



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE



LIA PONTES ARRUDA PORTO

**EXPRESSÃO PROTEICA DIFERENCIAL DE
REGULADORES DE E-CADERINA EM TUMOR
ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO**

Salvador
2014

LIA PONTES ARRUDA PORTO

**EXPRESSÃO PROTEICA DIFERENCIAL DE
REGULADORES DE E-CADERINA EM TUMOR
ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal da Bahia como
requisito para a obtenção do grau de Mestre em
Odontologia e Saúde com área de concentração em
Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino
Xavier

Salvador
2014

Ficha Catalográfica elaborada pela BUS – Biblioteca Universitária de Saúde da UFBA

P853 Porto, Lia Pontes Arruda
Expressão proteica diferencial de reguladores de E-caderina em tumor odontogênico queratocístico / Lia Pontes Arruda Porto. _ Salvador, 2014.
99 f. : il.

Orientadora: Profª Drª Flávia Caló de Aquino Xavier.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, 2014.

1. Tumores odontogênicos. 2. Transição epitelial-mesenchimal. 3. Adesão celular. 4. Caderinas. 5. Imuno-histoquímica. I. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. II. Xavier, Flávia Caló de Aquino. III. Título.

CDU 616.314-006



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. LIA PONTES ARRUDA PORTO

“EXPRESSÃO PROTEICA DIFERENCIAL DE REGULADORES DE
E-CADERINA EM TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO”

BANCA EXAMINADORA:

Flávia Caló de Aquino Xavier

Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier (Orientadora)

Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Jean Nunes dos Santos

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)

Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Katiúcia Batista Silva Paiva

Profa. Dra. Katiúcia Batista Silva Paiva (Examinador Externo)

Professora do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Dedico este trabalho ao meu amado marido Artur pelo amor
imensurável que recebo todos os dias e por sempre ter
acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a **Deus** pela presença constante em minha vida. Ele é Senhor de meus atos e orientador de meus caminhos e sem a Sua ajuda nunca teria chegado até aqui.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia**, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

À **Capex** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio e investimento na minha qualificação profissional.

À minha grande orientadora **Profa. Dra. Flávia Caló**, pela sabedoria, dedicação, paciência, palavras de apoio e confiança no meu trabalho. Uma professora exemplo para mim. Tenho muito orgulho de ter sido sua primeira orientada de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Jean Nunes**, pela colaboração, disposição e trabalho incansável por esta pesquisa. Seu amor e empolgação pela Patologia são admiráveis.

À **Profa. Dra. Águida Henriques**, pelos ensinamentos e ajuda essenciais nos momentos em que minha orientadora estava de licença maternidade. Você foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

À **coordenação** da Pós-graduação, em especial à **Profa. Dra. Luciana Ramalho**, pela confiança em mim depositada.

À **Profa. Dra. Andreia Figueiredo**, pela enorme ajuda com a análise dos resultados e estatística.

À **Profa. Dra. Clarissa Gurgel**, pelo tratamento sempre carinhoso e pelo apoio a este trabalho.

À **Profa. Katiúcia Batista Silva Paiva**, pelo grande e indispensável apoio com os anticorpos utilizados na pesquisa.

Às amigas e bolsistas de iniciação científica **Fernanda Borba, Lorena Aguiar e Rebeca Barros**, pela ajuda fundamental na realização das reações. Sem vocês não teria conseguido.

Aos colegas de mestrado **Ana Cristina Sobreira, Anderson Maciel, Anderson Carvalho, Daniel Rodrigues, José Augusto Tuy, Ernesto Neto, Inêssa Barbosa, Katia Gally, Livia Vitória, Patricia Keller, Mércia Sacramento, Manuela Mello, Paula Paes, Poliana Santos, Taíse Santos, Thais Amorim, Virgínia Uzêda e Wolf Maia**, por compartilhar com vocês momentos únicos de aprendizagem e amizade dos quais nunca esquecerei.

À amiga **Maisa Cardozo**, por ter dividido comigo responsabilidades no início do curso quando você nem sequer me conhecia. Obrigada pelo constante apoio.

À amiga **Rebeca Vasconcelos**, pelas boas risadas nos momentos de alegria e pela ajuda em momentos de dificuldade e responsabilidade.

Ao **Srº Edilson Amancio** e à **Srª Miriam Moraes**, técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica da UFBA, pela disponibilidade e cuidado nas confecções das minhas lâminas.

E agora à minha maravilhosa família...

Aos meus pais **Luiz Arruda e Dina Pontes**, pelo eterno incentivo e exemplo de vida.

Ao meu marido **Artur**, pelo amor incondicional. Seu incentivo me fez chegar até aqui. Te amei ontem, te amo hoje, te amarei amanhã e sempre.

À minha **vovó Livramento**, que apesar de distante fisicamente, continua sempre muito presente no meu coração.

Às minhas irmãs **Luana e Luiza**, pelas alegrias compartilhadas.

À minha amiga e eterna babá **Gorete**, que só tem bondade no coração e que sempre acreditou em mim.

Muito obrigada a todos por colaborarem direta ou indiretamente com esta etapa enriquecedora e gratificante da minha vida. Sem vocês não teria conseguido!

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante”

Charles Chaplin

PORTO, Lia Pontes Arruda. Expressão proteica diferencial de reguladores de e-caderina em tumor odontogênico queratocístico. 99f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) representa o processo em que as células epiteliais perdem suas características e adquirem propriedades de células mesenquimais típicas. A dissociação das células tumorais devido à alteração na adesão célula-célula representa um dos princípios chave da invasão tumoral e da TEM. O tumor odontogênico queratocístico (TOQ) tem como características principais o seu comportamento clínico agressivo e altas taxas de recorrência. O conhecimento das características moleculares da TEM no TOQ pode fornecer marcadores úteis que auxiliem no prognóstico e na condução terapêutica individualizada desse tumor odontogênico. O presente estudo analisou a imunoexpressão das proteínas E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina, por estarem envolvidas no processo da TEM, em casos de TOQ em comparação com cistos radiculares (CRs) e folículo dentais (FDs) a fim de fornecer melhores perspectivas na compreensão do comportamento agressivo desses tumores. Foram utilizados 32 casos de TOQ, 15 CRs e 08 FDs para a técnica imunoistoquímica. A análise do perfil de imunoexpressão nos TOQs demonstrou expressão preservada de E-caderina na maioria dos casos, sendo que a N-caderina demonstrou um ganho de expressão em epitélio tumoral em relação ao estroma, o que esteve correlacionado com a expressão positiva de Slug em epitélio, e este por sua vez com a expressão positiva de Snail. No estroma dos TOQs, a N-caderina correlacionou-se positivamente com Slug, e a Vimentina com o Snail no epitélio. Ao comparar os três grupos estudados, a imunoexpressão das proteínas foi influenciada de forma marcante pela inflamação. As expressões aumentadas de N-caderina no epitélio e no estroma, do Slug no epitélio e da Vimentina no estroma estiveram associadas com a localização em mandíbula. A grande maioria dos casos que apresentaram localização posterior (quer isoladamente ou em conjunto com a anterior) apresentou expressão preservada de E-caderina. Estas proteínas provavelmente desempenham papéis diferenciados na mediação da invasividade local em TOQs. Apesar da expressão da E-caderina estar preservada na maioria dos TOQs, há indícios de ocorrência da TEM nesses tumores. A alta intensidade de marcação do Slug nos TOQs sugere que esta proteína é provavelmente o fator de transcrição principal envolvido na indução de TEM nos TOQs.

Palavras-chave: tumores odontogênicos, transição epitelial-mesenquimal, adesão celular, E-caderina, imunoistoquímica.

PORTO, Lia Pontes Arruda. Differential protein expression of E-cadherin regulators in odontogenic keratocystic tumor. 99pp. 2014. Master Dissertation – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the process where cells lose their epithelial features and acquire properties of typical mesenchymal cells. The dissociation of tumor cells due to changes in cell-cell adhesion is one of the key principles of tumor invasion and EMT. The keratocyst odontogenic tumor (KOT) has as main features its aggressive clinical behavior and high recurrence rates. Knowledge of the molecular features of EMT in KOT can provide useful markers to aid in the prognosis and individualized therapeutic management of this odontogenic tumor. The present study examined the immunoreactivity of proteins E-cadherin, N-cadherin, Snail, Slug and vimentin, as they are involved in the process of EMT, in cases of KOT compared with radicular cysts (RCs) and dental follicles (DFs) to provide better perspectives in understanding the aggressive behavior of these tumors. Thirty-two cases of KOTs, 15 RCs and 08 DFs were used for immunohistochemistry. The analysis of immunoreactivity profile in KOTs showed preserved expression of E-cadherin in most cases, and N-cadherin showed a gain of expression in tumor epithelium relative to stroma which has been positively correlated with the expression of Slug in epithelium, and this in turn with positive expression of Snail. In the stroma of KOTs, N-cadherin correlated positively with Slug and vimentin, and this with Snail in the epithelium. When comparing the three groups, the immunoreactivity of the proteins was markedly influenced by inflammation. Increased expression of N-cadherin in the epithelium and stroma, Slug in the epithelium and vimentin in the stroma were associated with the location in the jaw. The majority of patients who had tumors in posterior location (either alone or in combination with the anterior) showed preserved expression of E-cadherin. These proteins probably play different roles in mediating local invasiveness in KOTs. Despite the expression of E-cadherin being preserved in most KOTs, there is evidence of the occurrence of EMT in these tumors. The high intensity staining of Slug in KOTs suggests that this protein is probably the main transcription factor involved in induction of MET in KOTs.

Keywords: odontogenic tumors, epithelial-mesenchymal transition, cell adhesion, E-cadherin, immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Imunoexpressão de E-caderina e N-caderina em Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), Cisto Radicular (CR) e Folículo Dental (FD).	41
Figura 02	Imunoexpressão de Snail, Slug e Vimentina em Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), Cisto Radicular (CR) e Folículo Dental (FD).	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01	Descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunistoquímica.	35
Quadro 02	Categorização da variável “Extensão” da imunexpressão de cada anticorpo com suas referências específicas.	36
Quadro 03	Compartimentos teciduais analisados para as variáveis “extensão”, “intensidade” e “padrão” a depender do anticorpo utilizado.	37
Tabela 01	Caracterização da imunexpressão do anticorpo E-caderina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.	43
Tabela 2.1	Caracterização da imunexpressão do anticorpo N-caderina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.	46
Tabela 2.2	Associação entre a extensão da imunomarcção do anticorpo N-caderina no epitélio e no estroma do grupo TOQ.	47
Tabela 3.1	Caracterização da imunexpressão do anticorpo Snail no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.	51
Tabela 3.2	Associação entre a extensão da imunomarcção do anticorpo Snail no epitélio e no estroma do grupo TOQ.	52
Tabela 4.1	Caracterização da imunexpressão do anticorpo Slug no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.	55
Tabela 4.2	Associação entre a extensão da imunomarcção do anticorpo Slug no epitélio e no estroma do grupo TOQ.	56
Tabela 5	Caracterização da imunexpressão do anticorpo Vimentina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.	59
Tabela 6	Dados clínicos dos casos do grupo TOQ.	60
Tabela 7.1	Associação da imunexpressão dos anticorpos E-caderina e N-caderina de acordo com a localização da lesão e a região da arcada dentária acometida.	62
Tabela 7.2	Associação da imunexpressão dos anticorpos Snail, Slug e Vimentina de acordo com a localização da lesão e a região da arcada dentária acometida.	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Apud	Citado por
α -SMA	α -actina de músculo liso
Ca^{2+}	Cálcio
CEB	Carcinoma epidermóide de boca
CR	Cisto radicular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
et al.	E colaboradores
FD	Folículo dental
FSP1	Proteína 1 específica de fibroblasto
Min	Minutos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PTCH	Patched
SHH	Via Sonic Hedgehog
SCNBC	Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TME	Transição mesenquimal-epitelial
TOQ	Tumor odontogênico queratocístico
UFBA	Universidade Federal da Bahia
ZO-1	Zonula Occludens-1
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO (TOQ).....	16
2.1.1 Definição.....	16
2.1.2 Classificação da Organização Mundial da Saúde.....	16
2.1.3 Características clínicas e epidemiológicas.....	17
2.1.4 Características histopatológicas.....	17
2.1.5 Comportamento biológico tumoral.....	18
2.2 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL.....	20
2.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL NOS TOQs.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	31
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	31
4.3 DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	32
4.4 ANÁLISE PROTÉICA.....	32
4.4.1 Processamento preliminar.....	32
4.4.2 Reações de imunoistoquímica.....	33
4.4.3 Análise da imunomarcção.....	36
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	39

5.2 IMUNOEXPRESSÃO PROTEICA DIFERENCIAL.....	40
5.2.1 E-caderina	40
5.2.1.1 Tumores odontogênicos queratocísticos.....	40
5.2.1.2 Cistos radiculares.....	40
5.2.1.3 Folículos dentais.....	42
5.2.1.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos.....	42
5.2.2 N-caderina	43
5.2.2.1 Tumores odontogênicos queratocísticos.....	43
5.2.2.2 Cistos radiculares.....	44
5.2.2.3 Folículos dentais.....	45
5.2.2.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos.....	45
5.2.3 Snail	47
5.2.3.1 Tumores odontogênicos queratocísticos.....	47
5.2.3.2 Cistos radiculares.....	48
5.2.3.3 Folículos dentais.....	48
5.2.3.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos.....	50
5.2.4 Slug	52
5.2.4.1 Tumores odontogênicos queratocísticos.....	52
5.2.4.2 Cistos radiculares.....	53
5.2.4.3 Folículos dentais.....	53
5.2.4.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos.....	54
5.2.5 Vimentina	56
5.2.5.1 Tumores odontogênicos queratocísticos.....	56
5.2.5.2 Cistos radiculares.....	57
5.2.5.3 Folículos dentais.....	57
5.2.5.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos.....	58
5.3 DADOS CLÍNICOS NOS TOQs E IMUNOEXPRESSÃO PROTEICA....	59

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	63
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	95
ANEXO.....	99

1. INTRODUÇÃO

O tumor odontogênico queratocístico (TOQ), anteriormente conhecido como queratocisto odontogênico, é uma neoplasia cística benigna originada de remanescentes epiteliais da odontogênese (GOMES; GOMEZ, 2007; HABIBI et al., 2007). Sua atual nomenclatura surgiu em 2005, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu seu comportamento clínico distinto, em virtude de seu padrão infiltrativo agressivo e alta taxa de recorrência local, e o reclassificou como neoplasia odontogênica benigna (PHILIPSEN, 2005).

O evento denominado de transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo complexo pelo qual as células epiteliais perdem sua polaridade e reorganizam seu citoesqueleto, adquirindo um fenótipo mesenquimal e migração aumentada (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005). Fatores relacionados aos componentes epiteliais e mesenquimais participam na regulação do crescimento de lesões císticas odontogênicas e tumores (PINHEIRO et al., 2004).

As evidências da participação da TEM na progressão de tumores odontogênicos são limitadas, existindo poucos estudos que discutam sua participação, portanto, é fundamental investigar nesses tumores a expressão de proteínas reguladoras da TEM relacionadas à via de adesão da E-caderina, como Snail e Slug, bem como a expressão de marcadores mesenquimais relacionados a este processo, tais como Vimentina e N-caderina, conforme já estudado por alguns autores (FLORESCU et al., 2012; HAKIM et al., 2011; KUSAFUKA et al., 2011; MELLO et al., 2013; SIAR; NG, 2014).

Sendo assim, sabendo-se que marcadores tumorais são produzidos pelo organismo em resposta a um tumor ou pelo próprio tecido tumoral (VICENTE et al., 2010), a compreensão da biologia deve ir além do evento de proliferação celular, a fim de revelar os aspectos complexos que influenciam o comportamento tumoral. Contudo, até o presente momento, não existem trabalhos que explorem a progressão tumoral através da TEM com ênfase na adesão celular em TOQs. Esta promissora abordagem poderá auxiliar em respostas mais refinadas do comportamento biológico desses tumores.

Uma vez que a alteração da expressão de algumas proteínas parece estar relacionada com o mecanismo de crescimento, com o potencial de invasão e agressividade do TOQ, o presente trabalho visa originalmente correlacionar os achados de expressão de E-caderina e N-caderina com outras moléculas reguladoras (Snail, Slug e Vimentina) que participam do processo de TEM, ora como reguladores positivos, ora como reguladores negativos, com o intuito de esclarecer os reais mecanismos de crescimento do TOQ, podendo, assim, estabelecer associações com dados clinicopatológicos, a fim de auxiliar na determinação precoce de possíveis recorrências.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO (TOQ)

2.1.1 Definição

Desde sua primeira descrição (PHILIPSEN, 1956), o TOQ tem sido profundamente estudado devido ao seu comportamento clínico agressivo com altos índices de recorrência (BRANNON; COLONEL, 1976; BLANAS et al., 2000), características histopatológicas distintas (BRANNON, 1977), mecanismo de crescimento singular (BROWNE, 1975) e alterações genéticas (BARRETO et al., 2000).

O TOQ é definido como um tumor de origem odontogênica intra-ósseo, benigno, de aspecto cístico, uni ou multilocular, com um epitélio estratificado paraqueratinizado característico (PHILIPSEN, 2005). É um tumor odontogênico de desenvolvimento relativamente comum que surge de remanescentes da lâmina dentária ou da extensão das células basais da interposição do epitélio oral. Para alguns autores, mutações no DNA podem também ser incluídas como fatores etiológicos, o que é suportado por sua manifestação eventual associado à síndrome e em casos de transformação maligna das células do TOQ (AGARAM et al., 2004).

2.1.2 Classificação da Organização Mundial da Saúde

O comportamento distinto do TOQ, anteriormente denominado de queratocisto odontogênico, foi estabelecido primeiramente devido ao padrão infiltrativo agressivo e alta taxa de recorrência local, o que resultou, em 2005, em sua reclassificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em tumor odontogênico benigno, sendo adotado a sua atual nomenclatura para melhor transmitir sua natureza neoplásica. A antiga variante ortoqueratinizada do queratocisto odontogênico não foi reconhecida como parte do espectro do tumor odontogênico queratocístico, sendo classificada como cisto odontogênico de desenvolvimento (PHILIPSEN, 2005).

2.1.3 Características clínicas e epidemiológicas

Com base na recente reclassificação da OMS, alguns estudos retrospectivos têm relatado que o TOQ é o tumor odontogênico mais comum (AVELAR et al., 2008; AZEVEDO et al., 2012; GAITÁN-CEPEDA et al., 2010; LUO; LI, 2009) ou o segundo mais comum, precedido por ameloblastomas (JING et al, 2007; TAWFIK; ZYADA, 2010), com prevalência variando entre 19,5% e 38,9% (AVELAR et al., 2008; AZEVEDO et al., 2012; GAITÁN-CEPEDA et al., 2010; JING et al, 2007; LUO; LI, 2009; TAWFIK; ZYADA, 2010).

A lesão ocorre em uma ampla faixa etária, sendo mais prevalente entre a segunda e terceira décadas de vida e demonstra uma predileção pelo sexo masculino (BOFFANO; RUGA; GALLESIO, 2010; BRANNON; COLONEL, 1976; MYOUNG et al., 2001; THOMPSON; GOLDBLUM, 2006; TITINCHI; NORTJE, 2012; ZECHA et al., 2010). A mandíbula é mais comumente acometida que a maxila (AVELAR et al., 2008; AZEVEDO et al., 2012; JING et al, 2007; LUO; LI, 2009; TITINCHI; NORTJE, 2012), com cerca de metade das lesões originando-se no ângulo da mandíbula (PHILIPSEN, 2005). Geralmente, o TOQ é uma lesão solitária, exceto quando a lesão está associada com a Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular (SCNBC), conhecida por Síndrome Gorlin-Goltz, especialmente em pacientes jovens (TITINCHI; NORTJE, 2012; ZECHA et al., 2010). As lesões maiores podem estar associadas à dor, tumefação ou drenagem. Não é incomum para o TOQ estar associado com edema e outros sintomas, como dor, perfuração da cortical, secreção purulenta e mobilidade dentária. Entretanto, alguns tumores extremamente grandes podem ser assintomáticos (AZEVEDO et al., 2012).

2.1.4 Características histopatológicas

O TOQ é formado por epitélio estratificado paraqueratinizado e delimitado externamente pela cápsula de tecido conjuntivo. Seu componente epitelial tem cinco a oito camadas de células e pode apresentar espessamento ou atrofia. A camada basal é bem definida, com células colunares ou cuboidais frequentemente dispostas em paliçada, com núcleos distantes da membrana basal, evento este denominado inversão de polaridade. As camadas paraceratóticas frequentemente têm uma superfície corrugada. A interface epitélio-tecido conjuntivo é plana, a menos que

uma metaplasia se desenvolva por processos inflamatórios na cápsula. As células da camada basal podem estar hiper Cromáticas, sem demonstrar cristas epiteliais. Uma separação entre o epitélio e o tecido conjuntivo fibroso subjacente pode ocorrer com frequência, bem como a presença de queratina na luz cística (PHILIPSEN, 2005; PRESS, 2008; THOMPSON; GOLDBLUM, 2006).

Figuras mitóticas são encontradas frequentemente na camada suprabasal do TOQ (PHILIPSEN, 2005). Algumas células das camadas epiteliais podem também apresentar características de displasia epitelial, mas transformação maligna para carcinoma de células escamosas é rara (FALAKI et al., 2009; PHILIPSEN, 2005). Contudo, o TOQ é uma lesão potencialmente agressiva. Os pacientes devem ser cuidadosamente acompanhados após o tratamento devido à presença comum de cistos satélites e a tendência de multiplicidade (PHILIPSEN, 2005).

2.1.5 Comportamento biológico tumoral

O diagnóstico de TOQ por meio de biópsia incisional prévio à remoção cirúrgica é necessário para distinguí-lo de outros cistos odontogênicos devido ao seu alto índice de recorrência, que varia de 13% a 58% (GONZÁLEZ-ALVA et al., 2008; MORGAN; BURTON; QIAN, 2005; MYOUNG et al., 2001; TITINCHI; NORTJE, 2012; ZHAO; WEI; WANG, 2002).

