBURN NH, HUA B. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro. *Mol Cell Biochem.* 2015 Apr 26.
81. LI HD, HUANG C, HUANG KJ, WU WD, JIANG T, CAO J, FENG ZZ, QIU ZJ. STAT3 knockdown reduces pancreatic cancer cell invasiveness and matrix metalloproteinase-7 expression in nude mice. *PLoS One.* 2011;6(10):e25941
82. LIAO D, LIU Z, WRASIDLO WJ, LUO Y, NGUYEN G, CHEN T, XIANG R, REISFELD RA. Targeted therapeutic remodeling of the tumor microenvironment improves an HER-2 DNA vaccine and prevents recurrence in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* 2011 Sep 1;71(17):5688-96.

83. LIAO XH, WANG N, LIU LY, ZHENG L, XING WJ, ZHAO DW, SUN XG, HU P, DONG J, ZHANG TC. MRTF-A and STAT3 synergistically promote breast cancer cell migration. *Cell Signal*. 2014 Nov;26(11):2370-80.
84. LIU X, GUO W, WU S, WANG L, WANG J, DAI B, KIM ES, HEYMACH JV, WANG M, GIRARD L, MINNA J, ROTH JA, SWISHER SG, FANG B. Antitumor activity of a novel STAT3 inhibitor and redox modulator in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2012 May 15;83(10):1456-64.
85. LIU Y, LIN J. Blocking the IL-6-STAT3 signaling pathway: potential liver cancer therapy. *Future Oncol*. 2011 Feb;7(2):161-4.
86. MANO Y, AISHIMA S, FUJITA N, TANAKA Y, KUBO Y, MOTOMURA T, TAKETOMI A, SHIRABE K, MAEHARA Y, ODA Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*. 2013;80(3):146-54.
87. MARITANO, D.; SUGRUE, M.L.; TINININI, S.; DEWILDE, S.; STROBL, B.; FU, X.; MURRAY-TAIT, V.; CHIARLE, R.; POLI, V. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat. Immunol*. 2004, 5, 401–409.
88. MEHTA D, RAVAL N, PATADIYA H, TARSARIYA V. Gorlin-goltz syndrome. *Ann Med Health Sci Res*. 2014 Mar;4(2):279-82.
89. MEIER JA, LARNER AC. Toward a new STATE: the role of STATs in mitochondrial function. *Semin Immunol*. 2014 Feb;26(1):20-8.
90. MELLO LA, GURGEL CA, RAMOS EA, DE SOUZA RO, SCHLAEPFER-SALES CB, DE AZEVEDO RA, DOS SANTOS JN. Keratocystic odontogenic tumour: an experience in the Northeast of Brazil. *Srp Arh Celok Lek*. 2011;139(5-6):291-7.

91. MIN H, WEI-HONG Z. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009 Oct;35(5):918-25.
92. NIU G, WRIGHT KL, HUANG M, SONG L, HAURA E, TURKSON J, ZHANG S, WANG T, SINIBALDI D, COPPOLA D, HELLER R, ELLIS LM, KARRAS J, BROMBERG J, PARDOLL D, JOVE R, YU H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002 Mar 27;21(13):2000-8.
93. PAWAR S, STAROSVETSKY E, ORVIS GD, BEHRINGER RR, BAGCHI IC, BAGCHI MK. STAT3 regulates uterine epithelial remodeling and epithelial-stromal crosstalk during implantation. *Mol Endocrinol.* 2013 Dec;27(12):1996-2012.
94. PENSA S, WATSON CJ, POLI V. Stat3 and the inflammation/acute phase response in involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009 Jun;14(2):121-9.
95. PEREIRA NB, DO CARMO AC, DINIZ MG, GOMEZ RS, GOMES DA, GOMES CC. Nuclear localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ameloblastomas. *Oncotarget.* 2015 Apr 30;6(12):9679-85.
96. PERRY E, TSRUYA R, LEVITSKY P, POMP O, TALLER M, WEISBERG S, PARRIS W, KULKARNI S, MALOVANI H, PAWSON T, SHPUNGIN S, NIR U. TMF/ARA160 is a BC-box-containing protein that mediates the degradation of Stat3. *Oncogene.* 2004 Nov 25;23(55):8908-19.
97. PEYSER ND, GRANDIS JR. Critical analysis of the potential for targeting STAT3 in human malignancy. *Onco Targets Ther.* 2013 Jul 30;6:999-1010.
98. PHILIPSEN, H.P. Keratocyst odontogenic tumour. In: WHO Classification of tumours. Head and Neck tumours, IARC press, 430p., Lyon, 2005.