Várias hipóteses têm sido apresentadas para explicar as altas taxas de recorrência nos TOQs, tais como remoção incompleta da parede cística, crescimento de uma nova lesão a partir de cistos satélites deixados após a cirurgia, desenvolvimento de uma recorrência “verdadeira” numa região adjacente (WOOLGAR; RIPPIN; BROWNE, 1987), consequência do tipo de tratamento cirúrgico ou um reflexo da natureza neoplásica do TOQ (GONZÁLEZ-ALVA et al., 2008; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2010).

Apesar de diversos estudos abordarem diferentes aspectos clinicopatológicos na tentativa de justificar o comportamento biológico distinto dos TOQ, estudos genéticos, epigenéticos e moleculares têm alcançado importantes avanços quanto à fisiopatologia desses tumores (EL MURTADI et al., 1996; KIMI et al., 2001; KOLÁR

et al., 2006; LI, BROWNE; MATTHEWS, 1995; LO MUZIO et al., 1999; SARAÇOGLU et al. 2005; SLOOTWEG, 1995).

Mutações no gene PTCH levando à desregulação na via do SHH¹, que fica superexpressa e conseqüentemente leva a um aumento da proliferação celular (MADRAS; LAPOINTE, 2008), fundamenta o conceito de que o TOQ é uma neoplasia. Porém, outros mecanismos patogénéticos que também favorecem o seu crescimento e expansão incluem o alto índice de proliferação e a superexpressão de proteínas antiapoptóticas (EL MURTADI et al., 1996; KIMI et al., 2001; KOLÁR et al., 2006; LI, BROWNE; MATTHEWS, 1995; LO MUZIO et al., 1999; SARAÇOGLU et al. 2005; SLOOTWEG, 1995). Nesse sentido, a literatura atual ainda se limita a investigações com marcadores de proliferação celular, apoptose e ciclo celular como, por exemplo, Ki-67, bax, bcl-2, p53 e MDM2 (SHARIFI-SISTANI et al., 2011; SOLUK TEKKEŞIN; MUTLU; OLGAÇ, 2012), e em caracterização do perfil de citoqueratinas fundamentais para a diferenciação e maturação dos TOQs (SANTOS et al., 2009).

De forma ampla, alterações genéticas e moleculares parecem promover o desenvolvimento e progressão de tumores em múltiplos estágios (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Conforme revisado por Kumamoto (2006), diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de elucidar o comportamento biológico dos tumores odontogénicos abrangendo distintas vias de sinalização da progressão tumoral. Contudo, até o presente momento, não existem trabalhos que explorem a agressividade tumoral através da TEM com ênfase na adesão celular em TOQs. Esta promissora abordagem poderá auxiliar em respostas mais refinadas do comportamento biológico desses tumores.

¹ A sinalização da via SHH controla as interações célula-célula e a proliferação de células na modelação de tecido de vários órgãos, incluindo os dentes. Expressão de moléculas de sinalização SHH foi detectada em vários tumores odontogénicos. Portanto, a via de sinalização de SHH desempenha um papel em interações epiteliais mesenquimais e proliferação celular durante o crescimento de tumores odontogénicos, bem como durante o desenvolvimento dos dentes (KUMAMOTO, 2006).

2.2 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

O evento denominado de transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo complexo pelo qual as células epiteliais perdem sua polaridade e reorganizam seu citoesqueleto, adquirindo um fenótipo mesenquimal e mobilidade aumentada (HUBER; KRAUT; BEUG, 2005).

A TEM pode ser subdividida em três subtipos gerais com base no contexto em que ocorrem. TEM tipo 1 envolve células epiteliais primitivas modificando-se para células mesenquimais com motilidade como parte da gastrulação e de células neuroepiteliais primitivas gerando células migratórias da crista neural. Em ambas as situações, algumas das células geradas pela TEM são reinduzidas como células epiteliais secundárias em órgãos da mesoderme e endoderme pela transição mesenquimal-epitelial (TME). A TEM tipo 2 envolve células epiteliais secundárias ou células endoteliais em transição para fibroblastos de tecido residentes. Em tecidos maduros, estes fibroblastos são induzidos em resposta à inflamação persistente. A TEM tipo 3 envolve células de carcinoma epitelial em nódulos primários em transição para células tumorais metastáticas a fim de migrar através da corrente sanguínea e, em alguns casos, formar nódulos secundários em metástases distantes por TME (ZEISBERG; NEILSON, 2009). A perda do fenótipo epitelial polarizado e aquisição de características mesenquimais fazem com que as células tumorais assumam um potencial de invasão e metástase (ZHAO et al., 2012). Portanto, além da remodelação do tecido, desenvolvimento de órgãos e cicatrização de feridas, a TEM exerce um papel essencial na progressão do câncer (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006; FAN et al., 2012; HUBER; KRAUT; BEUG, 2005; NAWSHAD et al., 2005; NGUYE et al., 2011; WANG et al., 2012).

Durante a TEM, as células epiteliais perdem a aderência célula-célula e o contato com a matriz extracelular, exibem uma morfologia fusiforme (*fibroblast-like*), o que permitem as células migrarem (MOUSTAKAS; HELDIN, 2007; RADISKY; LABARGE, 2008). Com a progressão, a TEM pode propiciar infiltração de células neoplásicas para tecidos vizinhos e também para sítios distantes (THIERY, 2002), tornando-se um interessante campo de investigação das pesquisas de câncer, especialmente nos aspectos patogênicos e terapêuticos (TANIA; KHAN; FU, 2014).

Diversos ativadores extracelulares são capazes de desencadear a TEM, com uma complexa comunicação entre as vias de sinalização que ativam e reprimem a TEM (THIERY; SLEEMAN, 2006). Dentro deste cenário, o processo da TEM está associado com a regulação negativa de marcadores epiteliais como as proteínas E-caderina, β -catenina, Citoqueratinas 8, 9 e 18, Mucina-1, Claudina-1, dentre outros; e ainda a regulação positiva de marcadores mesenquimais incluindo a N-caderina, Vimentina, fibronectina, α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína 1 específica de fibroblasto (FSP1), Colágeno tipo I e tipo IV, Zonula Occludens-1 (ZO-1), etc (FUCHS et al., 2008; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001; VALCOURT et al., 2005).

As células epiteliais bem diferenciadas possuem extensas redes juncionais que separam fisicamente a membrana plasmática em domínios apical e basolateral, promovem a adesão e facilitam a comunicação intercelular, restringindo assim a motilidade e preservando a integridade dos tecidos e células individuais para que estas funcionem como uma unidade coesa (FARQUHAR; PALADE, 1963). Os complexos juncionais dos tecidos epiteliais são representados por junções aderentes, junções de oclusão e por desmossomos (ADACHI et al., 2006). As junções aderentes estão presentes em regiões especializadas da membrana plasmática, conectadas a filamentos de actina do citoesqueleto, onde as caderinas agem como moléculas de adesão cálcio-dependentes (LECKBAND; PRAKASAM, 2006). As moléculas de adesão celular, às quais as caderinas pertencem, têm um papel fundamental tanto na junção célula-célula como na junção célula-matriz extracelular (ROSADO et al., 2013). Em adultos, interações entre as caderinas em células adjacentes mantêm a integridade estrutural de tecidos e regulam a renovação e a reorganização de estruturas teciduais. Durante o desenvolvimento, as caderinas direcionam a segregação celular e a formação de diferentes interfaces teciduais, sendo que a maioria dos defeitos e perdas de estruturas teciduais resulta da expressão alterada ou ectópica de caderina (LECKBAND; PRAKASAM, 2006). Logo, a função das caderinas não se limita à adesão mecânica entre as células, já que suas funções se estendem a múltiplos aspectos da morfogênese tecidual, tais como reconhecimento e tipificação tecidual, manutenção e formação de limites, movimento celular coordenado, indução e manutenção da estrutura e da função celular e polaridade tecidual (HALBLEIB; NELSON, 2006).

A E-caderina (gene CDH1, sinônimos Arc-1, CD324, CDHE, ECAD, LCAM, UVO) é a principal molécula da família das caderinas presente nas células epiteliais, apresenta função dupla nas células de mamíferos como molécula de adesão dependente de Ca^{2+} e como parte da complexa via de sinalização Wnt² interagindo com β - e α -catenina (KUDO et al., 2004). O domínio intracelular da E-caderina se liga à β e γ -cateninas, que por sua vez se ligam à α -catenina, que se liga a filamentos de actina no citoesqueleto celular. Sempre que a β -catenina se desloca da E-caderina, ela pode se acumular no citoplasma e se deslocar para o núcleo da célula, onde pode ativar a transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento do câncer. Quando a E-caderina é expressa normalmente, por conseguinte, não só conduz à estabilização das junções aderentes, mas também evita a acumulação citoplásmica de β -catenina (ROSADO et al., 2013).

A imunoexpressão da E-caderina varia de tumor para tumor. Mello et al. (2013) encontraram maior imunoexpressão de E-caderina em TOQs e tumores odontogênicos císticos calcificantes quando em comparação com ameloblastomas, sugerindo seu importante papel na mediação da adesão celular em tumores odontogênicos e no padrão de invasão local característico dos ameloblastomas. Nos TOQs parece ter ocorrido a manutenção na expressão dessa proteína mesmo após a transformação neoplásica.

Considera-se que a diminuição na expressão de proteínas de junções aderentes pode funcionar como indicador de malignidade e possível fator prognóstico (BOSCH et al., 2005). Especificamente, a E-caderina desempenha importante papel na carcinogênese e progressão tumoral na região de cabeça e pescoço (DE FREITAS SILVA et al. 2014; KYZAS et al., 2006). A redução da expressão da E-caderina resulta na dissociação de células de seus tumores primários, sendo pré-requisito para ativar a migração e metástase, o que tem sido evidenciado em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HOWELL; GRANDIS,

² A família de proteínas Wnt é um mediador crítico dos principais eventos célula-célula de sinalização durante a embriogênese. Sinais Wnt são extremamente pleiotrópicos em sua atividade, com conseqüências que vão desde a estimulação mitogênica à diferenciação, mudanças na polaridade e adesão celular diferencial. Elas são necessárias para a manutenção do tecido adulto, e perturbações na sua sinalização promovem tanto doenças degenerativas humanas e câncer (NUSSE, 2005).

2005; ZHAO et al., 2012). Sua diminuição de expressão em carcinomas orais ou de cabeça e pescoço também tem sido relacionada com: a ingestão de álcool (ROSADO et al., 2013); o hábito do fumo (YU; CHANG, 2013); a diferenciação do tumor, onde tumores pouco diferenciados apresentaram expressão reduzida desta proteína (HUBER et al., 2011; ROSADO et al., 2013); presença e tamanho de tumores satélites (YANG et al., 2011); metástases linfonodais (HUBER et al., 2011; ZHANG et al., 2013); altas taxas de recorrência (LIU et al., 2010; ZHAO et al., 2012); menores taxas de sobrevivência (FAN et al., 2013; LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2013; ZHAO et al., 2012); marcador de risco para o desenvolvimento de múltiplos tumores na cavidade bucal quando sua expressão é $\leq 25\%$ nas células parabasais de epitélios não tumorais distantes do tumor (GONZÁLEZ-MOLES et al., 2013). Entretanto, sua participação como um fator prognóstico independente na análise de sobrevida específica da doença ainda é debatida. Algumas pesquisas evidenciaram sua participação (FAN et al., 2013; LIU et al., 2010; PECTASIDES et al., 2014; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ZHAO et al., 2012), outras já não conseguiram esse resultado (ROSADO et al., 2013).

A N-caderina (gene CDH2, sinônimos CD325, CDHN, CDw325, NCAD) é também uma glicoproteína de adesão transmembrana (LEE et al., 2006). Ao contrário da E-caderina, a N-caderina é normalmente expressa em tecido de origem neuroectodérmica e mesodérmica e está envolvida em inúmeros processos, como adesão, diferenciação, embriogênese, migração, invasão e transdução de sinal (DERYCKE; BRACKE, 2004). A N-caderina também está expressa em células endoteliais, mas sua função na angiogênese não está totalmente elucidada (DIAMOND et al., 2008). A expressão aberrante de N-caderina tem sido associada a um pior prognóstico e uma grande tendência para a invasão loco-regional e metástase em alguns tipos de câncer (DI DOMENICO et al., 2011; DING et al., 2014; NGUYEN et al., 2011; ZHANG et al., 2013). No estudo de Zhang et al (2013), a alta expressão de N-caderina foi considerada como um fator clinicopatológico independente associado a um período menor de sobrevida. Em particular, expressão aumentada de N-caderina e concomitante baixa expressão de E-caderina são sugeridas como característica crucial da TEM no câncer, sendo este evento denominado “inversão de caderinas” (*cadherin switching*) (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Relatos recentes em carcinoma de cabeça e pescoço demonstraram essa

inversão de caderinas, estando relacionados a metástases e possivelmente à patogênese dessas lesões (NGUYEN et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Contudo, os mecanismos pelos quais o aumento da expressão de N-caderina promove um fenótipo agressivo ainda não estão completamente esclarecidos (ZHANG et al., 2013).

Outros eventos também contribuem para a complexa rede da TEM, sejam regulando positivamente ou negativamente o processo. A ativação dos chamados fatores de transcrição-TEM (Snail, Twist, Zeb e outros), pertencentes a diferentes famílias, associada à perda de expressão de E-caderina e à polaridade apico-basal são considerados desencadeadores do processo de TEM (PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; MORENO-BUENO; PORTILLO; CANO, 2008; NIETO, 2011), principalmente quando expressos em células epiteliais (NIETO; CANO, 2012). Esta definição foi estabelecida baseada em diferentes contextos tumorigênicos e não-tumorigênicos em células epiteliais (PEINADO; PORTILLO; CANO, 2004; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007). O questionamento atual é como e quando esses fatores interagem numa mesma via de sinalização. Achados na embriogênese revelam a existência de diferentes moléculas indutoras do robusto e equilibrado sistema de TEM (NIETO; CANO, 2012), a exemplo de Snail (gene SNAI1, sinônimos SLUGH2, SNA, SNAH, SNAIL1, dJ710H13.1), desencadeadora da TEM, enquanto outros indutores, como Twist ou Slug (gene SNAI2, sinônimos SLUGH1, SNAIL2, WS2D), são requisitados para a manutenção de etapas tardias da TEM (CASAS et al., 2011; OLMEDA et al., 2008; PEINADO et al., 2004; THUAULT et al., 2008; TRAN et al., 2011).

A repressão da transcrição é um dos principais mecanismos responsáveis pela diminuição da expressão da E-caderina. Como um repressor, Snail pode suprimir a transcrição da E-caderina através de ligação direta com os E-boxes presentes no promotor da E-caderina ou indução indireta da expressão de outro repressor transcricional de E-caderina (PEINADO; PORTILLO; CANO, 2004).

Os membros da superfamília Snail representam reguladores fundamentais do processo fisiológico e patológico da TEM (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005; NIETO, 2002; NIETO, 2011; THIERY et al., 2009), em especial os fatores SNAI1 e SNAI2. Estes genes são fatores de transcrição altamente conservados necessários

para a formação de mesoderme e gastrulação, e estão envolvidos em uma ampla gama de funções biológicas tais como a diferenciação celular, motilidade celular, a regulação do ciclo celular e apoptose (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005). Eles são caracterizados como fatores de transcrição em dedos de zinco (NIETO, 2002) e emergiram como importantes repressores de E-caderina e indutores de TEM (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005; COBALEDA et al., 2007; NIETO, 2002; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007; PRASAD et al., 2009). Ameloblastomas têm demonstrado uma alta imunexpressão de Snail localizado predominantemente no núcleo das células neoplásicas, no endotélio vascular estromal e fibroblastos próximos às células tumorais com positividade para o Snail (SIAR; NG, 2014).

Estudos recentes vêm suportando a existência de mecanismos moleculares distintos em relação à repressão de E-caderina mediada por Snail e Slug (MOLINA-ORTIZ et al., 2012; WANG et al., 2012). De uma forma geral, o aumento de expressão desses fatores de transcrição reprime a função da E-caderina, sendo consideradas moléculas chave da TEM, com grande relevância na progressão em neoplasias de diferentes partes (FRANZ et al., 2009; LEE et al., 2006; MAEDA et al., 2005; MIURA et al., 2009; THIERY, 2002; SAKAMOTO et al., 2012; WANG et al., 2013; ZHU et al., 2012). Carcinomas orais pobremente diferenciados e com forte capacidade invasiva estão mais propensos a ter expressão intensa de Snail e expressão deficiente de E-caderina (FRANZ et al., 2009; ZHAO et al., 2012). O aumento do nível da proteína Slug foi correlacionado com um maior tamanho do tumor, metástase, estágio clínico avançado e reduziu a sobrevida global em carcinoma de língua (WANG et al., 2012) e de cabeça e pescoço (ZHANG et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que a expressão positiva de Slug foi significativamente associada com metástases distantes, recorrência regional do tumor e com um pior prognóstico (TANG et al., 2010). Para alguns estudos, a depender do tipo de câncer, o Slug é considerado um fator prognóstico independente (TANG et al., 2010), já outros estudos não chegaram a esta mesma conclusão (WANG et al., 2012). Entretanto, não existem até agora estudos que avaliem a expressão de Snail e Slug em TOQs.

Dentro do contexto da TEM, a baixa regulação de marcadores epiteliais por si só não é suficiente para aquisição das funções mesenquimais (KANG; MASSAGUÉ, 2004; THIERY, 2002). Além da regulação negativa de proteínas epiteliais, a

progressão para o fenótipo agressivo é acompanhado de aumento da expressão de proteínas mesenquimais e da proteína do filamento intermediário Vimentina (DUPREY; PAULIN, 1995; LANG et al., 2002; ZHU et al., 2012). A Vimentina (gene VIM, sinônimos RP11-124N14.1, CTRCT30, HEL113) é um filamento intermediário do tipo III expresso em células de origem mesenquimal. A sua expressão tem sido reportada em células epiteliais de capacidade migratória envolvida nos processos de embriogênese e organogênese, cicatrização e invasão tumoral (BINDELS et al., 2006). Desta forma, tanto a N-caderina e a Vimentina são consideradas marcadores mesenquimais da TEM, e o aumento de suas expressões favorece a aquisição de características invasivas pela neoplasia e conseqüentemente um pior prognóstico (DING et al., 2014; GRAVDAL et al., 2007; LEE et al., 2006; YANG et al., 2011).

Em contraste com as células epiteliais, as células mesenquimais não estabelecem junções intercelulares estáveis. Devido à ausência de junções aderentes, as células mesenquimais não possuem uma polaridade apical-basolateral e sim uma morfologia alongada com extremidades assimétricas que facilita a mobilidade e locomoção (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006; THIERY, 2003). As extensões emitidas pelas células mesenquimais são enriquecidas com receptores da família das integrinas que interagem com a matriz extracelular (LI; GUAN; CHIEN, 2005; ZHANG et al., 2006) e também contém MMPs que digerem a membrana basal e a matriz extracelular e promovem a invasão (SEIKI, 2003). Uma relação inversa entre a expressão de E-caderina e Vimentina em ameloblastomas sólidos (FLORESCU et al., 2012) e carcinoma epidermóide de boca (CEB) (LIU et al., 2010) tem sido evidenciada, e a alta expressão de Vimentina nas células neoplásicas e no fronte invasivo do tumor neoplásico tem sido associada com recorrência local e pior prognóstico (LIU et al., 2010).

A superexpressão da proteína Snail tem sido demonstrada como indutora de TEM, durante o qual os marcadores epiteliais (E-caderina e β -catenina) foram reprimidos e os marcadores mesenquimais (Vimentina) foram regulados positivamente, fazendo com que as células epiteliais perdessem a sua polaridade e se convertessem a um fenótipo mesenquimal, estando associada à propriedades altamente invasivas e metastáticas (ZHU et al., 2012).

2.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL NOS TOQs

As células epiteliais no TOQ parecem ter um potencial proliferativo diferente de outras lesões odontogênicas. Vários estudos têm demonstrado uma atividade proliferativa aumentada nos epitélios de TOQs em comparação com outros cistos odontogênicos (KICHI et al., 2005; KIM et al., 2003; KIMI et al., 2001; LI; BROWNE; MATTHEWS, 1995; PIATELLI et al., 1998; THOSAPORN et al., 2004). Portanto, fatores relacionados com os componentes epiteliais e mesenquimais participam da regulação do crescimento de tumores odontogênicos (KICHI et al., 2005).

Por um longo período, foi considerado que a expansão dos cistos odontogênicos estava relacionada somente com a pressão osmótica exercida pelos componentes do cisto (SKAUG, 1976). Atualmente, sabe-se que o mecanismo de crescimento dos cistos odontogênicos, assim como o potencial de invasão e destruição de alguns tumores odontogênicos como o TOQ, podem ser influenciados pela secreção de MMPs, proteínas que podem ser produzidas pelas células epiteliais e mesenquimais (SILVEIRA et al., 2007). Alaeddini et al. (2009) sugeriu que para uma melhor compreensão do comportamento biológico dessas lesões, é necessário estudar os componentes da matriz extracelular para identificar diferenças na distribuição e expressão dessas proteínas entre lesões císticas indolentes e tumores mais agressivos. A alteração na expressão de proteínas específicas da matriz extracelular associado com a presença de MMPs e a ausência de inibidores de MMPs (TIMPs) podem influenciar o comportamento dessas lesões. No caso de tumores, essa situação contribui para o seu crescimento e alta agressividade (ROSENTHAL; MATRISIAN, 2006).

Em relação à participação da TEM nos TOQs, não foram encontrados estudos publicados quanto à expressão das proteínas Snail, Slug e Vimentina, sendo que alguns trabalhos avaliaram a expressão da E-caderina (HAKIM et al., 2011; KUSAFUKA et al., 2011; MELLO et al. 2013) e N-caderina (KUSAFUKA et al., 2011).

Quanto a participação das caderinas em neoplasias odontogênicas em comparação com lesões císticas, Kusafuka et al. (2011) demonstraram a expressão de E-caderina em 100% dos casos de ameloblastoma, TOQs e cistos dentígeros.

Porém, para a proteína N-caderina, um alto índice de casos de neoplasia odontogênica foi positivo para esta proteína (87,5% dos ameloblastomas e 40% dos TOQs), porém nenhum caso de cisto dentífero exibiu positividade. Dezoito TOQs esporádicos ou sindrômicos e 8 cistos dentíferos foram analisados por Hakim et al. (2011) quanto à marcação de E-caderina e β -catetina, sendo que os TOQs apresentaram um moderado a alto grau de perda de expressão da E-caderina em todas as amostras, especialmente nas lesões sindrômicas, que apresentaram uma expressão mais reduzida. Este achado corrobora que o perfil de expressão de biomarcadores de TEM é inerente a neoplasias.

Estudos sobre a participação de repressores de E-caderina em tumores odontogênicos são escassos à luz do nosso conhecimento, não existindo até o presente momento a associação com a expressão diferencial de fatores transcricionais-TEM nessas neoplasias. Neste cenário, pode-se citar apenas os resultados revelados por Feng et al. (2009) e Siar e Ng (2014). Feng et al. (2009), que apesar de não realizarem uma associação com a E-caderina, encontraram a expressão de Twist em quase 50% dos casos de ameloblastomas, estando este achado possivelmente associado a variantes mais invasivas de ameloblastoma, com participação importante de células do estroma na regulação do desenvolvimento tumoral. Este achado foi realçado pelos casos de ameloblastoma ricos em estroma apresentarem células tumorais epiteliais Twist positivas, enquanto que nos casos com escassez de estroma, as células tumorais não exibiram expressão dessa proteína. Siar e Ng (2014) Analisaram, por imunoistoquímica, 4 fatores de transcrição em 64 ameloblastomas, estando eles diferentemente expressos: Snail (94%); Slug (33%); SIP1 (28%) e Twist (41%). Este achado sugere a proeminência do Snail sobre Slug, SIP1 e Twist como o principal repressor em ameloblastomas. Além disso, a baixa expressão acentuada de Slug, SIP1 e Twist em ameloblastomas, em comparação com câncer de mama, também pode indicar que estas proteínas reguladoras provavelmente desempenham um papel limitado na indução de TEM nessa neoplasia.

Apesar dos fatores prognósticos baseados nos achados clinicopatológicos e imunoistoquímicos para determinar o potencial de recorrência do TOQ ainda não permanecerem claros, seu uso para determinar o potencial de recorrência do TOQ

após remoção cirúrgica pode se tornar importante para gerenciar com sucesso o comportamento agressivo dessa neoplasia (MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo transversal visa avaliar a TEM através da imunexpressão diferencial de biomarcadores envolvidos na regulação da E-caderina em tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs), cistos radiculares (CRs) e folículos dentais (FD) e verificar as associações entre o perfil de imunexpressão destas proteínas entre si, nos 3 grupos estudados e com as características clínicas do TOQ.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Avaliar a expressão das proteínas E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina por imunistoquímica em TOQs, CRs e FDs;
- b)** Verificar associação do perfil de expressão proteica de E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina nas lesões de TOQs, CRs e FD;
- c)** Verificar associação do perfil de expressão proteica epitelial de N-caderina, Snail, Slug e Vimentina nas lesões de TOQs com o perfil de expressão no estroma;
- d)** Verificar associação do perfil de expressão proteica de E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina nas lesões de TOQ com as características clínicas;
- e)** Verificar correlação entre a extensão da imunexpressão de E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina nos TOQs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A pesquisa foi estruturada em três etapas, sendo a primeira constituída de seleção dos casos com laudo histopatológico de TOQ e CR e coleta de FD, seguido de caracterização histopatológica, tratando-se, portanto, de um estudo transversal. A segunda etapa consistiu na coleta dos dados clínicos dos casos de TOQ a partir dos prontuários dos pacientes. A terceira etapa correspondeu ao estudo de moléculas reguladores do fenômeno de TEM a partir da imunexpressão das proteínas E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina pela técnica da imunistoquímica nas lesões de TOQ e em CRs e FDs para fins comparativos.

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram utilizados 32 casos de TOQ e 15 casos de CR incluídos em parafina e selecionados a partir dos laudos anátomo-patológicos dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFBA e de instituições afiliadas, referentes a biópsias incisionais ou excisionais. Todas as lâminas histológicas coradas por hematoxilina-eosina (HE) referentes aos casos de TOQ e CR foram previamente revistas ao microscópio óptico por dois patologistas para confirmação diagnóstica. Fragmentos cirúrgicos descalcificados foram excluídos da amostra. Os prontuários dos TOQs foram revisados para coleta de dados clínicos e desfechos clínicos através das informações nos mesmos. As informações clínicas que foram coletadas são: idade, sexo, cor, localização da lesão (maxila/mandíbula), região da arcada dentária acometida (anterior ao 1º. pré-molar/posterior ao 1º. pré-molar). Os dados de desfechos clínicos que foram resgatados são: recorrência e novas lesões. Foram utilizados ainda 8 casos de FD provenientes de cirurgias de extração de dentes inclusos, representando o tecido morfológicamente sadio, obtidos após consentimento dos pacientes e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES A e B). O presente trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA sob número 217.452 (ANEXO).

4.3 DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As lâminas coradas em HE dos casos de TOQ, CR e FD foram analisadas através de microscópio de luz para determinação das características histopatológicas presentes.

As características histológicas analisadas nos TOQs foram: tipo epitelial, espessura epitelial, disposição em paliçada da camada basal, destacamento do epitélio do conjuntivo, hiperchromatismo das células basais, polarização invertida, presença de superfície corrugada, interface epitélio-tecido conjuntivo, atipia celular, mitose, ocorrência de infiltrado inflamatório, presença de remanescentes ou ilhas epiteliais odontogênicas, queratina na luz cística, cistos satélites, displasia epitelial e metaplasia. A espessura epitelial foi analisada de acordo com o estudo de Browne (1971), verificando a quantidade de células por estratos: atrófico (menor que cinco células), normal (cinco a oito células) e acantose (maior que oito células). A inflamação foi considerada quando presente na cápsula adjacente ao epitélio tumoral.

As características histológicas analisadas nos CRs foram: tipo epitelial, espessura epitelial, espongirose, degeneração hidrópica, exocitose, células claras, calcificação no epitélio (corpúsculos de Rushton), calcificação distrófica, hemossiderina, corpos hialinos de Russell, corpos hialinos na cápsula, célula gigante multinucleada, hemácias extravasadas, cristais de colesterol e a presença de inflamação com sua consequente caracterização em aguda, mista ou crônica.

As características histológicas analisadas nos FDs foram: presença de epitélio de superfície, epitélio sulcular, epitélio reduzido do órgão do esmalte, ilhas e cordões de epitélio odontogênico, tipo de tecido conjuntivo (denso/frouxo) e presença de fibroblastos.

4.4 ANÁLISE PROTEICA

4.4.1 Processamento preliminar

Os blocos parafinados foram seccionados (3 μ m) em micrótomo e os cortes colocados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-

silano a 2%, Sigma-Aldrich, em acetona). A fim de se observar marcação específica das proteínas E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina, reações imunohistoquímica foram padronizadas em amostras parafinadas de tecido controle humano ou animal pelo método da imunoperoxidase, conforme descrito a seguir.

4.4.2 Reações de imunohistoquímica

Os procedimentos laboratoriais para realização da técnica imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Odontologia da UFBA, utilizando o método da streptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) para o anticorpo Snail (Policlonal, Abcam, ab53519); o método do polímero marcado (Envision™, Dako) para os anticorpos E-caderina (Monoclonal, Dako, M3612, Clone NCH38) e N-caderina (Policlonal, Abcam, ab12221); ou a tecnologia ADVANCE HRP (Dako) para o anticorpo Slug (Policlonal, Abcam, ab27568) e Vimentina (monoclonal, Dako, M0725, Clone V9). As padronizações de cada anticorpo encontram-se no Quadro 1.

Inicialmente, os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol e hidratados em porcentagens decrescentes de etanol, seguido de incubação em peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS por 40 minutos. Após exposição antigênica através de imersão em solução tampão Citrato 10mM pH 6,0 em steamer a 95°C durante 20 minutos, os cortes foram incubados, conforme padronização, por 10 minutos em Protein Block Serum-Free (K0909, Dako, Carpinteria, CA, USA) para bloqueio de sítios inespecíficos e posterior incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C. A diluição do anticorpo primário, o tempo de incubação e o método de detecção utilizados para cada proteína constam no Quadro 1. A incubação do sistema de detecção EnVision™ Dual Link System HRP (K406189, Dako) ocorreu por 30 minutos, e do LSAB (Dako) e ADVANCE HRP (Dako) em duas fases com duração de 30 minutos cada. A revelação da reação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (K3468, Dako Liquid DAB Plus, Dako) e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Entre essas passagens, os cortes foram lavados duas vezes com solução tampão PBS pH 7,4 acrescido de Triton 0,1%.

Os cortes foram então desidratados em cadeia de álcool ascendente por 5 min cada, nas concentrações (%) de 50, 60, 70, 80, 90, 95, absoluto (1), absoluto (2), absoluto (3) e diafinizados em dois banhos de xilol. As lâminas foram em seguida montadas em resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) para exame ao microscópio de luz.

Os procedimentos de controle envolveram a utilização de amostra com reatividade conhecidamente positiva para cada anticorpo, funcionando como controle externo positivo da reação (Quadro 1). Como controle externo negativo, foi utilizado o mesmo tecido, onde o anticorpo primário foi substituído por soro, devendo a reação ser completamente negativa.

Quadro 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunistoquímica.

Anticorpo	Tipo do Anticorpo	Animal Hospedeiro	Marca	Código	Clone	Bloqueio Interações Inespecíficas	Diluição Anticorpo Primário	Kit de Visualização	Tecido Controle Positivo
E-caderina	Monoclonal	Camundongo	Dako	M3612	NCH38	Sem bloqueio	1:50	EnVision™ Dual Link System HRP	Pele
N-caderina	Policlonal	Coelho	Abcam	ab12221	-	Solução bloqueadora	1:250	EnVision™ Dual Link System HRP	Embrião de camundongo
Snail	Policlonal	Cabra	Abcam	ab53519	-	Solução bloqueadora	1:50	LSAB	Rim de camundongo
Slug	Policlonal	Coelho	Abcam	ab27568	-	Sem bloqueio	1:100	Advance	Rim de camundongo
Vimentina	Monoclonal	Camundongo	Dako	M 0725	v9	Sem bloqueio	1:1000	Advance	Carcinoma epidermóide de boca humano

4.4.3 Análise da imunomarcção

A imunoexpressão das proteínas foi analisada semiquantitativamente e qualitativamente, de forma comparativa quanto à extensão e intensidade da imunomarcção, padrão de expressão, compartimento celular, e influência da presença de inflamação em área com imunomarcção nos TOQs, CRs e FDs.

A variável extensão da imunoexpressão foi categorizada especificamente para cada anticorpo analisado, tendo como referências artigos já publicados com os anticorpos analisados, como mostra o Quadro 2. Apenas para os folículos dentais foi definida como positiva ou negativa devido à representatividade da amostra.

Quadro 2. Categorização da variável “Extensão” da imunoexpressão de cada anticorpo com suas referências específicas.

Anticorpo	Categorização	Referência
E-caderina	0 = sem expressão 1 = <20% 2 = 20-50% 3 = >50%	MELLO et al. (2013)
N-caderina	0 = nenhuma expressão 1 = <10% 2 = 10-20% 3 = >20% 4 = >50%	KUSAFUKA et al. (2011)
Snail e Slug	0 = sem expressão 1 = <25% 2 = 25-50% 3 = >50%	SIAR; NG (2013)
Vimentina	0 = <10% 1 = >10%	MIURA et al. (2009)

As outras variáveis foram analisadas de forma similar em todos os anticorpos, como descrito a seguir:

- Intensidade – refere-se à coloração da imunomarcção; categorizada em ausente, leve, moderada e intensa;
- Padrão – refere-se ao perfil de distribuição das células imunomarcadas na lâmina analisada; categorizada em homogêneo e heterogêneo;
- Compartimento celular – refere-se à parte celular que apresentou imunoexpressão para determinado anticorpo, podendo ser no núcleo, citoplasma e/ou membrana celular;
- Inflamação – refere-se à presença de inflamação estar interferindo na expressão da proteína; categorizada em ausente, não marcante e marcante.

As variáveis extensão, intensidade e padrão da imunoexpressão foram analisadas no epitélio e/ou estroma a depender do anticorpo, como descrito no Quadro 3.

Quadro 3. Compartimento tecidual analisado para as variáveis “extensão”, “intensidade” e “padrão” a depender do anticorpo utilizado.

Variável	Compartimento tecidual analisado
Extensão	E-caderina: epitélio N-caderina, Snail, Slug e Vimentina: epitélio e estroma
Intensidade	E-caderina: epitélio N-caderina, Snail, Slug e Vimentina: epitélio e estroma
Padrão	E-caderina, Snail, Slug: epitélio Vimentina: estroma N-caderina: epitélio e estroma

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com o delineamento da pesquisa, todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística pelo programa SPSS versão 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences), utilizando intervalo de confiança de 95% e valor de $p < 0.05$. A presença de associação da expressão dos anticorpos entre os grupos (TOQ, CR e FD) e a comparação da extensão da imunomarcacão dos anticorpos N-caderina, Snail e Slug em epitélio e estroma foram avaliadas utilizando o teste Exato de Fisher. Para a correlacão entre a extensão da imunomarcacão dos anticorpos entre si nos TOQs foi utilizada a correlacão de Spearman.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Dos 32 casos de TOQs, 21 (65.6%) foram avaliados quanto à morfologia e eram representados por cavidade cística revestida por epitélio estratificado paraqueratinizado com cinco a oito camadas de células. Muitos casos apresentaram áreas de espessamento (n = 18), e seis casos áreas de atrofia. A camada basal era bem definida, composta por células epiteliais colunares e/ou cuboidais dispostas em paliçada, com núcleos hipercromáticos e com inversão de polaridade em todos os casos. Células com características de displasia epitelial foram observadas em quatro casos. Na grande maioria dos casos a camada de paraqueratina apresentava-se corrugada (n = 20). A interface epitélio-tecido conjuntivo mostrou-se plana em todos os casos e por vezes o descolamento do tecido epitelial da cápsula cística foi observado (n = 14). A queratina foi encontrada usualmente na luz cística. Com frequência foi observado infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo de suporte (n = 15). Cistos satélites (n = 8), ilhas e cordões epiteliais (n = 8) e metaplasia epitelial escamosa (n = 8) também foram observados.

Dos 10 casos de CRs avaliados, observou-se presença de cápsula cística constituída por tecido conjuntivo denso revestido por epitélio pavimentoso estratificado. Áreas de acantose eram frequentes (n = 8), juntamente como a presença de espongiose (n = 8), degeneração hidrópica (n=10) e exocitose (n = 9). Na cápsula, a presença de hemossiderina (n = 7), corpos hialinos de Russell (n = 8) e hemácias extravasadas (n = 8) foram usuais, bem como a presença de inflamação (n = 10), sendo a maioria caracterizada como mista, contendo tanto células agudas quanto crônicas e em apenas dois casos com inflamação predominantemente crônica. Em alguns casos foram observados células claras e calcificações no epitélio (corpúsculos de Rushton), além de calcificação distrófica, célula gigante multinucleada e cristais de colesterol na cápsula.

Todos os oito FDs eram de tecido conjuntivo frouxo, com fibroblastos volumosos de aspecto fusiforme, por vezes estrelado, e com ilhas e/ou cordões de epitélio odontogênico. Apenas dois casos apresentaram epitélio reduzido do órgão do esmalte e um desses continha epitélio de superfície e epitélio sulcular.

5.2 IMUNOEXPRESSÃO PROTÉICA DIFERENCIAL

5.2.1 E-caderina

5.2.1.1 Tumores odontogênicos queratocísticos

Dos 32 casos de TOQ selecionados para o estudo da imunopressão de E-caderina, dois (6.3%) não apresentaram expressão, quatro (12.5%) com escore 1, seis (18.8%) escores 2 e 20 casos (62.5%) com escore 3. A imunomarcção da E-caderina nos TOQs ocorreu na membrana plasmática. A intensidade da imunomarcção nos casos positivos para E-caderina mostrou-se leve em seis casos (18.8%), moderada em 12 casos (37.5%) e intensa também em 12 casos (37.5%). O padrão de imunomarcção foi homogêneo na maioria dos casos (78.1%). A inflamação esteve ausente na maioria dos casos (53.1%), não marcante em oito casos (25%) e marcante em sete casos (21.9%) (Figura 1, Tabela 1).

5.2.1.2 Cistos radiculares

Dos 15 casos de CR selecionados para o estudo da expressão da proteína E-caderina, dois (13.3%) não apresentaram expressão, quatro casos (26.7%) com escore 1, quatro casos (26.7%) com escore 2 e cinco casos (33.3%) com escore 3. A imunomarcção da E-caderina nos CRs também se apresentou na membrana plasmática. A intensidade da imunomarcção nos casos positivos para E-caderina mostrou-se leve em quatro casos (26.7%), moderada em sete casos (46.7%) e intensa em dois casos (13.3%). O padrão de imunomarcção foi homogêneo na maioria dos casos (60%). A inflamação esteve presente em todos os casos, apresentando-se com uma extensão não marcante em quatro casos (26.7%) e marcante em 11 casos (73.3%) (Figura 1, Tabela 1).

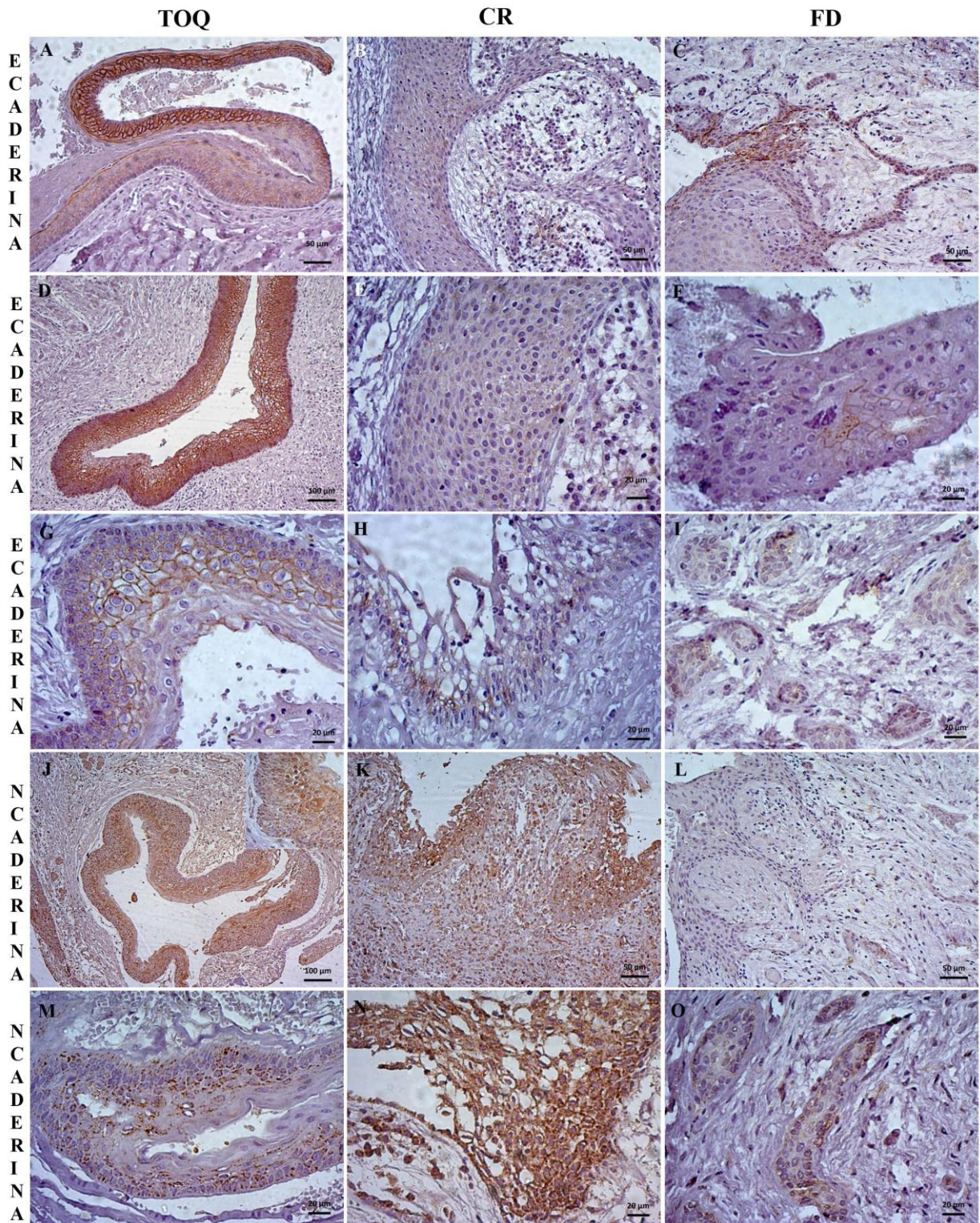


Figura 1 - Imunoexpressão de E-caderina e N-caderina em Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), Cisto Radicular (CR) e Folículo dental (FD). A E-caderina no TOQ exibe imunomarcação moderada (A) e intensa (A e D) em padrão membranoso (G) distribuída principalmente nos estratos suprabasais (A e G), ou em todos os estratos (D). No CR, a E-caderina demonstra imunomarcação leve (B e E) em um padrão membranoso (E) em todos os estratos (E), ou em suprabasal (H). No FD, a E-caderina demonstra imunomarcação focal em epitélio de revestimento (C) e em epitélio reduzido do órgão do esmalte (E). A N-caderina em epitélio de TOQ exibe imunomarcação intensa (J) e moderada (M) em um padrão membranoso, citoplasmático ou nuclear (J, detalhe) distribuída em todos os estratos (J), por vezes com aspecto granular (M). Observa-se imunomarcação em estroma (J). A N-caderina em epitélio de CR demonstra imunomarcação moderada (K) e intensa (N), com padrão membranoso/citoplasmático (N), e em células inflamatória (K). No FD, observa-se a N-caderina ausente em epitélio de revestimento (L), com leve imunomarcação membranosa/citoplasmática em epitélio odontogênico (O). A escala indica 20 µm (E, F, G, H, I, M, N e O), 50 µm (A, B, C, K e L) e 100 µm (D e J). Imunoperoxidase

5.2.1.3 Folículos dentais

Dos oito casos de FD selecionados para o estudo da expressão da proteína E-caderina, todos apresentaram imunoposição positiva, ocorrendo imunomarcção também na membrana plasmática. A imunomarcção ocorreu em restos epiteliais odontogênicos, revestimento epitelial e em área focal do epitélio reduzido do órgão do esmalte. A intensidade da imunomarcção para E-caderina mostrou-se moderada em dois casos (25%) e intensa em seis casos (75%). A inflamação esteve ausente em seis casos (75%) e com uma extensão não marcante em dois casos (25%) (Figura 1, Tabela 1).