99. QI QR, YANG ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J Biol Chem.* 2014 May 26;5(2):231-9.
100. QIAN Y, CHAI S, LIANG Z, WANG Y, ZHOU Y, XU X, ZHANG C, ZHANG M, SI J, HUANG F, HUANG Z, HONG W, WANG K. KIF5B-RET fusion kinase promotes cell growth by multilevel activation of STAT3 in lung cancer. *Mol Cancer.* 2014 Jul 21;13:176.
101. QIU Z1, HUANG C, SUN J, QIU W, ZHANG J, LI H, JIANG T, HUANG K, CAO J. RNA interference mediated signal transducers and activators of transcription 3 gene silencing inhibits invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 2007 Jul;98(7):1099-106.
102. REICH NC. STATs get their move on. *JAKSTAT.* 2013 Oct 1;2(4):e27080.
103. REZENDE LF, VIEIRA AS, NEGRO A, LANGONE F, BOSCHERO AC. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis. *Cytokine.* 2009 Apr;46(1):65-71.
104. RYU K, CHOY E, YANG C, SUSAKI M, HORNICEK FJ, MANKIN H, DUAN Z. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) pathway in osteosarcoma cells and overexpression of phosphorylated-Stat3 correlates with poor prognosis. *Orthop Res.* 2010 Jul;28(7):971-8.
105. SANO S, TAKAHAMA Y, SUGAWARA T, KOSAKA H, ITAMI S, YOSHIKAWA K, MIYAZAKI J, VAN EWIK W, TAKEDA J. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity.* 2001 Aug;15(2):261-73.
106. SANTILLÁN-BENÍTEZ JG, MENDIETA-ZERÓN H, GÓMEZ-OLIVÁN LM, ORDÓÑEZ QUIROZ A, TORRES-JUÁREZ JJ, GONZÁLEZ-BAÑALES JM.

- JAK2, STAT3 and SOCS3 gene expression in women with and without breast cancer. *Gene*. 2014 Aug 15;547(1):70-6.
107. SCHAEFER, T.S., SANDERS, L.K., PARK, O.K., NATHANS, D. Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta. 1997 *Mol. Cell. Biol.* 17, 5307–5316.
 108. SCHUST J, SPERL B, HOLLIS A, MAYER TU, BERG T. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol.* 2006 Nov;13(11):1235-42.
 109. SHAO, H.; QUINTERO, A.J.; TWEARDY, D.J. Identification and characterization of cis elements in the STAT3 gene regulating STAT3 alpha and STAT3 beta messenger RNA splicing. *Blood* 2001, 98, 3853–3856.
 110. SHARIFI-SISTANI N, ZARTAB H, BABAKOOHI S, SAGHRAVANI N, JAMSHIDI S, ESMAILI H, MOHTASHAM N, ZAMANZADEH M, ABBASZADEH-BIDOKHTY H. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Craniofac Surg.* 2011 Sep;22(5):1652-6.
 111. SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behavior. *Oral Oncology*, n. 38, p. 219–226, 2002.
 112. SHIROGANE T, FUKADA T, MULLER JM, SHIMA DT, HIBI M, HIRANO T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 1999 Dec;11(6):709-19.
 113. SIVEEN KS, SIKKA S, SURANA R, DAI X, ZHANG J, KUMAR AP, TAN BK, SETHI G, BISHAYEE A. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1845(2):136-54.

114. SOLUK TEKKEŞİN M, MUTLU S, OLGAÇ V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg.* 2012;28(1):49-55.
115. STOELINGA, P. J. W. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. *International Journal of Oral Maxillofacial. Surgery*, v. 3, p. 14–25, 2001.
116. SUBRAMANIAM A1, SHANMUGAM MK, PERUMAL E, LI F, NACHIYAPPAN A, DAI X, SWAMY SN, AHN KS, KUMAR AP, TAN BK, HUI KM, SETHI G. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *BiochimBiophysActa.* 2013 Jan; 1835(1):46-60. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.10.002. Epub 2012 Oct 26.
117. SUIQING C1, MIN Z, LIRONG C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol.* 2005 May;32(5):354-60.
118. SUN M, LIU C, NADIMINTY N, LOU W, ZHU Y, YANG J, EVANS CP, ZHOU Q, GAO AC. Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion. *Prostate.* 2012; 1: 82-9.
119. T. HIRANO, K. ISHIHARA, M. HIBI. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors, *Oncogene* 19 (2000) 2548–2556.
120. TAKEDA K, NOGUCHI K, SHI W, TANAKA T, MATSUMOTO M, YOSHIDA N, KISHIMOTO T, AKIRA S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 15;94(8):3801-4.