5.2.1.4 Associação da imunoposição proteica entre os grupos

Ao compararmos a extensão, intensidade e padrão de imunoposição da E-caderina nos três grupos de lesões estudadas, não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$). Entretanto, quando observada a inflamação, verificou-se que a maioria dos TOQs não apresentou inflamação (53.1%), ao contrário dos CRs que apresentaram em sua maioria inflamação marcante (73.3%), dando um resultado estatisticamente significativo (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização da imunexpressão do anticorpo E-caderina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.

E-caderina	TOQ		CR		FD		p [#]
	n	%	n	%	n	%	
Extensão							0.291
Ausente	2	6.3	2	13.3	-	-	
<20%	4	12.5	4	26.7	-	-	
20-50%	6	18.8	4	26.7	-	-	
>50%	20	62.5	5	33.3	-	-	
Intensidade							0.144
Ausente	2	6.3	2	13.3	0	0	
Leve	6	18.8	4	26.7	0	0	
Moderada	12	37.5	7	46.7	2	25	
Intensa	12	37.5	2	13.3	6	75	
Padrão							0.295
Homogêneo	25	78.1	9	60	-	-	
Heterogêneo	7	21.9	6	40	-	-	
Inflamação							0.000*
Ausente	17	53.1	0	0	6	75	
Não marcante	8	25	4	26.7	2	25	
Marcante	7	21.9	11	73.3	0	0	

[#]Teste Exato de Fisher, p < 0.05

5.2.2 N-caderina

5.2.2.1 Tumores odontogênicos queratocísticos

Dos 32 casos de TOQ selecionados para o estudo da imunexpressão da proteína N-caderina no epitélio, dois (6.3%) não apresentaram nenhuma expressão, um caso (3.1%) com escore 1, oito casos (25%) com escore 3 e 21 casos (65.6%) com escore 4. A imunomarcção ocorreu tanto na membrana plasmática, como no citoplasma e/ou núcleo, variando bastante de caso para caso e apresentando-se com aspecto bastante granular. Na maioria dos casos (50%) a expressão aconteceu na membrana e citoplasma. A intensidade da imunomarcção no epitélio nos casos positivos para N-caderina mostrou-se leve em cinco casos (15.6%), moderada em 12 casos (37.5%) e intensa em 13 casos (40.6%) (Figura 1, Tabela 2.1).

Analisando o estroma, quatro casos (12.9%) não apresentaram expressão, 10 casos (32.3%) com escore 1, três casos (9.7%) com escore 2, oito casos (25.8%)

com escore 3 e seis casos (19.4%) com escore 4. A intensidade da imunomarcção no estroma nos casos positivos para N-caderina mostrou-se leve em oito casos (25.8%), moderada em 10 casos (32.3%) e intensa em nove casos (29%). Em todos os casos houve imunomarcção nas células inflamatórias. A inflamação esteve ausente em oito casos (26.7%), não marcante em 16 casos (53.3%) e marcante em seis casos (20%) (Figura 1, Tabela 2.1).

O padrão de marcação no epitélio foi igualmente distribuído em homogêneo e heterogêneo. Já no estroma, a maioria dos casos apresentou-se num padrão heterogêneo (67.7%) (Tabela 2.1).

5.2.2.2 Cistos radiculares

Dos 15 casos de CR selecionados para o estudo da expressão da proteína N-caderina no epitélio, todos demonstraram expressão positiva, sendo divididos em dois casos (13.3%) com escore 1 e 13 casos (86.7%) com escore 4. A imunomarcção de N-caderina nos CRs ocorreu no citoplasma isoladamente (26.7%) ou na membrana e citoplasma simultaneamente (73.3%) e com aspecto bastante granular. A intensidade da imunomarcção no epitélio para N-caderina mostrou-se leve em dois casos (13.3%), moderada em oito casos (53.3%) e intensa em cinco casos (33.3%) (Figura 1, Tabela 2.1).

Analisando o estroma, um caso (6.7%) não apresentou expressão, seis casos (40%) com escore 1, dois casos (13.3%) com escore 2, dois casos (13.3%) com escore 3 e quatro casos (26.7%) com escore 4. A intensidade da imunomarcção no estroma nos casos positivos para N-caderina mostrou-se leve em três casos (20%), moderada em três casos (20%) e intensa em oito casos (53.3%). Em todos os casos houve imunomarcção nas células inflamatórias. A inflamação esteve presente em todos os casos, mostrando-se não marcante em quatro casos (26.7%) e marcante em 11 casos (73.3%) (Figura 1, Tabela 2.1).

O padrão de imunomarcção foi heterogêneo tanto no epitélio (53.3%) como no estroma (60%) (Tabela 2.1).

5.2.2.3 Folículos dentais

Dos oito casos de FD selecionados para o estudo da expressão da proteína N-caderina no epitélio, todos demonstraram expressão positiva. A imunomarcacão ocorreu ou no citoplasma isoladamente (75%) ou na membrana e citoplasma simultaneamente (25%) e apresentando-se com aspecto bastante granular. A intensidade da imunomarcacão no epitélio para N-caderina mostrou-se leve em um caso (12.5%), moderada em dois casos (25%) e intensa em cinco casos (62.5%) (Figura 1, Tabela 2.1).

Analisando o estroma, apenas dois casos (25%) não apresentaram reacão para a N-caderina. A intensidade da imunomarcacão no estroma mostrou-se leve em três casos (50%), moderada em um caso (16.7%) e intensa em dois casos (33.3%). A inflamacão ocorreu em apenas um caso (12.5%) (Figura 1, Tabela 2.1).

5.2.2.4 Associaão da imunoexpressão proteica entre os grupos

Ao comparar tanto no epitélio como no estroma a extensão, intensidade e padrão da expressão na N-caderina nos três grupos de lesões estudadas, não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo. Já quando analisado o compartimento celular, a maioria dos TOQs (50%) e CRs (73.3%) apresentaram marcação na membrana plasmática e citoplasma ao contrário dos FDs que apresentaram marcação predominantemente no citoplasma (75%), resultando em uma diferença estatisticamente significativa (Teste Exato de Fisher, $p = 0.001$). A inflamacão também apresentou resultados diferentes, onde cada grupo mostrou maior incidência em uma categoria (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$). Nos TOQs, 53.3% dos casos apresentaram inflamacão não marcante, 73.3% dos CRs apresentaram inflamacão marcante e 87.5% dos folículos não apresentaram inflamacão (Tabela 2.1).

A análise da extensão de marcação da N-caderina também foi feita comparando-se epitélio e estroma. Nesta, houve resultado estatisticamente significativo (Teste Exato de Fisher, $p = 0.004$) (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 Caracterização da imunexpressão do anticorpo N-caderina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.

N-caderina	TOQ		CR		FD		p [#]
	n	%	n	%	n	%	
Extensão no epitélio							0.073
Ausente	2	6.3	0	0	-	-	
<10%	1	3.1	2	13.3	-	-	
10-20%	0	0	0	0	-	-	
>20%	8	25	0	0	-	-	
>50%	21	65.6	13	86.7	-	-	
Extensão no estroma							0.803
Ausente	4	12.9	1	6.7	-	-	
<10%	10	32.3	6	40	-	-	
10-20%	3	9.7	2	13.3	-	-	
>20%	8	25.8	2	13.3	-	-	
>50%	6	19.4	4	26.7	-	-	
Intensidade no epitélio							0.710
Ausente	2	6.3	0	0	0	0	
Leve	5	15.6	2	13.3	1	12.5	
Moderada	12	37.5	8	53.3	2	25	
Intensa	13	40.6	5	33.3	5	62.5	
Intensidade no estroma							0.542
Ausente	4	12.9	1	6.7	0	0	
Leve	8	25.8	3	20	3	50	
Moderada	10	32.3	3	20	1	16.7	
Intensa	9	29	8	53.3	2	33.3	
Padrão no epitélio							1.000
Homogêneo	16	50	7	46.7	-	-	
Heterogêneo	16	50	8	53.3	-	-	
Padrão no estroma							0.744
Homogêneo	10	32.3	6	40	-	-	
Heterogêneo	21	67.7	9	60	-	-	
Inflamação							0.000*
Ausente	8	26.7	0	0	7	87.5	
Não marcante	16	53.3	4	26.7	1	12.5	
Marcante	6	20	11	73.3	0	0	
Compartimento celular							0.001*
Membrana	3	10	0	0	0	0	
Citoplasma	2	6.7	4	26.7	6	75	
Membrana + citoplasma	15	50	11	73.3	2	25	
Citoplasma + núcleo	5	16.7	0	0	0	0	
Membrana + citoplasma + núcleo	5	16.7	0	0	0	0	

#Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

Tabela 2.2 Associação entre a extensão da imunomarcção do anticorpo N-caderina no epitélio e no estroma do grupo TOQ.

		Extensão N-cad (estroma)				
		TOQ				
		Ausente	<10%	10-20%	>20%	>50%
Extensão N-cad (epitélio)	Ausente	2	0	0	0	0
	<10%	0	0	1	0	0
	10-20%	0	0	0	0	0
	>20%	1	5	0	1	1
	>50%	1	5	2	7	5
Total		4	10	3	8	6
p valor [#]		0.004*				

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

5.2.3 Snail

5.2.3.1 Tumores odontogênicos queratocísticos

Dos 32 casos de TOQ selecionados para o estudo da expressão da proteína Snail no epitélio, um (3.1%) não apresentou expressão, um caso (3.1%) com escore 1, cinco casos (15.6%) com escore 2 e 25 casos (78.1%) com escore 3. A imunomarcção ocorreu em núcleo e/ou citoplasma. Na maioria dos 31 casos positivos para Snail, a expressão aconteceu apenas no núcleo (48.4%), seguido de 41.9% em núcleo e citoplasma (predomínio de imunomarcção nuclear) e 9.7% em citoplasma isoladamente. A intensidade da imunomarcção no epitélio nos casos positivos para Snail mostrou-se leve em um caso (3.1%), moderada em oito casos (25%) e intensa em 22 casos (68.8%). O padrão de marcação no epitélio apresentou-se num padrão homogêneo em 24 casos (77.4%) e heterogêneo em sete casos (22.6%) (Figura 2, Tabela 3.1).

Analisando o estroma, todos os casos apresentaram imunomarcção para esta proteína, incluindo 10 casos (33.3%) com escore 1, 10 casos (33.3%) com escore 2 e 10 casos (33.3%) com escore 3. Células endoteliais e fibroblastos também foram imunomarcados. A intensidade da imunomarcção no estroma nos casos positivos para Snail mostrou-se moderada em três casos (10%) e intensa em 27 casos (90%). Dois casos não apresentavam estroma na lâmina analisada. A

inflamação esteve ausente em quatro casos (13.3%), não marcante em 13 casos (43.3%) e marcante em 13 casos (43.3%) (Figura 2, Tabela 3.1).

5.2.3.2 Cistos radiculares

Dos 15 casos de CRs selecionados para o estudo da expressão da proteína Snail no epitélio, todos demonstraram expressão positiva, sendo divididos em um caso (6.7%) com escore 1, um caso (6.7%) com escore 2, e 13 casos (86.7%) com escore 3. A imunomarcagem ocorreu no núcleo em sete casos (46.7%), no citoplasma em um caso (6.7%) e no núcleo e citoplasma em sete casos (46.7%). A intensidade da imunomarcagem no epitélio para Snail mostrou-se leve em um caso (6.7%), moderada em seis casos (40%) e intensa em oito casos (53.3%). O padrão de marcação no epitélio apresentou-se num padrão homogêneo em 13 casos (86.7%) e heterogêneo em dois casos (13.3%) (Figura 2, Tabela 3.1).

Analisando o estroma, um caso (6.7%) apresentou escore 1, três casos (20%) com escore 2 e 11 casos (73.3%) com escore 3. A intensidade da marcação no estroma para Snail mostrou-se moderada em um caso (6.7%) e intensa em 14 casos (93.3%). A inflamação foi marcante em todos os 15 casos (100%) (Figura 2, Tabela 3.1).

5.2.3.3 Folículos dentais

Dos oito casos de FD selecionados para o estudo da expressão da proteína Snail no epitélio, todos demonstraram expressão positiva. Células endoteliais e fibroblastos também foram imunomarcados. A imunomarcagem ocorreu no núcleo em cinco casos (62.5%), no citoplasma em dois casos (25%) e no núcleo e citoplasma em um caso (12.5%). A intensidade da imunomarcagem no epitélio mostrou-se moderada em dois casos (25%) e intensa em seis casos (75%) (Figura 2, Tabela 3.1).

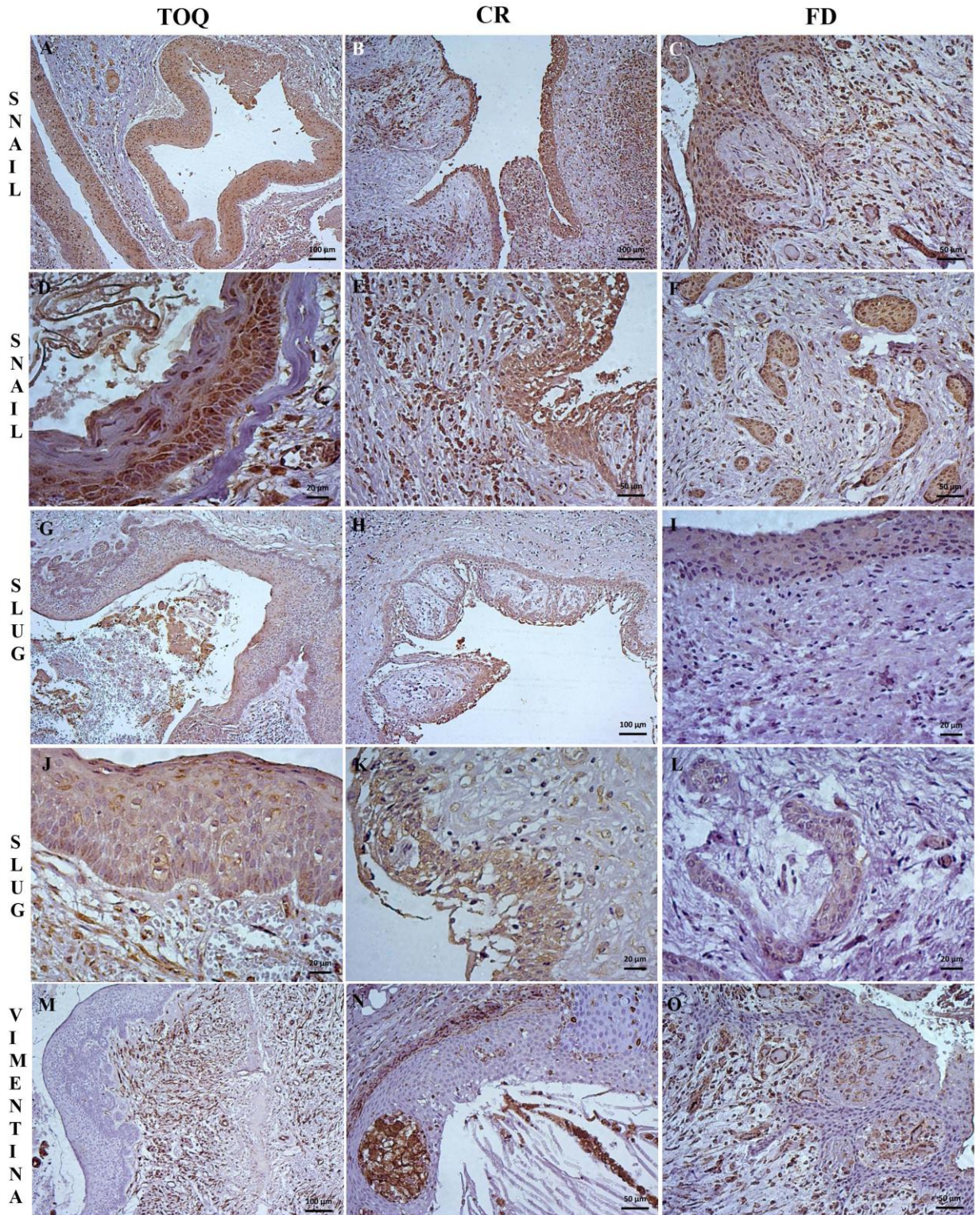


Figura 2 - Imunoexpressão de Snail, Slug e Vimentina em Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), Cisto Radicular (CR) e Folículo dental (FD). No TOQ, Snail exibe imunomarcção intensa (A e D) em padrão nuclear e citoplasmático (D) distribuída em todos os estratos epiteliais (A e D). No estroma, visualiza-se fibroblastos e células endoteliais imunomarcados. No CR, Snail também demonstra imunomarcção intensa (B e E) em padrão nuclear e citoplasmático (E) distribuída em todos os estratos epiteliais (B e E), bem como em células inflamatórias (B e E). No FD, observa-se imunomarcção de Snail em epitélio de revestimento (C) e em epitélio reduzido do órgão do esmalte (F). No epitélio de TOQ, Slug exibe imunomarcção moderada (G e J) em um padrão citoplasmático heterogêneo distribuído em todos os estratos (J). Observa-se imunomarcção em fibroblastos e células endoteliais (G e J). Em epitélio de CR, Slug demonstra imunomarcção moderada (H e K) em um padrão citoplasmático homogêneo distribuído em todos os estratos (K). No FD, observa-se leve imunomarcção citoplasmática de Slug em epitélio de revestimento (I) e em epitélio odontogênico (L). O estroma de TOQ demonstra intensa imunomarcção de Vimentina em fibroblastos (M). No CR e FD, observa-se imunomarcção de Vimentina em células dendríticas no epitélio (N, detalhe), bem como em fibroblastos e células inflamatórias (N e O). A escala indica 20 µm (D, I, J, K e L), 50 µm (C, E, F, N e O) e 100 µm (A, B, G, H e M). Imunoperoxidase

No estroma a expressão do Snail também foi positiva em todos os casos de FD. A intensidade da marcação no estroma mostrou-se intensa em todos os oito casos (100%). A inflamação esteve ausente em sete casos (87.5%) e ocorreu de forma marcante em apenas um caso (12.5%) (Tabela 3.1).

5.2.3.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos

Nenhuma das variáveis analisadas no epitélio (extensão, intensidade, padrão e compartimento celular) apresentou resultados estatisticamente significantes quando comparadas as três lesões estudadas (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$) (Tabela 3.1).

No estroma, obteve-se diferença estatisticamente significativa somente quando analisada a extensão (Teste Exato de Fisher, $p = 0.031$) e a presença de inflamação alterando a imunoexpressão do Snail (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$) (Tabela 3.1). Na análise da extensão da imunomarcação de Snail, a grande maioria dos CRs (73.3%) teve marcação em mais que 50% do tecido analisado, ao contrário dos TOQs que tiveram distribuição similar entre as categorias de inflamação (33.3% em cada). Na análise da inflamação, todos os CRs apresentaram inflamação marcante ao contrário dos FDs que apresentaram sua grande maioria (87.5%) com ausência de inflamação.

A análise da marcação do Snail também foi realizada comparando-se a extensão da marcação no epitélio e no estroma. Entretanto não houve resultado estatisticamente significativo (Teste Exato de Fisher, $p = 0.543$) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 Caracterização da imunexpressão do anticorpo Snail no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.

Snail	TOQ		CR		FD		p [#]
	n	%	n	%	n	%	
Extensão no epitélio							0.681
Ausente	1	3.1	0	0	-	-	
<25%	1	3.1	1	6.7	-	-	
25-50%	5	15.6	1	6.7	-	-	
>50%	25	78.1	13	86.7	-	-	
Extensão no estroma							0.031*
Ausente	0	0	0	0	-	-	
<25%	10	33.3	1	6.7	-	-	
25-50%	10	33.3	3	20	-	-	
>50%	10	33.3	11	73.3	-	-	
Intensidade no epitélio							0.839
Ausente	1	3.1	0	0	0	0	
Leve	1	3.1	1	6.7	0	0	
Moderada	8	25	6	40	2	25	
Intensa	22	68.8	8	53.3	6	75	
Intensidade no estroma							0.629
Ausente	0	0	0	0	0	0	
Leve	0	0	0	0	0	0	
Moderada	3	10	1	6.7	0	0	
Intensa	27	90	14	93.3	8	100	
Padrão no epitélio							0.696
Homogêneo	24	77.4	13	86.7	-	-	
Heterogêneo	7	22.6	2	13.3	-	-	
Inflamação							0.000*
Ausente	4	13.3	0	0	7	87.5	
Não marcante	13	43.3	0	0	0	0	
Marcante	13	43.3	15	100	1	12.5	
Compartimento celular							0.441
Núcleo	15	48.4	7	46.7	5	62.5	
Citoplasma	3	9.7	1	6.7	2	25	
Núcleo + citoplasma	13	41.9	7	46.7	1	12.5	

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

Tabela 3.2. Associação entre a extensão da imunomarcagem do anticorpo Snail no epitélio e no estroma do grupo TOQ.