121. TANIA M, KHAN MA, FU J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumour Biol.* 2014 Aug;35(8):7335-42.
122. TU B, DU L, FAN QM, TANG Z, TANG TT. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2012 Dec 1;325(1):80-8
123. WAGNER KU, SCHMIDT JW. The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer. *J Carcinog.* 2011;10:32.
124. WEGRZYN J, POTLA R, CHWAE YJ, SEPURI NB, ZHANG Q, KOECK T, DERECKA M, SZCZEPANEK K, SZELAG M, GORNICKA A, MOH A, MOGHADDAS S, CHEN Q, BOBBILI S, CICHY J, DULAK J, BAKER DP, WOLFMAN A, STUEHR D, HASSAN MO, FU XY, AVADHANI N, DRAKE JI, FAWCETT P, LESNEFSKY EJ, LARNER AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science.* 2009 Feb 6;323(5915):793-7.
125. WU R, SUN S, STEINBERG BM. Requirement of STAT3 activation for differentiation of mucosal stratified squamous epithelium. *Mol Med.* 2003 Mar-Apr;9(3-4):77-84
126. XUAN X, LI S, LOU X, ZHENG X, LI Y, WANG F, GAO Y, ZHANG H, HE H, ZENG Q. Stat3 promotes invasion of esophageal squamous cell carcinoma through up-regulation of MMP2. *Mol Biol Rep.* 2015 May;42(5):907-15
127. YADAV A, KUMAR B, DATTA J, TEKNOS TN, KUMAR P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the jak-stat3-snail signaling pathway. *Mol Cancer Res.* 2011; 12:1658-67.
128. YANG X, LIANG L, ZHANG XF, JIA HL, QIN Y, ZHU XC, GAO XM, QIAO P, ZHENG Y, SHENG YY, WEI JW, ZHOU HJ, REN N, YE QH, DONG QZ, QIN

- LX. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology*. 2013 Jul;58(1):158-70.
129. YOSHIMURA A, NAKA T, KUBO M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):454-65.
130. YU H, JOVE R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(2):97-105.
131. YU X, HE L, CAO P, YU Q. Eriocalyxin B Inhibits STAT3 Signaling by Covalently Targeting STAT3 and Blocking Phosphorylation and Activation of STAT3. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0128406.
132. YU H, LEE H, HERRMANN A, BUETTNER R, JOVE R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(11):736-
133. YUAN ZL, GUAN YJ, CHATTERJEE D, CHIN YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 2005 Jan 14;307(5707):269-73.
134. ZHANG HH, KUANG S, WANG Y, SUN XX, GU Y, HU LH, YU Q. Bigelovin inhibits STAT3 signaling by inactivating JAK2 and induces apoptosis in human cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Apr;36(4):507-16.
135. ZHANG B, ZHANG J, HUANG HZ, XU ZY, XIE HL. Expression and role of metalloproteinase-2 and endogenous tissue regulator in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):219-22.
136. ZHANG B, ZHANG J, XU ZY, XIE HL. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Cancer*. 2009 Dec 8;9:427.

137. ZHANG HF, LAI R. STAT3 in Cancer-Friend or Foe? *Cancers (Basel)*. 2014 Jul 3;6(3):1408-40.
138. ZHANG Q, ZHANG C, HE J, GUO Q, HU D, YANG X, WANG J, KANG Y, SHE R, WANG Z, LI D, HUANG G, MA Z, MAO W, ZHOU X, XIAO C, SUN X, MA J. STAT3 inhibitor stattic enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2015 Mar;36(3):2135-42.
139. ZHU Y, XU Y, CHEN D, ZHANG C, RUI W, ZHAO J, ZHU Q, WU Y, SHEN Z, WANG W, NING G, WANG X. Expression of STAT3 and IGF2 in adrenocortical carcinoma and its relationship with angiogenesis. *Clin Transl Oncol*. 2014 Jul;16(7):644-9.

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