		Extensão Snail (estroma)			
		TOQ			
		Ausente	<25%	25-50%	>50%
Extensão Snail (epitélio)	Ausente	0	1	0	0
	<25%	0	1	0	0
	25-50%	0	2	2	1
	>50%	0	6	8	9
Total		0	10	10	10
p valor [#]		0.543			

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

5.2.4 Slug

5.2.4.1 Tumores odontogênicos queratocísticos

Dos 32 casos de TOQ selecionados para o estudo da expressão da proteína Slug no epitélio, um (3.1%) não apresentou nenhuma expressão, oito casos (25%) com escore 1, oito casos (25%) com escore 2 e 15 casos (46.9%) com escore 3. A imunomarcagem ocorreu em núcleo e/ou citoplasma. Na maioria dos casos positivos para Snail, a expressão aconteceu no núcleo e citoplasma (65.6%), seguido de 21.9% em citoplasma e 12.5% em núcleo apenas. Em dois casos houve imunomarcagem na camada de queratina. A intensidade da imunomarcagem no epitélio nos casos positivos para Slug mostrou-se leve em quatro casos (12.5%), moderada em 14 casos (43.8%) e intensa em 13 casos (40.6%). O padrão de imunomarcagem no epitélio apresentou-se num padrão homogêneo em oito casos (25.8%) e heterogêneo em 23 casos (74.2%) (Figura 2, Tabela 4.1).

Analisando o estroma, um caso não foi analisado devido à ausência de estroma na lâmina. Todos os 31 casos restantes apresentaram imunomarcagem para esta proteína, incluindo três casos (9.7%) com escore 1, 11 casos (35.5%) com escore 2 e 17 casos (54.8%) com escore 3. A intensidade da marcação no estroma mostrou-se moderada em 13 casos (41.9%) e intensa em 18 casos (58.1%). A inflamação esteve ausente em seis casos (19.4%), não marcante em 18 casos (58.1%) e marcante em sete casos (22.6%) (Figura 2, Tabela 4.1).

5.2.4.2 Cistos radiculares

Dos 15 casos de CR selecionados para o estudo da imunoexpressão da proteína Slug no epitélio, todos demonstraram expressão positiva, sendo divididos em dois casos (13.3%) com escore 1, cinco casos (33.3%) com escore 2, e oito casos (53.3%) com escore 3. A imunomarcção ocorreu no citoplasma isoladamente em nove casos (60%) e no núcleo e citoplasma simultaneamente em seis casos (40%). Nenhum caso mostrou marcação exclusiva no núcleo. A intensidade da imunomarcção no epitélio para Slug mostrou-se leve em seis casos (40%), moderada em três casos (20%) e intensa em seis casos (40%). O padrão de marcação no epitélio apresentou-se num padrão homogêneo em 10 casos (66.7%) e heterogêneo em cinco casos (33.3%) (Figura 2, Tabela 4.1).

Analisando o estroma, três casos (20%) tiveram escore 1, seis casos (40%) com escore 2 e seis casos (40%) com escore 3. A intensidade da imunomarcção no estroma para Slug mostrou-se leve em três casos (20%), moderada em cinco casos (33.3%) e intensa em sete casos (46.7%). A inflamação foi não marcante em dois casos (13.3%) e marcante em 13 casos (86.7%) (Tabela 4.1).

5.2.4.3 Folículos dentais

Dos oito casos de FD selecionados para o estudo da expressão da proteína Slug no epitélio, todos demonstraram imunoexpressão positiva. A intensidade da imunomarcção no epitélio mostrou-se leve em um caso (12.5%) e intensa em sete casos (87.5%). A imunomarcção ocorreu no citoplasma em todos os oito casos (100%) (Figura 2, Tabela 4.1).

No estroma, a imunoexpressão do Slug também foi positiva em todos os casos. A intensidade da imunomarcção no estroma mostrou-se leve em três casos (37.5%), moderada em um caso (12.5%) e intensa em quatro casos (50%). A inflamação esteve ausente em cinco casos (62.5%), não marcante em dois casos (25%) e marcante em apenas um caso (12.5%) (Tabela 4.1).

5.2.4.4 Associação da imunoproteína entre os grupos

Dentre as variáveis analisadas no epitélio, os resultados estatisticamente significantes foram intensidade (Teste Exato de Fisher, $p = 0.046$), padrão (Teste Exato de Fisher, $p = 0.011$) e compartimento celular (Teste Exato de Fisher, $p = 0.001$) quando comparadas as três lesões estudadas (Tabela 4.1). A intensidade da imunomarcção dos TOQs foi predominantemente moderada ou intensa. O padrão da marcação do Slug nos TOQs foi mais heterogêneo (74.2%) ao contrário do padrão apresentado nos CRs que foi predominantemente homogêneo (66.7%). O predomínio do compartimento celular corado nos TOQs foi o núcleo e citoplasma simultaneamente, enquanto que nos CRs e FDs, a imunomarcção foi maior no citoplasma isoladamente.

No estroma, obteve-se diferença estatisticamente significativa somente quando analisada a intensidade (Teste Exato de Fisher, $p = 0.023$) e a presença de inflamação alterando a imunomarcção do Slug (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$) (Tabela 4.1). Na análise da intensidade da imunomarcção, os TOQs dividiram-se nas categorias com intensidade moderada ou intensa, ao contrário dos CRs e FDs que tiveram distribuição em todas as categorias positivas de intensidade. Na análise da inflamação, cada lesão mostrou um comportamento distinto. Os TOQs apresentaram em sua maioria inflamação não marcante (58.1%), os CRs apresentaram maior número com presença de inflamação marcante (86.7%), já os FDs apresentaram sua maioria (62.5%) com ausência de inflamação.

Tabela 4.1. Caracterização da imunexpressão do anticorpo Slug no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.

Slug	TOQ		CR		FD		p [#]
	n	%	n	%	n	%	
Extensão no epitélio							0.690
Ausente	1	3.1	0	0	-	-	
<25%	8	25	2	13.3	-	-	
25-50%	8	25	5	33.3	-	-	
>50%	15	46.9	8	53.3	-	-	
Extensão no estroma							0.515
Ausente	0	0	0	0	-	-	
<25%	3	9.7	3	20	-	-	
25-50%	11	35.5	6	40	-	-	
>50%	17	54.8	6	40	-	-	
Intensidade no epitélio							0.046*
Ausente	1	3.1	0	0	0	0	
Leve	4	12.5	6	40	1	12.5	
Moderada	14	43.8	3	20	0	0	
Intensa	13	40.6	6	40	7	87.5	
Intensidade no estroma							0.023*
Ausente	0	0	0	0	0	0	
Leve	0	0	3	20	3	37.5	
Moderada	13	41.9	5	33.3	1	12.5	
Intensa	18	58.1	7	46.7	4	50	
Padrão no epitélio							0.011*
Homogêneo	8	25.8	10	66.7	-	-	
Heterogêneo	23	74.2	5	33.3	-	-	
Inflamação							0.000*
Ausente	6	19.4	0	0	5	62.5	
Não marcante	18	58.1	2	13.3	2	25	
Marcante	7	22.6	13	86.7	1	12.5	
Compartimento celular							0.001*
Núcleo	4	12.5	0	0	0	0	
Citoplasma	7	21.9	9	60	8	100	
Núcleo + citoplasma	21	65.6	6	40	0	0	

[#]Teste Exato de Fisher, p < 0.05

Ao cruzar a extensão da marcação do Slug no epitélio e no estroma, não foi verificado nenhuma diferença estatisticamente significativa (Teste Exato de Fisher, $p = 0.153$) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Associação entre a extensão da imunomarcção do anticorpo Slug no epitélio e no estroma do grupo TOQ.

		Extensão Slug (estroma)			
		TOQ			
		Ausente	<25%	25-50%	>50%
Extensão Slug (epitélio)	Ausente	0	0	0	1
	<25%	0	1	6	1
	25-50%	0	1	1	6
	>50%	0	1	4	9
Total		0	3	11	17
p valor [#]		0.153			

[#]Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

5.2.5 Vimentina

5.2.5.1 Tumores odontogênicos queratocísticos

Dos 32 casos de TOQ selecionados para o estudo da imunoexpressão da proteína Vimentina no epitélio, todos (100%) apresentaram imunoexpressão com escore 0, sendo que em 21 casos (65.62%) não houve imunomarcção para Vimentina. A imunomarcção ocorreu em citoplasma isoladamente. Nos 11 casos onde ocorreu imunomarcção para a Vimentina, ela ocorreu sempre nas células dendríticas da camada basal e intermediária do epitélio. A intensidade da imunomarcção no epitélio mostrou-se leve em um caso (3.1%), moderada em três casos (9.4%) e intensa em sete casos (21.9%) (Figura 2, Tabela 5.1).

Analisando o estroma, cinco casos (15.6%) apresentaram imunomarcção com escore 0 e 27 casos (84.4%) com escore 1. A intensidade da imunomarcção no estroma mostrou-se ausente em um caso (3.1%), moderada em oito casos (25%) e intensa em 23 casos (71.9%). O padrão de imunomarcção no estroma apresentou-se num padrão homogêneo em 19 casos (59.4%) e heterogêneo em 13

casos (40.6%). A inflamação esteve ausente em nove casos (29%), não marcante em 14 casos (45.2%) e marcante em oito casos (25.8%) (Figura 2, Tabela 5.1).

5.2.5.2 Cistos radiculares

Dos 15 casos de CR selecionados para o estudo da imunoexpressão da proteína Vimentina no epitélio, 13 casos (86.7%) apresentaram imunoexpressão com escore 0 e dois casos (13.3%) com escore 1. A imunomarcação ocorreu em citoplasma isoladamente e em 14 casos houve marcação nas células dendríticas da camada basal do epitélio. A intensidade da marcação no epitélio mostrou-se moderada em quatro casos (26.7%) e intensa em 11 casos (73.3%) (Figura 2, Tabela 5.1).

Analisando o estroma, um caso (6.7%) apresentou marcação com escore 0 e 14 casos (93.3%) com escore 1. A intensidade da imunomarcação no estroma se mostrou moderada em quatro casos (26.7%) e intensa em 11 casos (73.3%). O padrão de marcação no estroma apresentou-se num padrão homogêneo em seis casos (40%) e heterogêneo em nove casos (60%). A inflamação esteve presente em todos os casos, sendo em dois deles (13.3%) não marcante e em 13 deles (86.7%) marcante (Tabela 5.1).

5.2.5.3 Folículos dentais

Das oito lâminas de FD selecionados para o estudo da imunoexpressão da proteína Vimentina, apenas quatro continham epitélio na lâmina e todas apresentaram positividade para a Vimentina em células dendríticas, sendo essa imunomarcação exclusiva no citoplasma. A intensidade da imunomarcação no epitélio mostrou-se leve em dois casos (50%) e intensa também em dois casos (50%) (Figura 2, Tabela 5.1).

No estroma, a imunoexpressão da Vimentina foi positiva em todos os casos. A intensidade da imunomarcação mostrou-se intensa em todos os oito casos

(100%). A inflamação esteve ausente em cinco casos (62.5%) e não marcante em três casos (37.5%) (Figura 2, Tabela 5.1).

5.2.5.4 Associação da imunoexpressão proteica entre os grupos

Dentre as variáveis analisadas no epitélio, o único resultado estatisticamente significativo foi a intensidade (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$) quando comparadas as três lesões estudadas. A intensidade da imunomarcção dos TOQs foi ausente na maioria dos casos (65,6%). Já os CRs e FDs foram todos positivos para a Vimentina, tendo 73.3% dos CRs e metade dos casos dos FDs uma imunomarcção intensa (Tabela 5.1).

No estroma, obteve-se diferença estatisticamente significativa somente quando analisada a presença de inflamação alterando a imunoexpressão da Vimentina (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$), onde cada lesão mostrou um comportamento distinto (Tabela 5.1). Os TOQs apresentaram em sua maioria inflamação não marcante (45.2%). Os CRs apresentaram maior número com presença de inflamação marcante (86.7%). Já os FDs apresentaram sua grande maioria (62.5%) com ausência de inflamação.

Tabela 5. Caracterização da imunopressão do anticorpo Vimentina no grupo de lesões de TOQ, CR e FD.

Vimentina	TOQ		CR		FD		p [#]
	n	%	n	%	n	%	
Extensão no epitélio							0.097
<10%	32	100	13	86.7	-	-	
≥10%	0	0	2	13.3	-	-	
Extensão no estroma							0.648
<10%	5	15.6	1	6.7	-	-	
≥10%	27	84.4	14	93.3	-	-	
Intensidade no epitélio							0.000*
Ausente	21	65.6	0	0	0	0	
Leve	1	3.1	0	0	2	50	
Moderada	3	9.4	4	26.7	0	0	
Intensa	7	21.9	11	73.3	2	50	
Intensidade no estroma							0.484
Ausente	1	3.1	0	0	0	0	
Leve	0	0	0	0	0	0	
Moderada	8	25	4	26.7	0	0	
Intensa	23	71.9	11	73.3	8	100	
Padrão no estroma							0.347
Homogêneo	19	59.4	6	40	-	-	
Heterogêneo	13	40.6	9	60	-	-	
Inflamação							0.000*
Ausente	9	29	0	0	5	62.5	
Não marcante	14	45.2	2	13.3	3	37.5	
Marcante	8	25.8	13	86.7	0	9	

#Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

5.3 DADOS CLÍNICOS DOS TOQs E IMUNOEXPRESSÃO PROTEICA

No grupo de pacientes com TOQ, obtiveram-se informações clínicas referentes à idade de 24 casos (Tabela 6), sendo que a idade variou de 8 a 73 anos de idade com média de 32,33 anos (Desvio Padrão (DP)=17,58). Ao categorizar a variável idade pela mediana (28 anos) em dois grupos e compará-los quanto à expressão de cada proteína, não se observou nenhuma associação estatisticamente significativa (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$) entre idade e extensão de imunomarcção das proteínas.

A informação quanto ao sexo dos casos de TOQs avaliados foi obtida de 24 pacientes, sendo que a maioria era do sexo masculino ($n = 16$), correspondendo a

66.6%. Ao avaliar a distribuição da expressão das proteínas quanto ao sexo nos TOQs, não obteve-se nenhum resultado estatisticamente significativo (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$).

Tabela 6. Dados clínicos dos casos do grupo TOQ.

Variáveis	Categoria	TOQ	
		N	%
Idade	≤ 28 anos	13	54.1
	> 28 anos	11	45.8
Sexo	Feminino	8	33.3
	Masculino	16	66.6
Cor	Faioderma	4	26.6
	Melanoderma	7	46.6
	Parda	4	26.6
Localização	Maxila	0	0
	Mandíbula	22	91.6
	Maxila e Mandíbula	2	8.3
Região	Anterior	2	12.5
	Posterior	11	68.7
	Anterior e posterior	3	18.7
Recidiva	Não	12	80
	Sim	3	20

A variável cor foi categorizada em 15 pacientes em faioderma ($n = 4$), melanoderma ($n = 7$) e parda ($n = 4$), sendo a maioria melanoderma (46.6%). Quando comparada à expressão das proteínas analisadas, nenhuma mostrou predileção por nenhuma categoria de cor (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$).

Dos 15 casos dos quais se obteve informação referente à recidiva do tumor, 12 casos (80%) representavam a primeira manifestação da doença, e três casos (20%) correspondiam à recidiva, porém não houve diferença estatisticamente significativa quanto à expressão das proteínas de acordo com a presença ou não de recidiva (Teste Exato de Fisher, $p > 0.05$).

Quanto à localização dos tumores de acordo com a arcada, em 22 casos (91.6%) ele se manifestou apenas na mandíbula e em dois casos (8.3%) a manifestação ocorreu tanto na maxila como na mandíbula. Em nenhum dos casos o tumor se apresentou na maxila exclusivamente. Quanto à análise de acordo com a expressão de cada proteína, houve diferença estatisticamente significativa com a extensão da expressão das seguintes proteínas:

- N-caderina no epitélio (Teste Exato de Fisher, $p = 0.000$): nenhum caso localizado em mandíbula deixou de expressar a N-caderina e a maioria deles (63.6%) apresentou uma expressão escore 4, ao contrário dos casos localizados em mandíbula e maxila que não tiveram nenhuma expressão para esta proteína (100%) (Tabela 7.1);
- N-caderina no estroma (Teste Exato de Fisher, $p = 0.006$): os casos localizados em mandíbula apresentaram uma maior distribuição entre as categorias, mas a maioria (38.1%) apresentou uma expressão escore 1, ao contrário dos casos localizados em mandíbula e maxila que não tiveram nenhuma expressão para esta proteína (100%) (Tabela 7.1);
- Slug no epitélio (Teste Exato de Fisher, $p = 0.005$): nenhum caso localizado em mandíbula deixou de expressar o Slug e a maioria deles (45.5%) apresentou uma expressão escore 3, ao contrário dos casos localizados em mandíbula e maxila que tiveram os dois casos divididos entre o escore 0 e o escore 2 (Tabela 7.2);
- Vimentina no estroma (Teste Exato de Fisher, $p = 0.036$): a maioria dos casos localizados em mandíbula apresentaram extensão escore 1 (86.3%), ao contrário dos casos localizados em mandíbula e maxila que tiveram os dois casos com extensão escore 0 (Tabela 7.2).

Tabela 7.1 Associação da imunexpressão dos anticorpos E-caderina e N-caderina de acordo com a localização da lesão e a região da arcada dentária acometida.

E-caderina	LOCALIZAÇÃO DA LESÃO				p [#]	REGIÃO DA ARCADA DENTÁRIA						p [#]
	Mandíbula		Maxila e Mandíbula			Anterior		Posterior		Anterior e posterior		
Extensão no epitélio	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
Ausente	1	4.5	1	50		0	0	0	0	1	33.3	
<20%	2	9.1	0	0	0.162	1	50	0	0	0	0	0.046*
20-50%	3	13.6	0	0		0	0	3	27.3	0	0	
>50%	16	72.7	1	50		1	50	8	72.7	2	66.7	
N-caderina												
Extensão no epitélio												
Ausente	0	0	2	100		0	0	0	0	2	66.7	
<10%	1	4.5	0	0	0.000*	0	0	1	9.1	0	0	0.059
10-20%	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
>20%	7	31.8	0	0		1	50	2	18.2	1	33.3	
>50%	14	63.6	0	0		1	50	8	72.7	0	0	
Extensão no estroma												
Ausente	1	4.8	2	100		1	50	0	0	2	66.7	
<10%	8	38.1	0	0	0.006*	1	50	3	27.3	0	0	0.226
10-20%	3	14.3	0	0		0	0	3	27.3	0	0	
>20%	5	23.8	0	0		0	0	4	36.4	1	33.3	
>50%	4	19	0	0		0	0	1	9.1	0	0	

*Teste Exato de Fisher, $p < 0.05$

A localização dos tumores em região anterior ou posterior da arcada dentária foi obtida de 16 casos. Destes, dois casos (12.5%) eram anteriores, 11 casos (68.75%) eram posteriores e três casos (18.75%) tiveram manifestação na região anterior e posterior da arcada. Em relação à expressão das proteínas, houve diferença estatisticamente significativa com a extensão da expressão da seguinte proteína:

- E-caderina (Teste Exato de Fisher, $p = 0.046$): nenhum caso localizado na região anterior ou posterior isoladamente deixou de expressar a E-caderina. A maioria dos casos localizados na região posterior (72.7%) e anterior e posterior (66.7%) apresentaram uma extensão escore 3. Apenas dois casos estavam localizados na região anterior e ficaram distribuídos igualmente nos escores 1 e 3 (Tabela 7.1).

Tabela 7.2 Associação da imunoexpressão dos anticorpos Snail, Slug e vimentina de acordo com a localização da lesão e a região da arcada dentária acometida.

	LOCALIZAÇÃO DA LESÃO				p [#]	REGIÃO DA ARCADA DENTÁRIA						p [#]
	Snail		Mandíbula			Maxila e Mandíbula		Anterior		Posterior		
	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	
Extensão no epitélio												
Ausente	0	0	0	0	1.000	0	0	0	0	0	0	0.298
<25%	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
25-50%	4	18.2	0	0		0	0	4	36.4	0	0	
>50%	18	81.8	2	100		2	100	7	63.6	3	100	
Extensão no estroma												
Ausente	0	0	0	0	0.377	0	0	0	0	0	0	0.218
<25%	4	20	1	50		0	0	1	9.1	1	33.3	
25-50%	10	50	0	0		2	100	7	63.6	0	0	
>50%	6	30	1	50		0	0	3	27.3	2	66.7	
Slug												
Extensão no epitélio												
Ausente	0	0	1	50	0.005*	0	0	0	0	1	33.3	0.221
<25%	6	27.3	0	0		0	0	2	18.2	1	33.3	
25-50%	6	27.3	1	50		0	0	2	18.2	1	33.3	
>50%	10	45.5	0	0		2	100	7	63.6	0	0	
Extensão no estroma												
Ausente	0	0	0	0	0.076	0	0	0	0	0	0	0.065
<25%	1	4.8	1	50		0	0	0	0	1	33.3	
25-50%	9	42.9	0	0		2	100	4	36.4	0	0	
>50%	11	52.4	1	50		0	0	7	63.6	2	66.7	
Vimentina												
Extensão no epitélio												
<10%	22	100	2	100	-	2	100	11	100	3	100	-
≥10%	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	
Extensão no estroma												
<10%	3	13.6	2	100	0.036*	0	0	2	18.1	2	66.6	0.155
≥10%	19	86.3	0	0		2	100	9	81.8	1	33.3	

[#]Teste Exato de Fisher, p < 0.05

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

A última análise consistiu em verificar qualquer correlação existente entre as proteínas estudadas nos TOQs, seja através de sua expressão no epitélio ou no estroma. Foram estabelecidas 32 possibilidades de associações diferentes e observadas as seguintes correlações estatisticamente significantes:

- N-cad (epitélio) x Slug (epitélio): correlação positiva, quanto maior a expressão da N-caderina no epitélio maior a do Slug também no epitélio (p = 0.024, coeficiente de correlação de Spearman 0.328);

- N-cad (estroma) X Slug (estroma): correlação positiva, quanto maior a expressão da N-caderina no estroma maior a do Slug também no estroma ($p = 0.019$, coeficiente de correlação de Spearman 0.346);
- Snail (epitélio) X Slug (epitélio): correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail no epitélio maior a do Slug também no epitélio ($p = 0.021$, coeficiente de correlação de Spearman 0.335);
- Snail (epitélio) X Vimentina (estroma): correlação positiva, quanto maior a expressão do Snail no epitélio maior a da Vimentina no estroma ($p = 0.044$, coeficiente de correlação de Spearman 0.295).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou avaliar a imunexpressão diferencial de biomarcadores envolvidos na regulação da E-caderina em TOQs, CRs e FDs, verificando as associações entre o perfil de imunexpressão destas proteínas entre si, nos três grupos estudados e com as características clínicas do TOQ. A análise do perfil de imunexpressão nos TOQs demonstrou expressão preservada de E-caderina na maioria dos casos, sendo que a N-caderina demonstrou um ganho de expressão em epitélio tumoral em relação ao estroma, o que esteve correlacionado com a expressão positiva de Slug em epitélio, e este por sua vez com a expressão positiva de Snail. No estroma dos TOQs, a N-caderina correlacionou-se positivamente com Slug e Vimentina, e esta com o Snail no epitélio. Ao comparar os três grupos estudados, a imunexpressão das proteínas foi influenciada de forma marcante pela inflamação, sendo possível por essa característica diferenciar de maneira significativa o TOQ e FD dos CRs.

A TEM é um evento relacionado a neoplasias malignas. Em cavidade oral, a neoplasia mais comum é o carcinoma epidermóide que pode demonstrar precocemente mudanças displásicas severas como resultado de aberrações genéticas (BRAAKHUIS et al., 2003), apesar da displasia epitelial nem sempre culminar no câncer (DOST et al., 2014). O carcinoma epidermóide intraósseo primário derivado do TOQ é raro (PHILIPSEN, 2005). Entretanto, na análise histopatológica do estudo de Azevedo et al. (2012), foi observado carcinoma epidermóide intraósseo se desenvolvendo a partir de dois casos de TOQ (1,1%). No presente estudo, existiram 4 casos com características de displasia epitelial. No estudo de Gonzáles-Moles et al. (2006), a expressão da proteína p53 foi significativamente associada com a presença de displasia epitelial leve em TOQs. Cox (2012) observou que as lesões císticas odontogênicas com características de displasia epitelial apresentam um aumento da expressão da proteína p53, independente do tipo de cisto, o que não reflete uma mutação do gene p53. Como a displasia em lesões císticas odontogênicas raramente é reconhecida ou relatada, e os casos de CEB intraósseo são bastante raros, ainda está para ser determinado se as alterações epiteliais displásicas em lesões císticas odontogênicas podem ser consideradas como preditores de mutação do p53 e/ou risco de transformação maligna (COX, 2012). Assim, justifica-se o estudo de marcadores de TEM em TOQs.

A adesão celular mediada por caderina atua como um sistema supressor de invasão de células neoplásicas, uma vez que as células não invasivas podem ser transformadas em invasivas quando a função da caderina é bloqueada por repressores relacionados (HAKIM et al., 2011). Vários estudos em CEB sugerem que a baixa regulação de E-caderina está envolvida na carcinogênese oral (FAN et al., 2013; WANG et al., 2012; ZHAO et al., 2012). De Freitas Silva et al. (2014) observaram diferenças significativas de imunexpressão da E-caderina entre a mucosa oral normal, displasia epitelial oral e CEB, participando portanto da predição de risco de transformação maligna do epitélio oral.

Em função da participação da E-caderina em CEB, onde uma diminuição na sua expressão tem sido associada com a progressão neoplásica (DE FREITAS SILVA et al., 2014; FAN et al., 2013; LIU et al., 2010; WANG et al., 2012; ZHAO et al., 2012), as moléculas de adesão têm sido recentemente estudadas em tumores odontogênicos na tentativa de entender se essas proteínas desempenham um papel na diferenciação celular, desenvolvimento tumoral e capacidade de invasão, o que poderia melhorar o diagnóstico diferencial, a compreensão do comportamento biológico tumoral e contribuir para uma abordagem terapêutica inovadora destas lesões (HAKIM et al., 2011; KUSAFUKA et al., 2011; MELLO et al., 2013; MESQUITA et al., 2009). A diminuição da imunexpressão da E-caderina explicaria o crescimento invasivo de TOQs (HAKIM et al., 2011), porém essa evidência não foi confirmada no presente estudo, visto que 62.5% dos casos de TOQ apresentaram imunexpressão preservada de E-caderina. Resultados semelhantes foram achados no estudo de Kusafuka et al. (2011), onde todos os 10 casos de TOQ apresentaram imunexpressão positiva para a E-caderina, e no estudo de Mello et al. (2013), que encontraram uma alta expressão de E-caderina (>50%) na camada suprabasal do epitélio de revestimento em todos os 18 TOQs avaliados, sugerindo um elevado grau de adesão celular entre as células parenquimatosas deste tumor.

Analisando a intensidade da imunomarcção da E-caderina, o presente estudo constatou que 75% dos TOQs, 60% dos CRs e 100% dos FDs apresentaram imunomarcção moderada ou intensa. Resultados similares foram encontrados na pesquisa de Alves Pereira et al. (2010), com imunomarcção moderada ou intensa em 75% dos 21 ameloblastomas sólidos e 100% dos cinco espécimes de germe dentário analisados. Com base nesses resultados, os autores concordaram que a E-

caderina tem um papel na regulação da morfogênese dentária, mediando a organização e a manutenção da arquitetura do órgão do esmalte. Não foi possível avaliar a extensão da marcação de E-caderina nos FDs, devido à escassez de epitélio odontogênico neste tipo de tecido, dificultando a comparação como referência de expressão em tecido histologicamente livre de tumor. Porém, observamos em FOL apenas intensidade de marcação moderada e intensa, o que correspondeu também a 75% dos TOQs nesses escores. Somando-se ao fato que 62.5% do TOQs exibiram escore 3 de extensão de imunomarcação, sugerimos como ponto de corte para considerar imunomarcação preservada de E-caderina quando esse resultado for alcançado.

Com a hipótese de que a TEM está envolvida na progressão dos TOQs, acreditava-se que poderia haver alguma diferença de imunoexpressão proteica da E-caderina entre as lesões estudadas, como visualizado por Hakim et al. (2011), que observaram uma diminuição significativa na expressão membranosa de β -catenina e E-caderina em todas as 18 amostras de TOQs esporádicos e sindrômicos, especialmente na camada suprabasal, enquanto os oito cistos dentígeros mostraram, em contrapartida, uma imunomarcação normal desde a membrana basal da camada epitelial até a superfície luminal. Entretanto, o presente estudo não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparou a extensão da E-caderina entre o TOQ, CR e FOL, apesar de 37.6% dos TOQs apresentarem imunoexpressão de E-caderina reduzida (expressão ausente e escores 1 e 2). Alves Pereira et al. (2010) também não observaram diferença de imunoexpressão da E-caderina em ameloblastomas e germes dentários, visto que todos os casos tiveram imunoexpressão positiva para esta proteína. Já Mello et al. (2013) observaram que todos os 18 casos de TOQ e quatro casos de tumor odontogênico cístico calcificante mostraram imunoexpressão significativamente maior para E-caderina que a observada nos 20 ameloblastomas, sugerindo seu papel importante na mediação de adesão celular em tumores odontogênicos e suportando o padrão de invasão local dos ameloblastomas.

A ideia de TEM e o seu papel no desenvolvimento e/ou a progressão do tumor, ainda é controversa, mas está bem conhecido que a β -catenina e a chamada "inversão das caderinas" podem ter um efeito profundo sobre o fenótipo e o comportamento celular (LIANG, 2011). A "inversão das caderinas" (*cadherin*

switching), representada pela expressão aumentada de N-caderina e concomitante baixa expressão de E-caderina, é sugerida como uma característica crucial da TEM no câncer (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009). Em virtude disso, foi avaliada a proteína N-caderina no presente estudo, na tentativa de verificar qualquer associação com a E-caderina em TOQs.

Foi demonstrada no presente trabalho alta expressão de N-caderina no epitélio dos TOQs, bem como nos CRs. Na análise comparativa da expressão de N-caderina no epitélio e estroma dos TOQs, a N-caderina demonstrou maior expressão em epitélio tumoral em relação ao estroma. Apenas um único estudo foi encontrado analisando a expressão de N-caderina em TOQs, em que Kusafuka et al. (2011) verificaram quatro casos de TOQ (40,0%) positivos para N-caderina, e imunexpressão negativa em todos os sete cistos dentígeros avaliados. Resultados semelhantes ao de Kusafuka foram encontrados em CEB, onde houve um aumento da expressão de N-caderina nos tumores em comparação com as células normais (DI DOMENICO et al., 2011). Apesar de serem cistos de origens diferentes, esperava-se um resultado semelhante ao de Kusafuka. Portanto, de acordo com os resultados do presente estudo, a N-caderina parece participar da progressão do TOQ na sinalização de TEM através da interação com outros reguladores. Ainda, a presença da inflamação pode ter contribuído no aumento da expressão de N-caderina nos CRs.

A imunexpressão de N-caderina tem sido encontrada na membrana e/ou citoplasma por imunistoquímica em células neoplásicas epiteliais de carcinoma de células fusiformes de cabeça e pescoço (NGUYEN et al., 2011) e em CEB (ZHAO et al., 2012). Um padrão de expressão nuclear da N-caderina foi particularmente observado em câncer indiferenciado, caracterizado por um pior prognóstico (DI DOMENICO et al., 2011). Não existem estudos em tumores odontogênicos que abordem a diferença de padrão de expressão nos compartimentos celulares. No presente estudo, o padrão de marcação nos compartimentos celulares para a N-caderina foi semelhante ao observado em carcinomas de cabeça e pescoço e CEB, tendo a maioria dos TOQs e CRs com marcação em membrana e citoplasma e a maioria dos FDs com marcação somente em citoplasma. Mas é interessante ressaltar que nenhum CR ou FOL apresentou imunomarcação nuclear, o que foi encontrado de forma significativa em 33.4% dos TOQs. DI Domenico et al. (2011),

com base em seus resultados em que o padrão de marcação nuclear da N-caderina foi particularmente observado em CEB indiferenciado (caracterizado por um pior prognóstico), levantaram a hipótese de que o padrão de marcação nos compartimentos celulares da N-caderina pode constituir uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico útil na avaliação de tumores e para determinar a histogênese das células tumorais.

A comparação da imunexpressão da N-caderina entre epitélio e o estroma de TOQs mostrou diferença estatisticamente significativa, em que o epitélio obteve maior imunexpressão de N-caderina em relação ao estroma. Enquanto observou-se os escores 3 e 4 no estroma em 14 TOQs, 28 casos mantiveram esses escores no epitélio. Apesar de não ter sido observada redução da expressão de E-caderina correlacionada a esse achado de forma significativa para caracterizar a fenômeno de "cadherin switch", 37.6% dos TOQs exibiram imunexpressão de E-caderina reduzida. Assim, a análise em maior grupo de tumores com dados de acompanhamento (recidiva, tamanho tumoral) se faz necessária para estabelecer se esse perfil proteico está relacionado a um grupo tumoral de comportamento biológico distinto. DI Domenico et al. (2011) observaram expressão membranosa de E-caderina em frente invasivo superficial e profundo de CEB, juntamente com a ausência de expressão de N-caderina nas células neoplásicas bem diferenciadas superficiais e forte expressão em áreas infiltrativas. Alguns estudos evidenciaram em CEB uma correlação significativa entre a alta expressão de N-caderina e pior prognóstico e tendência a metástases (DI DOMENICO et al., 2011; DING et al., 2014). Provavelmente, a N-caderina também apóia a disseminação sistêmica de células tumorais, permitindo que as células tumorais circulantes se associem com o estroma e endotélio em locais distantes (DI DOMENICO et al., 2011).

Ao contrário de cânceres humanos, o papel potencial da TEM na indução de invasão em TOQs não foi amplamente investigado. Neste estudo, dois repressores de transcrição da E-caderina (Snail e Slug), foram utilizados, com o intuito de verificar o padrão de expressão dessa proteínas, de especular sobre o seu significado e de verificar qualquer correlação com a expressão da E-caderina e de marcadores mesenquimais (N-caderina e Vimentina).

Snail é um dos reguladores principais que promovem TEM e levam à invasão, bem como metástase em tipos diferentes de tumores malignos (FRANZ et al., 2009; ZHAO et al., 2012; ZHOU et al., 2004). Estudos revelaram que o aumento da expressão do Snail induziu alterações morfológicas tipo TEM e causou uma diminuição na expressão da E-caderina (FRANZ et al., 2009; WANG et al., 2013; ZHAO et al., 2012).

Snail é uma proteína que não está presente exclusivamente no núcleo (DOMÍNGUEZ et al., 2003). Observamos que a proteína Snail foi amplamente expressa no epitélio do TOQ (96.8% positivos e 78.1% com expressão >50%), com uma localização predominantemente nuclear ou nuclear e citoplasmática. O endotélio vascular e os fibroblastos estromais frequentemente expressaram Snail. A fosforilação do Snail faz com que ele seja exportado a partir do núcleo para o citoplasma, resultando em sua inativação como um fator de transcrição (ZEISBERG; NEILSON, 2009). Siar e Ng (2014) encontraram os mesmos resultados para o Snail ao avaliarem sua expressão em 64 ameloblastomas, estando presente em 94% desses tumores.

Wang et al. (2012) não observaram diferença significativa na expressão do Snail entre amostras normais e tumorais de carcinoma de língua. Neste trabalho, não foi observada diferença significativa de imunoexpressão do Snail no epitélio nos grupos TOQ e CR, mas todos os folículos apresentaram imunopositividade para o Snail. Franz et al. (2009) não encontraram células com positividade para o Snail na mucosa oral normal ou hiperplásica adjacente ao CEB, assim como Franci' et al. (2009) que detectaram expressão de Snail em 128 dos 162 carcinomas de colorretal analisados (79%) e não no tecido normal obtido a partir de porções distais dos mesmos pacientes, ao contrário do achado deste estudo, onde todos os casos de FOL mostraram-se positivos para o Snail. Embora as proteínas da família Snail pareçam ser necessárias para todos os processos de TEM que já foram estudados, isso não significa necessariamente que a indução da TEM é o papel exclusivo de genes da família Snail. Eles também têm funções celulares adicionais, que podem ocorrer de forma independente da indução da TEM. Eles protegem as células da morte induzida quer pela perda de fatores de sobrevivência ou por estímulos apoptóticos diretos. Em alguns casos, as propriedades de sobrevivência surgem concomitantes com a indução da TEM, ao passo que, em outros, tanto a resistência

à morte celular e à persistência do fenótipo epitelial são requeridos (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005). Células que expressam Snail se mantêm através de privação de fatores de sobrevivência, da resistência à ação de estímulos apoptóticos diretos que sinalizam através do receptor de morte e da resistência a danos no DNA (KAJITA; MCCLINIC; WADE, 2004; MARTINEZ-ALVAREZ et al, 2004; VEGA et al, 2004). O mecanismo pelo qual a indução TEM é evitada nestes casos não se conhece (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005). Portanto, a positividade para o Snail expressa nos folículos não parece estar relacionada com a TEM. A expressão preservada de E-caderina neste tecido também apoia esta hipótese.

Quando a imunoposição de Snail foi analisada no estroma, foi observada uma associação estatisticamente significativa da imunoposição do Snail ao compararmos TOQs e CRs. Todos os TOQs apresentaram positividade para o Snail no estroma, porém igualmente distribuídos nos três escores de expressão. Já 73.3% dos CRs se mostraram com expressão aumentada (>50%) de Snail. Franz et al. (2009) e Schwock et al. (2010), ao avaliarem a imunoposição do Snail no CEB, verificaram a imunomarcagem nuclear nas células tumorais, no estroma e nas células endoteliais. Entretanto, a positividade das células tumorais para o Snail se mostrou um fenômeno raro, sendo um fenômeno que ocorre principalmente nas células do estroma, detectável na frente invasiva, na vizinhança das ilhas tumorais e da inflamação.

Franz et al. (2009) encontraram uma associação dessa expressão com o fenótipo de miofibroblastos e perda de expressão de E-caderina. Eles sugeriram que as células com positividade para Snail e α AML na frente invasiva de CEB são resultado da ação do fator de crescimento específico dos fibroblastos no CEB e não um sinal de TEM. Jouppila-Mättö et al. (2011) observaram que os carcinomas da faringe que não expressam Twist ou Snail no estroma eram menores, de estágio menos avançado e foram mais frequentemente situados na orofaringe. Eles acreditam que algumas das células do estroma podem representar células epiteliais de câncer que tenham sido submetidas ou estejam em processo de TEM, perdendo suas características epiteliais, podendo haver uma proporção de células do estroma representando células tumorais transformadas. No presente estudo, entretanto, as células do estroma imunomarcadas pelo Snail estavam presentes em fibroblastos e células endoteliais, e ainda a imunomarcagem de Snail em epitélio correlacionou-se

positivamente com a imunoexpressão de Vimentina no estroma, corroborando para a hipótese de que pode existir a participação da TEM nos TOQs. Schwock et al. (2010) encontraram em CEB uma expressão coincidente entre Vimentina e Snail em vários casos com expressão estromal proeminente. Apesar da expressão do Snail não ter sido significativamente associada à perda de E-caderina, assim como no presente estudo, esta observação parece consistente com natureza focal e/ou transiente da TEM associada ao tumor, assim como a contribuição de outros mediadores de TEM.

Apesar da organização estrutural semelhante, os dedos de zinco do Snail e Slug não são equivalentes, com combinações específicas de dedo de zinco (ZF1/ZF2 em Snail1, e ZF3/ZF4 em Snail2) sendo necessárias para uma atividade de repressão completa. Portanto, essas proteínas desempenham papéis não-equivalentes na repressão gênica, no arranjo da ligação ao DNA e capacidade de indução de TEM (VILLAREJO et al., 2014). O Slug, portanto, tem mostrado um comportamento diferente do Snail a depender do tecido analisado. Em comparação com o tecido normal, ele exibiu significativamente maior expressão em carcinoma de língua (WANG et al., 2012), com uma concomitante redução da E-caderina e aumento da Vimentina, em carcinoma de cabeça e pescoço (ZHANG et al., 2013) juntamente com o fenômeno “cadherin switch”. É de suma importância ressaltar que a análise da expressão nessas pesquisas foi realizada levando-se em consideração tanto proporção de células marcadas como intensidade de marcação. No presente estudo, não foi verificada associação quando analisamos a extensão do Slug, mas ao observar a intensidade da expressão do Slug no epitélio e no estroma, foi verificado um resultado estatisticamente significativo, onde os folículos expressaram intensamente Slug no epitélio, enquanto que no estroma todos os TOQs apresentaram expressão moderada ou intensa, ao contrário dos CRs e FDs que estavam bem distribuídos entre as categorias.

No presente estudo, a imunomarcagem para o Slug no epitélio se mostrou com padrão de distribuição bastante heterogênea nos TOQs (74.2%) ao contrário da homogeneidade observada nos CRs (66.7%). Padrão de expressão semelhante para o Slug foi observada em 64 ameloblastomas avaliados por Siar e Ng (2014), entretanto esses autores não realizaram nenhuma análise estatística para comparar

os grupos avaliados. Assim, essa heterogeneidade pode ser peculiar a tecido tumoral, o que não foi observada na lesão cística inflamatória no presente estudo.

Em relação aos fatores de transcrição, várias linhas de evidência indicam que as formas nucleares são funcionalmente moléculas ativas, ao passo que as suas expressões citoplasmáticas são fosforiladas e funcionalmente inativadas (PRASAD et al., 2009; ZHOU et al., 2004). De fato, a função do Slug também é regulada por sua localização celular (BARRALLO-GIMENO; NIETO, 2005). Uma vez que Snail e Slug são fatores de transcrição reguladores negativos da E-caderina, Wushou et al. (2012), estudando CEB, levantaram a hipótese de que apenas a forma nuclear seria ativa, e considerou apenas como positivas as células em que o núcleo foi totalmente corado. Talvez por conta disso, não encontraram imunomarcação em todas as 10 amostras de mucosa oral normal. Zhang et al. (2013) também só consideraram positividade para o Slug quando observaram marcação nuclear. No presente estudo, foi observado que os TOQs apresentaram marcação que envolvia o núcleo na maioria deles, ao contrário da maioria citoplasmática nos CRs e FDs, o que sugeriria uma maior atividade do Slug como fator de transcrição nos TOQs. Resultados diferentes foram encontrados por Siar e Ng (2014), onde observaram em ameloblastomas uma localização mais citoplasmática do que nuclear para o Slug e uma marcação mais nuclear para o Snail, concluindo que os fatores de transcrição desempenham papéis diferenciados na indução de TEM no ameloblastoma e que o Snail pode ser o repressor-chave envolvido neste processo. No caso dos TOQs do presente estudo, o processo parece ser inverso. O Slug parece estar tendo maior participação, já o Snail parece sofrer interferência da inflamação visto que expressão nuclear foi encontrada também em 46,7% dos CRs.

A TEM é caracterizada por regulação negativa de marcadores epiteliais e regulação positiva de marcadores mesenquimais (FUCHS et al., 2008; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001; VALCOURT et al., 2005). Em função disso, várias proteínas são avaliadas para caracterizar a TEM em uma lesão. Wang et al. (2012) verificaram em carcinomas de língua expressão aumentada do Slug no epitélio tumoral associada com a redução da expressão de E-caderina e o aumento da expressão de Vimentina. Estes resultados indicam que o Slug pode suprimir a expressão da E-caderina e induzir TEM, o que por sua vez contribui para a invasão e metástase. Para investigar se o Slug afeta os níveis de expressão de marcadores

mesenquimais TGF- β 1-induzidos N-caderina e Vimentina, Saito et al. (2013) silenciaram a expressão de Slug por siRNA em linhagem celular de CEB antes da estimulação com TGF- β 1 e encontraram que a baixa regulação de Slug suprimiu significativamente a expressão de Vimentina TGF- β 1-induzida, mas não afetou a expressão de N-caderina TGF- β 1-induzida. Estes dados sugerem que o Slug contribui para a expressão gênica de marcadores mesenquimais durante a TEM em CEB. Contrariamente, no presente estudo, não observamos uma correlação entre Slug e Vimentina, mas com um outro marcador mesenquimal: a N-caderina. De fato, Snail e Slug têm efeitos diretos ou indiretos sobre genes adicionais além da E-caderina (VILLAREJO et al., 2014). Assim, a participação do Slug durante a TEM em TOQs pode regular a N-caderina, uma vez que encontramos correlação positiva estatisticamente significativa de Slug e N-caderina em epitélio e estroma. A mesma relação ocorreu no estudo de Zhang et al. (2013), onde amostras de 119 carcinomas de cabeça e pescoço primários apresentaram níveis individuais de Slug negativamente correlacionados com a E-caderina e positivamente correlacionados com a N-caderina, ocorrendo um aumento da expressão de N-caderina em resposta à ativação de Slug. Entretanto, nenhuma evidência demonstra que a via de sinalização Slug está envolvido na regulação direta de N-caderina. Portanto, novas pesquisas são necessárias para esclarecer essa correlação, envolvendo ensaios funcionais em tumores odontogênicos.

De uma forma geral, o aumento de expressão dos fatores de transcrição Snail e Slug reprime a função da E-caderina, sendo consideradas moléculas chave da TEM, com grande relevância na progressão em neoplasias de diferentes partes (FRANZ et al., 2009; WANG et al., 2013; ZHU et al., 2012). Apesar de não ter sido evidenciada uma correlação inversa da expressão da E-caderina e Snail/Slug nos TOQs do presente estudo, foi observada uma correlação positiva entre Snail e Slug no epitélio dos TOQs, ou seja, nos casos em que a imunomarcagem para o Snail estava positiva, houve também positividade para o Slug. Isso demonstra o quanto estes fatores estão interligados, apesar deles apresentarem papéis não equivalentes na repressão do promotor epitelial, de ligação ao DNA e capacidade de indução de TEM (VILLAREJO et al., 2014). Siar e Ng (2014) obtiveram relações inversas entre Snail e Slug no epitélio de ameloblastomas. Aproximadamente dois terços da amostra não foram reagentes para Slug contra 94% positivos para o Snail. A

acentuada baixa expressão de Slug em ameloblastoma pode indicar que esta proteína reguladora provavelmente desempenha um papel limitado na indução de TEM nesta neoplasia. As razões para estes padrões de expressão diferenciais entre Snail e Slug não são claras, mas novas evidências indicam que esses repressores de transcrição podem agir sozinhos ou em conjunto (BOLÓS et al., 2003; HAJRA; CHEN; FEARON, 2002).

Também avaliamos a proteína mesenquimal Vimentina. Todos os casos de TOQ apresentaram imunomarcagem para a Vimentina no epitélio em menos de 10% das células analisadas, contudo 68,7% deles apresentaram intensidade de marcação ausente ou leve no epitélio, sendo esta última análise estatisticamente significativa quando comparada ao CRs que exibiram marcação intensa no epitélio em 73,3% dos casos. Florescu et al. (2012) evidenciaram uma reatividade para a Vimentina nos compartimentos citoplasmáticos das células do estroma dos ameloblastomas investigados, sendo que, de um modo geral, o compartimento epitelial neoplásico teve fraca reatividade ou nenhuma reatividade para a Vimentina. A maior imunomarcagem para a Vimentina foi observada nas células do estroma adjacentes à frente invasiva do tumor, especialmente naqueles casos com osso ou extensão da pele. Também observamos que 84,4% dos TOQs exibiram imunomarcagem em estroma, sendo 96,9% com intensidade moderada e intensa. Atualmente, acredita-se que a frente invasiva dos tumores é a região que contém as informações de prognóstico mais úteis porque, presumivelmente, as células mais invasivas estão localizadas nesta região (BÀNKFALVI; PIFFKÒ, 2000).

Vale ressaltar que todas as células imunomarcadas pela Vimentina no epitélio de TOQs e CRs foram caracterizadas como células de Langerhans. A Vimentina é um dos anticorpos capazes de detectar células de Langerhans (MESQUITA et al., 2009), que são células dendríticas apresentadoras de antígenos que iniciam uma resposta imune primária dependente de linfócitos T (LOMBARDI; HAUSER; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1993 apud SUZUKI et al., 2001). As evidências disponíveis indicam que elas têm um papel importante em reações imunes mediadas por células, bem como na patogênese das lesões periapicais (SUZUKI et al., 2001). Chen et al. (2014) encontraram células de langerhans em ninhos epiteliais de tumores odontogênicos epiteliais calcificantes através de imunistoquímica com os anticorpos S-100, CD1a e langerina. Mesquita et al. (2009) encontraram algumas

células dendríticas dentro do epitélio odontogênico de um tumor odontogênico central de células granulares, sendo estas células positivas para a Vimentina. Pelo fato de que tanto o epitélio oral como o epitélio odontogênico são originários da ectoderme, é possível que as células de Langerhans também migrem para ninhos epiteliais de tumores odontogênicos, entretanto o verdadeiro significado patológico da presença de células de Langerhans em tumor odontogênico central de células granulares e outros tumores odontogênicos precisa de mais investigações. Konradi et al. (2014), com base em seus resultados *in vitro*, propuseram semelhanças entre a maturação de células de langerhans e a TEM, incluindo uma mudança na morfologia fixa para uma morfologia móvel, bem como a regulação negativa de um conjunto de genes epiteliais, a expressão aumentada do marcador mesenquimal N-caderina e o aumento da expressão e localização nuclear dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2, enquanto os fatores de transcrição da família SNAIL não foram detectados.

Postulou-se que o aumento da frequência de células de Langerhans dentro do tumor pode ser explicado pelo crescimento tumoral que provoca danos no tecido local e, conseqüentemente, o recrutamento de células inflamatórias para o local do tumor (BALEEIRO et al., 2008). Mello et al. (2013) notaram que TOQs primários com inflamação tenderam a mostrar uma contagem mais expressiva de células de Langerhans CD1a-positivas do que TOQs primários sem inflamação, TOQs recorrentes sem inflamação e TOQs ligados à Síndrome sem inflamação. Wu et al. (2013) observaram a presença de inflamação moderada ou severa em todos os casos de fibromas odontogênicos onde foram detectadas células de langerhans. Já Santos et al. (2007) não observaram diferenças significativas entre a quantidade de células de langerhans CD1a positivas em CRs e granulomas dentais e o grau de resposta inflamatória. Por outro lado, eles detectaram células de Langerhans em 69,2% dos CRs estudados e em 11,1% dos granulomas dentais, mostrando uma correlação significativa entre a imunomarcagem e o tipo de lesão. No presente estudo, não foi confirmada nenhuma diferença estatisticamente significativa de extensão da imunomarcagem da Vimentina de acordo com o tipo de lesão, mas foi observada uma diferença ao avaliar a intensidade da expressão da Vimentina no epitélio, visto que uma maior intensidade da imunoexpressão da Vimentina em células dendríticas do epitélio foi observada nos casos de CRs em comparação aos

TOQs. Provavelmente a inflamação influenciou essa diferença de intensidade entre os grupos, visto que alguns autores têm relatado uma correlação direta e significativa entre a densidade de células de Langerhans marcadas pelo anticorpo CD1a e o potencial proliferativo do epitélio em CRs e granulomas, sendo que o potencial proliferativo é desencadeado pelo estímulo inflamatório (SUZUKI et al., 2001).

Apesar dos TOQs não se referirem primariamente à lesão inflamatória, a presença desta foi documentada em 15 casos, podendo modificar o perfil de expressão dos referidos marcadores na indução da TEM. Inflamação, variando de discreta para intensa, foi observada pelo menos focalmente em 67,8% dos 177 casos de TOQ avaliados por Azevedo et al. (2012). Segundo Alaeddini et al. (2013), as células inflamatórias encontradas em TOQs inflamados parecem ter secundariamente penetrado no tumor em vez de terem sido recrutadas para fins angiogênicos, visto que eles não encontraram um aumento significativo na densidade de microvasos em TOQs quando comparados com CRs.

Além de uma modificação estrutural tecidual, com revestimento epitelial demonstrando metaplasia para epitélio escamoso não queratinizado, camada epitelial mais fina e projeções em gota (ALAEDDINI et al., 2013), a inflamação causa modificações funcionais. Singh et al. (2012), ao avaliarem a imunoexpressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) nas células epiteliais de 40 TOQs, observaram que, quando há inflamação, há um aumento estatisticamente significativo na atividade proliferativa de TOQs multiloculares e múltiplos, enquanto que não há um aumento significativo na proliferação das lesões uniloculares e de casos síndrômicos, sugerindo que a inflamação aumenta o comportamento neoplásico de TOQs multiloculares e múltiplos e não afeta os uniloculares e síndrômicos. Kaplan e Hirshberg (2004) analisaram o potencial proliferativo de 45 TOQs em relação à inflamação utilizando Ki-67 e PCNA como marcadores de proliferação e chegaram à conclusão de que houve um aumento na expressão apenas do Ki-67 no revestimento epitelial metaplásico dos TOQs, adjacente a inflamação moderada e intensa, sem um efeito significativo na atividade proliferativa geral dessas lesões. Santos et al. (2009) verificaram um perfil de expressão alterada das citoqueratinas 13, 14, 18 e 19 em TOQs inflamados, estando relacionado com o estado de diferenciação e maturação do epitélio cístico, e sem ser distinto quando os

tumores primários e recorrentes, e aqueles associados com a SCNBC são comparados. Portanto, parece que o efeito principal das células inflamatórias em TOQs seria sobre algumas de suas características, tais como a atividade proliferativa epitelial (DE PAULA et al., 2000; KAPLAN; HIRSHBERG, 2004; SINGH et al., 2012) e expressão de citoqueratinas (SANTOS et al., 2009), tendo um impacto menor na vascularização do estroma (ALAEDDINI et al., 2013).

A inflamação inclusive teve interferência estatisticamente significativa na expressão de todas as proteínas estudadas, apresentando uma influência de forma marcante na expressão das proteínas na maioria dos CRs, com porcentagens variando de 73,3% a 100%. A inflamação é uma resposta benéfica ativada para restaurar injúrias teciduais e agentes patogênicos. No entanto, se a inflamação é desregulada, pode se tornar crônica, induzindo transformação de células malignas no tecido circundante (LANDSKRON et al., 2014). Yadav et al. (2011), em um estudo in vitro, demonstraram que o tratamento de células neoplásicas da cabeça e do pescoço ou células epiteliais bucais imortalizadas com IL-6 induziram significativamente a expressão de proteínas Vimentina e Snail enquanto reprimiu a expressão de E-caderina. St John et al. (2009) demonstraram que mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e IL-8, aumentaram a expressão de Snail em carcinomas de cabeça e pescoço, definindo ainda mais o ciclo pelo qual a inflamação promove a progressão do tumor. Lyons et al. (2008), em um estudo in vitro, demonstraram que Snail e Slug podem também regular positivamente estas citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos orais, incluindo a IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL8. Okui et al. (2013), ao estimularem linhagem celular de CEB com TGF- β ou TNF- α isoladamente, observaram um aumento dos níveis de expressão de Snail e Slug, enquanto que Saito et al. (2014), ao avaliarem o efeito da indução de TEM em células Madin-Darby de rim canino (MDCK) com TGF- β canino (cTGF- β), TNF- α canino (cTNF- α) e IL-6 canino (CIL-6) sobre a morfologia das células e expressão de E-caderina, verificaram que houve uma diminuição na expressão de E-caderina e uma transição em sua localização da membrana celular para o citoplasma, juntamente com uma mudança morfológica com a exposição persistente de TNF- α , diminuindo também as interações de adesão célula-célula.

A N-caderina, quando expressa em epitélio, esteve correlacionada com a expressão positiva de Slug em epitélio, e este por sua vez com a expressão positiva

de Snail. No estroma dos TOQs, a N-caderina correlacionou-se positivamente com Slug, e a Vimentina com o Snail no epitélio. Apesar da crença geral de que os fatores de transcrição Snail atuam como repressores, vários genes são regulados positivamente após expressão dos genes da família Snail, incluindo a Vimentina (DENNIS et al., 2012). Em cultura de células induzidas por Snail, a expressão de E-caderina foi diminuída, enquanto que as expressões dos marcadores mesenquimais N-caderina e Vimentina estavam aumentadas (KUME et al. 2013). Gasparotto et al. (2011), ao analisarem 69 carcinomas de cabeça e pescoço, verificaram que as expressões gênicas de Twist e Slug estiveram positivamente correlacionadas com o aumento da expressão de marcadores de mesenquimais, incluindo Vimentina e N-caderina, e que a regulação positiva destes marcadores mesenquimais não necessariamente se associaram com a perda da expressão de E-caderina, sugerindo que nesse tipo de carcinoma a ativação de um fator mesenquimal pode ser, pelo menos em parte, desacoplado da regulação baixa transcricional de E-caderina.

O presente estudo, embora não tenha relatado dados clinicopatológicos de todos os pacientes, confirma os resultados de outros estudos que relataram que o TOQ mostra uma predominância pelo sexo masculino (BOFFANO; RUGA; GALLESIO, 2010; MYOUNG et al., 2001; ZECHA et al., 2010), um pico de incidência entre a segunda e a quarta décadas de vida, atingindo uma ampla faixa etária, desde crianças a idosos, e acomete principalmente a área posterior da mandíbula, o que inclui a região molar, ângulo e ramo (AZEVEDO et al., 2012; BOFFANO; RUGA; GALLESIO, 2010; MYOUNG et al., 2001; ZECHA et al., 2010).

A comparação dos dados clinicopatológicos dos TOQs com a expressão das 5 proteínas estudadas resultou em alguns resultados estatisticamente significantes. O aumento de expressão de N-caderina no epitélio e no estroma, do Slug no epitélio e da Vimentina no estroma estiveram associados com uma predominância de localização na mandíbula. Nenhum dos 2 casos de TOQ em maxila e mandíbula concomitantemente apresentaram imunoexpressão para a N-caderina. De acordo com estes resultados, a localização do tumor interfere na expressão das proteínas. A influência desses achados no comportamento tumoral merece ser investigado. Nós especulamos que os casos em mandíbula podem ter um pior prognóstico, visto que a maioria apresentou alta expressão (>50%) de N-caderina no epitélio (63.6%),

baixa expressão (<10%) de N-caderina no estroma (38.1%), alta expressão (>50%) de Slug no epitélio (45.5%) e maior expressão (>10%) de Vimentina no estroma (86.3%). Este perfil de expressão indica a existência de TEM nos TOQs, entretanto não foi encontrada uma associação significativa com a E-caderina, apesar de alguns casos exibirem ausência de expressão ou ainda expressão reduzida desta proteína. Uma maior casuística é necessária para a confirmação desta suposição, principalmente incluindo casos de ocorrência em maxila e mandíbula concomitantemente.

Quando avaliada a localização anterior ou posterior do tumor em relação à imunoexpressão das proteínas, resultado estatisticamente significativo foi encontrado com relação à E-caderina e uma tendência de expressão da N-caderina no epitélio. A grande maioria dos casos que apresentaram localização posterior (quer isoladamente ou em conjunto com a anterior) apresentou expressão preservada de E-caderina (>50%), sugerindo um pior prognóstico para os casos localizados na região anterior. Em contrapartida, apenas dois casos eram anteriores. Já com relação à expressão da N-caderina no epitélio, os TOQs localizados em região anterior e posterior apresentaram ausência de expressão de N-caderina no epitélio em 66.7% dos casos. Foi observada relação inversa da E-caderina e N-caderina nos casos localizados na região anterior e posterior, cuja maioria exibiu expressão preservada de E-caderina e ausência de expressão de N-caderina no epitélio. Teoricamente esses tumores seriam maiores, por estarem envolvendo as duas regiões, mas como não foi obtido dados referentes ao tamanho tumoral, não é possível afirmar que tumores maiores apresentaram expressões proteicas diferenciais dos menores. Titinchi e Nortje (2012) não encontraram associação entre o tamanho da lesão e a taxa de recorrência das lesões de TOQ. Uma maior casuística é necessária para a confirmação desta suposição.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas E-caderina, N-caderina, Snail, Slug e Vimentina estão diferentemente expressas em TOQs, CRs e FDs;
- O perfil de imunexpressão de E-caderina nos TOQs demonstrou-se preservado;
- A alta intensidade de marcação do Slug nos TOQs sugere esta proteína como fator de transcrição principal na indução de TEM nesse tumor odontogênico;
- A imunexpressão das proteínas foi influenciada de forma marcante pela inflamação em TOQs, CRs e FDs;
- As expressões aumentada de N-caderina no epitélio e no estroma, do Slug no epitélio e da Vimentina no estroma estiveram associadas com a localização do TOQ em mandíbula;
- A maioria dos casos de TOQ que apresentaram localização posterior (quer isoladamente ou em conjunto com a anterior) apresentou expressão preservada de E-caderina;
- Existiu ganho de expressão de N-caderina em epitélio dos TOQs em relação ao estroma, o que esteve correlacionado com a expressão positiva de Slug em epitélio, e este por sua vez com a expressão positiva de Snail;
- A N-caderina correlacionou-se positivamente com Slug no estroma dos TOQs, e a Vimentina no estroma com o Snail no epitélio.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M. et al. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 23, p. 9003–15, Dec. 2006.
- AGARAM, N. P. et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch Pathol Lab Med**, v. 128, n. 3, p. 313-7, Mar. 2004.
- ALAEEDDINI, M. et al. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastomas. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 422-7, Sept. 2009.
- ALAEEDDINI, M. et al. Exploring the concept of “inflammatory angiogenesis” in keratocystic odontogenic tumor. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 2, p. e241-5, Mar. 2013.
- ALVES PEREIRA, K. M. et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in ameloblastomas and tooth germs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 425-31, Mar. 2010.
- AVELAR, R. L. et al. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 5, p. 668-73, Sept-Oct. 2008.
- AZEVEDO, R. S. et al. Histopathological features of keratocystic odontogenic tumor: a descriptive study of 177 cases from a Brazilian population. **Int J Surg Pathol**, v. 20, n. 2, p. 154-60, Apr. 2012.
- BALEEIRO, R. B. et al. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it? **Cancer Immunol Immunother**, v. 57, n. 2, p. 265-70, Feb. 2008.
- BÄNKFALVI, A.; PIFFKÒ, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. **J Oral Pathol Med**, v. 29, n. 7, p. 291-8, Aug. 2000.
- BARRALLO-GIMENO, A.; NIETO, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. **Development**, v. 132, n. 14, p. 3151–61, July 2005.
- BARRETO, D. C. et al. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **J Dent Res**, v. 79, n. 6, p. 1418-22, June 2000.
- BINDELS, S. et al. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. **Oncogene**, v. 25, n. 36, p. 4975-85, Aug. 2006.
- BLANAS, N. et al. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, n. 5, p. 553-8, Nov. 2000.

BOFFANO, P.; RUGA, E.; GALLESIO, C. Keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): Preliminary retrospective review of epidemiologic, clinical and radiologic features of 261 lesions from University of Turin. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 12, p. 2994-9, Dec. 2010.

BOLÓS, V. et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. **J Cell Sci**, v. 1, n. 116(Pt 3), p. 499-511, Feb. 2003.

BOSCH, F. X. et al. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. **Int J Cancer**, v. 114, n. 5, p. 779–90, May 2005.

BRAAKHUIS, B. J. et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Res**, v. 63, n. 8, p. 1727-30, Apr. 2003.

BRANNON, R. B.; COLONEL, L. The odontogenic keratocyst: a clinicopathologic study of 312 cases: part I. Clinical features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 42, n. 1, p. 54-72, July 1976.

BRANNON, R. B. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 43, n. 2, p. 233-55, Feb. 1977.

BROWNE, R. M. The odontogenic keratocyst: histological features and their correlation with clinical behavior. **Br Dent J**, v. 131, n. 6, p. 249-59, Sept. 1971.

BROWNE, R. M. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. **J Oral Pathol**, v. 4, n. 1, p. 31-46, July 1975.

CASAS, E. et al. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. **Cancer Res**, v. 71, n. 1, p. 245-54, Jan. 2011.

CHEN, Y. et al. A clinicopathologic study on calcifying epithelial odontogenic tumor: with special reference to Langerhans cell variant. **Diagn Pathol**, v. 9, p. 37. Feb. 2014.

CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res**, v. 66, n. 17, p. 8319-26, Sept. 2006.

COBALEDA, C. et al. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. **Annu Rev Genet**, v. 41, p. 41–61, 2007.

COX, D. P. p53 expression and mutation analysis of odontogenic cysts with and without dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 1, p. 90-8, Jan. 2012.

DE FREITAS SILVA, B. S. et al. E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 2, p. 125-31, Feb. 2014.

DENNIS, M. et al. Snail controls the mesenchymal phenotype and drives erlotinib resistance in oral epithelial and head and neck squamous cell carcinoma cells. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 147, n. 4, p. 726-32, Oct. 2012.

DE PAULA, A. M. et al. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. **J Oral Pathol Med**, v. 29, n. 10, p. 477-82, Nov. 2000.

DERYCKE, L. D. M.; BRACKE, M. E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signaling. **Int J Dev Biol**, v. 48, n. 5-6, p. 463-76, 2004.

DIAMOND, M. E. et al. Differential growth factor regulation of N-cadherin expression and motility in normal and malignant oral epithelium. **J Cell Sci**, v. 121(Pt 3), p. 2197-207, July 2008.

DI DOMENICO, M. et al. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v. 31, n. 12, p. 4211-8, Dec. 2011.

DING, L. et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 5, p. 335-43, May 2014.

DOMÍNGUEZ, D. et al. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 14, p. 5078-89, July 2003.

DOST, F. et al. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 117, n. 3, p. 343-52, Mar. 2014.

DUPREY, P.; PAULIN, D. What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. **Int J Dev Biol**, v. 39, n. 3, p. 443-57, June 1995.

EL MURTADI, A. E. et al. Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 81, n. 2, p. 217-20, Feb. 1996.

FALAKI, F. et al. Squamous cell carcinoma arising from an odontogenic keratocyst: a case report. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 4, E171-4, Apr. 2009.

FAN, F. et al. Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. **Cancer Med**, v. 1, n. 1, p. 5-16, Aug. 2012.

FAN, C. C. et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 10, p. 1735-44, Oct. 2013.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. **J Cell Biol**, v. 17, p. 375–412, May 1963.

FENG, Y. et al. Expression of Twist in different subtype of ameloblastomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 4, p. 565-70, Oct. 2009.

FLORESCU, A. et al. Immunohistochemical expression of MMP-9, TIMP-2, E-cadherin and vimentin in ameloblastomas and their implication in the local aggressive behavior of these tumors. **Rom J Morphol Embryol**, v. 53, n. 4, p. 975-84, 2012.

FRANCI, C. et al. Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. **PLoS One**, v. 4, n. 5, e5595, 2009.

FRANZ, M. et al. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. **Histochem Cell Biol**, v. 131, n. 5, p. 651-60, May 2009.

FUCHS, B. C. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. **Cancer Res**, v. 68, n. 7, p. 2391–9, Apr. 2008.

GAITÁN-CEPEDA, L. A. et al. Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. **Oral Dis**, v. 16, n. 2, p. 185-7, Mar. 2010.

GASPAROTTO, D. et al. Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1165-75, Dec. 2011.

GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Odontogenic keratocyst: a benign cystic neoplasm? **Oral Oncol**, v. 43, n. 6, p. 619-20, July 2007.

GONZÁLEZ-ALVA, P. et al. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. **J Oral Sci**, v. 50, n. 2, p. 205-12, June 2008.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A. et al. Analysis of p53 protein by PAb240, Ki-67 expression and human papillomavirus DNA detection in different types of odontogenic keratocyst. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1A, p. 175-81, Jan.-Feb. 2006.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A. et al. E-cadherin in non-tumor epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for the development of multiple tumors. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 2, p. 157-63, Mar. 2013.

GRAVDAL, K. et al. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 23, p. 7003-11, Dec. 2007.

HABIBI, A. et al. Keratocystic odontogenic tumor: a 10-year retrospective study of 83 cases in na Iranian population. **J Oral Sci**, v. 49, n. 3, p. 229-35, Sept. 2007.

HAJRA, K. M.; CHEN, D. Y.; FEARON, E. R. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. **Cancer Res**, v. 62, n. 6, p. 1613-8, Mar. 2002.

HAKIM, S. G. et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules b-catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 3, p. 321-8, June 2011.

HALBLEIB, J. M.; NELSON, W.J. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. **Genes Dev**, v. 20, n. 23, p. 3199-214, Dec. 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan. 2000.

HOWELL, G. M. S.; GRANDIS, J.R. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 27, n. 8, p. 710–7, Aug. 2005.

HUBER, M. A.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 548–58, Oct. 2005.

HUBER, G. F. et al. Down regulation of E-Cadherin (ECAD) - a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **BMC Cancer**, v. 11, n. 217, p. 1-8, June 2011.

JING, W. et al. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 1, p. 20-5, Jan. 2007.

JOUPPILA-MÄTTÖ, A. et al. Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression. **BMC Cancer**, v. 11, p. 350, Aug. 2011.

KAJITA, M.; MCCLINIC, K. N.; WADE, P. A. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 17, p. 7559-66, Sept. 2004.

KANG, Y.; MASSAGUÉ, J. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 277-9, Aug. 2004.

KAPLAN, I. ; HIRSHBERG, A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 985-91, Nov. 2004.

KICHI, E. et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 5, p. 280-6, May 2005.

KIM, D. K. Comparative Ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without an impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. **Yonsei Med J**, v. 44, n. 5, p. 841-6, Oct. 2003.

- KIMI, K. et al. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 30, n. 7, p. 434-42, Aug. 2001.
- KOLÁR, Z. et al. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 2, p. 75–80, Feb. 2006.
- KONRADI, S. et al. Langerhans cell maturation is accompanied by induction of N-cadherin and the transcriptional regulators of epithelial-mesenchymal transition ZEB1/2. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 2, p. 553-60, Feb. 2014.
- KUDO, Y. et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5455-63, Aug. 2004.
- KUMAMOTO H. Molecular pathology of odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 2, p. 65-74, Feb. 2006.
- KUME, K. et al. The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 3, p. 889-94, Jan. 2013.
- KUSAFUKA, K. et al. CD56 expression is associated with neuroectodermal differentiation in ameloblastomas: an immunohistochemical evaluation in comparison with odontogenic cystic lesions. **Med Mol Morphol**, v. 44, n. 2, p. 79-85, June 2011.
- KYZAS, P. A. et al. Dysadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma: association with lymphangiogenesis and prognostic significance. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 2, p. 185-93, Feb. 2006.
- LANDSKRON, G. et al. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **J Immunol Res**. 2014. Epub ahead of print.
- LANG, S. H. et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. **Prostate**, v. 52, n. 4, p. 253–63, Sept. 2002.
- LECKBAND, D.; PRAKASAM, A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 259-87, 2006.
- LEE, J. M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J Cell Biol**, v. 172, n. 7, p. 973-81, Mar. 2006.
- LI, S.; GUAN, J. L.; CHIEN, S. Biochemistry and biomechanics of cell motility. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, p. 105–50, 2005.
- LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS) - associated lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 5, p. 221-6, 1995.

LIANG, X. EMT: new signals from the invasive front. **Oral Oncol**, v. 47, n. 8, p. 686-7, Aug. 2011.

LIU, L. K. et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Mod Pathol**, v. 23, n. 2, p. 213-24, Feb. 2010.

LOMBARDI, T.; HAUSER, C.; BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. **J Oral Pathol Med**, v. 22, n. 5, p. 193-202, May 1993. In: SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions--correlation with inflammatory cells and epithelial cells. **Oral Dis**, v. 7, n. 6, p. 336-43, Nov. 2001.

LO MUZIO, L. et al. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome. **J Dent Res**, v. 78, n. 7, p. 1345-53, July 1999.

LUO, H. Y.; LI, T. J. Odontogenic tumors: a study of 1309 cases in a Chinese population. **Oral Oncol**, v. 45, n. 8, p. 706-11, Aug. 2009.

LYONS, J. G. et al. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4525-30, June 2008.

MADRAS, J.; LAPOINTE, H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **J Can Dent Assoc**, v. 74, n. 2, p. 165-165h, Mar. 2008.

MAEDA, G. et al. Expression of SIP1 in oral squamous cell carcinomas: implications for E-cadherin expression and tumor progression. **Int J Oncol**, v. 27, n. 6, p. 1535-41, Dec. 2005.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, C. et al. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. **Dev Biol**, v. 265, n. 1, p. 207-18, Jan. 2004.

MELLO, L. A. et al. CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 42, n. 6, p. 454-61, July 2013.

MENDES, R. A.; CARVALHO, J. F.; VAN DER WAAL, I. Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features. **Oral Oncol**, v. 46, n. 4, p. 219-25, Apr. 2010.

MESQUITA, A. T. et al. Central granular cell odontogenic tumor: a histopathologic and immunohistochemical study. **Ann Diagn Pathol**, v. 13, n. 6, p. 405-12, Dec. 2009.

MIURA, N. et al. Clinicopathological significance of Sip1-associated epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer progression. **Anticancer Res**, v. 29, n. 10, p. 4099-106, Oct. 2009.

MOLINA-ORTIZ, P. et al. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36132, 2012.

MORENO-BUENO, G.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 6958-69, Nov. 2008.

MORGAN, T. A.; BURTON, C. C.; QIAN, F. A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, n. 5, p. 635-9, May 2005.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. **Cancer Sci**, v. 98, n. 10, p. 1512–20, Oct. 2007.

MYOUNG, H. et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 3, p. 328-33, Mar. 2001.

NAWSHAD, A. et al. Transforming growth factor- β signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. **Cells Tissues Organs**, v. 179, n. 1-2, p. 11–23, 2005.

NIETO, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 3, p. 155–66, Mar. 2002.

NIETO, M. A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 27, p. 347–76, Nov. 2011.

NIETO, M. A.; CANO, A. The epithelial-mesenchymal transition under control: Global programs to regulate epithelial plasticity. **Semin Cancer Biology**, v. 22, n. 5-6, p. 361-8, Oct. 2012.

NGUYEN, P. T. et al. N-cadherin expression is correlated with metastasis of spindle cell carcinoma of head and neck region. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 1, p. 77–82, Jan. 2011.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 28-32, Jan. 2005.

OKUI, G. et al. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 9, p. 2039-49, Sept. 2013.

OLMEDA, D. et al. Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. **Oncogene**, v. 27, n. 34, p. 4690–701, Aug. 2008.

PECTASIDES, E. et al. Markers of Epithelial to Mesenchymal Transition in Association with Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94273, Apr. 2014.

PEINADO, H. et al. Snail mediates E-cadherin repression by recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC 1)/HDAC2 complex. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 1, p. 306–19, Jan. 2004.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415–28, June 2007.

PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 48, n. 5-6, p. 365-75, 2004.

PHILIPSEN, H.P. Om Keratocyster (kolesteatomer) I kaeberne. *Tandlaegebladet*, v. 60, p. 963-80, 1956.

PHILIPSEN, H.P. Odontogenic tumors. In: BARNES, L. et al. **World health organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. cap. 6, p. 306-307.

PIATTELLI, A. et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. **Oral Oncol**, v. 34, n. 5, p. 408-12, Sept. 1998.

PINHEIRO, J. J. et al. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. **Histopathology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, July 2004.

PRASAD, C. P. et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast. **BMC Cancer**, v. 9, p. 325, Sept. 2009.

PRESS, S. Odontogenic tumors of the maxillary sinus. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 16, n. 1, p. 47–54, Feb. 2008.

RADISKY, D. C.; LABARGE, M. A. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 6, p. 511–2, June 2008.

ROSADO, P. et al. E-cadherin and β -catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 2, p. 149-56, Mar. 2013.

ROSENTHAL, E. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. **Head Neck**, v. 28, n. 7, p. 639-48, July 2006.

SAITO, D. et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin α 3 β 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. **J Biochem**, v. 153, n. 3, p. 303-15, Mar. 2013.

- SAITO, T. et al. Inflammatory cytokines induce a reduction in E-cadherin expression and morphological changes in MDCK cells. **Res Vet Sci**, v. 96, n. 2, p. 288-91, Apr. 2014.
- SAKAMOTO, K. et al. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 2, p. 612-9, Feb. 2012.
- SANTOS, J. N. et al. Altered expression of cytokeratins in primary, recurrent and syndrome keratocystic odontogenic tumors. **J Mol Hist**, v. 40, n. 4, p. 269–75, Aug. 2009.
- SANTOS, L. C. et al. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts. **J Mol Histol**, v. 38, n. 3, p. 201-5, June 2007.
- SARAÇOĞLU, U. et al. MIB-1 expression in odontogenic epithelial rests, epithelium of healthy oral mucosa and epithelium of selected odontogenic cysts. An immunohistochemical study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 4, p. 432–5, June 2005.
- SEIKI, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. **Cancer Lett**, v. 194, n. 1, p. 1–11, May 2003.
- SHARIFI-SISTANI, N. et al. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. **J Craniofac Surg**, v. 22, n. 5, p. 1652-6, Sept. 2011.
- SCHWOCK, J. et al. SNAI1 expression and the mesenchymal phenotype: an immunohistochemical study performed on 46 cases of oral squamous cell carcinoma. **BMC Clin Pathol**, v. 10, p. 1, Feb. 2010.
- SIAR, C. H.; NG, K. H. Differential expression of transcription factors Snail, Slug, SIP1, and Twist in ameloblastoma. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 1, p. 45-52, Jan. 2014.
- SILVEIRA, E. J. D. et al. Role of matrix metalloproteinases in the etiopathogeny of odontogenic cysts. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, p. 203-9, 2007.
- SINGH, H. P. Are All Odontogenic Keratocysts Keratocystic Odontogenic Tumors? Correlation between Imaging Features and Epithelial Cell Proliferation. **J Clin Imaging Sci**, v. 3, n. 3, Oct. 2012.
- SKAUG, N. Intracystic fluid pressure in non-keratinizing jaw cysts. **Int J Oral Surg**, v. 5, n. 2, p. 59–65, Apr. 1976.
- SLOOTWEG, P. J. P53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 9, p. 393–7, Oct. 1995.
- 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**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2012.

ST JOHN, M. A. et al. Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 19, p. 6018-27, Oct. 2009.

SUZUKI, T. et al. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions--correlation with inflammatory cells and epithelial cells. **Oral Dis**, v. 7, n. 6, p. 336-43, Nov. 2001.

TANG, Y. et al. Expression and importance of zinc-finger transcription factor Slug in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 10, p. 775-80, Nov. 2010.

TANIA, M.; KHAN, M. A.; FU, J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. **Tumour Biol**, July 2014. [Epub ahead of print]

TAWFIK, M. A.; ZYADA, M. M. Odontogenic tumors in Dakahlia, Egypt: analysis of 82 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 2, p. e67-73, Feb. 2010.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442-54, June 2002.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 740-6, Dec. 2003.

THIERY, J.P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov. 2009.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 131-42, Feb. 2006.

THOMPSON, L.; GOLDBLUM, J. **Head and neck pathology**; a volume in the series foundations in diagnostic pathology. Philadelphia: Elsevier, 2006.

THOSAPORN, W. et al. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. **Oral Dis**, v. 10, n. 1, p. 22-6, Jan. 2004.

THUAULT, S. et al. HMGA2 and Smads coregulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. **J Biol Chem**, v. 283, n. 48, p. 33437-46, Nov. 2008.

TITINCHI, F.; NORTJE, C. J. Keratocystic odontogenic tumor: a recurrence analysis of clinical and radiographic parameters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 1, p. 136-42, July 2012.

TRAN, D. D. et al. Temporal and spatial cooperation of Snail1 e Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 1644-57, Dec. 2011.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 4, p. 285–93, Apr. 2001.

VALCOURT, U. et al. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 4, p. 1987–2002, Apr. 2005.

VEGA, S. et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. **Genes Dev**, v. 18, n. 10, p. 1131-43, May 2004.

VICENTE, J. C. et al. Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 5, p. e709-15, Sept. 2010.

VILLAREJO, A. et al. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. **J Biol Chem**, v. 289, n. 2, p. 930-41, Jan. 2014.

WANG, C. et al. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 130, n. 10, p. 2249-58, May 2012.

WANG, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF- α requires AKT/GSK-3 β -mediated stabilization of snail in colorectal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56664, 2013.

WOOLGAR, J. A.; RIPPIN, J. W.; BROWNE, R. M. A comparative study of the clinical and histological features of recurrent and non-recurrent odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol**, v. 16, n. 3, p. 124-8, Mar. 1987.

WU, Y. C. et al. Langerhans cells in odontogenic epithelia of odontogenic fibromas. **J Formos Med Assoc**, v. 112, n. 12, p. 756-60, Dec. 2013.

WUSHOU, A. et al. Correlation of increased twist with lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 70, n. 6, p. 1473-9, June 2012.

YADAV, A. et al. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 1658-67, Dec. 2011.

YANG, T. L. et al. Significance of tumor satellite variables in reflecting the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer. **Oral Oncol**, v. 47, n. 8, p. 720-4, Aug. 2011.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis**, v. 28, n. 1-2, p. 15-33, June 2009.

YU, C. C.; CHANG, Y. C. Enhancement of cancer stem-like and epithelial-mesenchymal transdifferentiation property in oral epithelial cells with long-term

nicotine exposure: reversal by targeting SNAIL. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 266, n. 3, p. 459-69, Feb. 2013.

ZECHA, J. A. et al. Recurrence rate of keratocystic odontogenic tumor after conservative surgical treatment without adjunctive therapies – A 35-year single institution experience. **Oral Oncol**, v. 46, n. 10, p. 740-2, Oct. 2010.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1429-37, June 2009.

ZHAO, D. et al. Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor progression and metastasis. **Clin Exp Metastasis**, v. 29, n. 8, p. 957-69, Dec. 2012.

ZHAO, Y. F.; WEI, J. X.; WANG, S. P. Treatment of odontogenic keratocysts: a follow-up of 255 Chinese patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, n. 2, p. 151-6, Aug. 2002.

ZHANG, W. et al. E-cadherin loss promotes the initiation of squamous cell carcinoma invasion through modulation of integrin-mediated adhesion. **J Cell Sci**, v. 119, Pt 2, p. 283–91, Jan. 2006.

ZHANG, J. et al. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. **Oral Oncol**, v. 49, n. 11, p. 1043-50, Nov. 2013.

ZHOU, B. P. et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 931-40, Oct. 2004.

ZHU, L. F. et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. **Lab Invest**, v. 92, n. 5, p. 744-52, May 2012.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle)

Prezado Sr(a),

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Expressão proteica diferencial de reguladores de E-caderina em tumor odontogênico queratocístico

Pesquisador Responsável: Flávia Caló de Aquino Xavier

Telefone para contato: (71) 9905-3233 / 3283-9026

O objetivo é avaliar marcadores teciduais nos pacientes portadores de lesões tumorais. Trata-se de um estudo que utiliza material parafinado proveniente de biópsias resgatados dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFBA. Serão incluídos no estudo 30 pacientes portadores de tumores odontogênicos queratocísticos. Como grupo controle será necessário a obtenção de 20 casos de mucosa normal provenientes de cirurgias de extração de dentes inclusos, representando o fragmento de tecido morfológicamente sadio para análise comparativa. Sua participação como **grupo controle** será muito importante e voluntária. Você não terá nenhum gasto e também não receberá nenhum pagamento por participar desse estudo. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, visto que o fragmento de tecido necessário será proveniente do procedimento padrão de extração de dentes inclusos. As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação, quando da apresentação dos resultados em publicação científica ou educativa, uma vez que os resultados serão sempre apresentados como retrato de um grupo e não de uma pessoa. Você poderá se recusar a participar ou a responder algumas das questões a

qualquer momento, não havendo nenhum prejuízo pessoal se esta for a sua decisão.

• CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
 RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Expressão proteica diferencial de reguladores de E-caderina em tumor odontogênico queratocístico” como sujeito do grupo controle. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Flávia Caló de Aquino Xavier sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____, ____/____/____

Nome: _____

Assinatura do sujeito ou responsável:

Obrigado pela sua colaboração e por merecer sua confiança.

 Nome (em letra de forma) e Assinatura do pesquisador

 Data

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo de estudo)

Prezado Sr(a),

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Expressão proteica diferencial de reguladores de E-caderina em tumor odontogênico queratocístico

Pesquisador Responsável: Flávia Caló de Aquino Xavier

Telefone para contato : (71) 9905-3233 / 3283-9026

O objetivo é avaliar marcadores teciduais nos pacientes portadores de lesões tumorais. Trata-se de um estudo retrospectivo, utilizando material parafinado proveniente de biópsias resgatados dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFBA. Serão incluídos no estudo 30 pacientes portadores de tumores odontogênicos queratocísticos. Como grupo controle será necessário a obtenção de 20 casos de mucosa normal provenientes de cirurgias de extração de dentes inclusos, representando o fragmento de tecido morfolologicamente sadio para análise comparativa. Sua participação como **grupo de estudo** será muito importante e voluntária. Você não terá nenhum gasto e também não receberá nenhum pagamento para participar desse estudo. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa, visto que o exame tomográfico será importante para auxílio diagnóstico e planejamento terapêutico. As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação, quando da apresentação dos resultados em publicação científica ou educativa, uma vez que os resultados serão sempre apresentados como retrato de um grupo e não de uma pessoa. Você poderá

se recusar a participar ou a responder algumas das questões a qualquer momento, não havendo nenhum prejuízo pessoal se esta for a sua decisão.

• CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
 RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Expressão proteica diferencial de reguladores de E-caderina em tumor odontogênico queratocístico” como sujeito do grupo de estudo. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Flávia Caló de Aquino Xavier sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____, ____/____/____

Nome: _____

Assinatura do sujeito ou responsável:

Obrigado pela sua colaboração e por merecer sua confiança.

 Nome (em letra de forma) e Assinatura do pesquisador

 Data

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO PROTEICA DIFERENCIAL DE REGULADORES DE E-CADERINA EM TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO: RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E RADIOGRÁFICOS

Pesquisador: Flávia Caló de Aquino Xavier

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11709813.8.0000.5024

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 217.452

Data da Relatoria: 12/03/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é claro, objetivo e bem fundamentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com recomendações do CONEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo com as recomendações da Resolução 196.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Colegiado acompanha o parecer do Relator.

Endereço: Av. Araújo Pinho nº 62 - Sala dos Departamentos

Bairro: Canela

CEP: 40.110-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8969

Fax: (71)3283-8962

E-mail: rosana.regner@ufba.br