



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE EM
AMELOBLASTOMA E CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

Recife

2018

RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE EM
AMELOBLASTOMA E CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Oral.

Orientador: Prof^o. Dr. Gustavo Pina Godoy.

Coorientador: Prof^o. Dr. Mario Ribeiro Mello Junior.

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S725a Sousa, Rodrigo Csillaz de.
Análise histomorfométrica do microambiente em ameloblastoma e ceratocisto odontogênico / Rodrigo Csillaz de Sousa. – 2018.
105 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Gustavo Pina Godoy.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-graduação em Patologia. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Ameloblastoma. 2. Mastócitos. 3. Colágeno. 4. Ceratocisto odontogênico. I. Godoy, Gustavo Pina (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2018-259)

RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE EM
AMELOBLASTOMA E CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: 24/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Gustavo Pina Godoy (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Nicodemus Teles Pontes Filho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Veras Sobral (Examinadora Externa)

Universidade de Pernambuco

Prof^o. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka (Examinador Externo)

Universidade Estadual da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Gustavo Pina Godoy pela sabedoria e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À professora Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, pela atenção, disponibilidade e compreensão para a finalização do trabalho.

À Professora Doutora Polliana Muniz Alves pela atenção e disponibilidade.

Ao Professor e Co-orientador Mário Ribeiro Mello Junior pela empatia, atenção, por seus valiosos ensinamentos, sugestões e disponibilidade para dirimir dúvidas.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pela valiosa contribuição na execução desta pesquisa.

À Secretária da Pós Graduação em Patologia Margarete Valdevino, pela cordialidade no desempenho das suas funções laborais.

Aos meus pais e meus irmãos que participaram ativamente nesta minha jornada e graças a eles hoje cheguei até aqui.

Ao meu amigo Neil Farias pelos seus valiosos conselhos, amizade, apoio e compreensão nos momentos difíceis da vida em que passei, não necessariamente na elaboração deste trabalho, mas na vida mesmo.

À JESUS CRISTO, pois sem sua presença em nossas vidas, nada somos.

Ao meu companheiro Danilo José Duarte de Brito Braga, esta pessoa não tenho palavras para definir... Extremamente importante na minha vida! Aguentou minhas chatices ao longo do nosso tempo de convivência. Não foram poucas! Minha eterna gratidão e amor!

À minha amiga Ricella Maria, pelos puxões de orelha e empurrões para que eu concluísse a dissertação. Seu exemplo é fonte de inspiração e determinação pra mim. Companheira de viagens, confidente e colega de trabalho. Sua presença foi fundamental para essa jornada.

À minha amiga Carolina Kropniczki Gouveia e Catarina, sem palavras pra agradecer a presença tão querida dessas duas pessoas. Amigas de longas datas...

Aos meus animais de estimação, Juarez e Bibiana. Os animais têm muito a nos ensinar! Amor incondicional!

Não temas, porque eu sou contigo, não te assombres, porque eu sou teu Deus, eu te fortaleço e te ajudo, te sustento com a destra da minha justiça. (Isaías: 41.10)

Resumo

As lesões odontogênicas estão entre as lesões destrutivas mais frequentes dos maxilares, cuja patogênese e mecanismo de crescimento não são totalmente conhecidos. Recentemente, a presença de mastócitos e o remodelamento do colágeno foram reconhecidos na patogênese de lesões odontogênicas mais agressivas. Este estudo teve como objetivo avaliar de forma quantitativa, a presença da deposição de colágeno e os mastócitos em lesões odontogênicas. A amostra consistiu de 20 casos de ceratocisto odontogênico e 20 casos de ameloblastoma. Secções histológicas foram submetidas às técnicas histoquímicas utilizando Tricrômico de Masson e o Azul de Toluidina. Para a análise do colágeno intersticial e do número de mastócitos, cinco campos foram selecionados em cada caso, onde as imagens foram capturadas através do programa *Motic Image Plus 2.0* com ampliação final em 400x. Para comparar se havia diferença estatística significativa entre o número de mastócitos e a área percentual de colágeno das duas lesões, o teste de Mann-Whitney foi aplicado com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram diferenças na deposição de colágeno em ameloblastoma e em ceratocisto odontogênico. Em relação à deposição de colágeno, foi encontrada uma área percentual média de 17,28% \pm 10,29 nos ameloblastomas e de 21,48% \pm 13,11 nos ceratocistos odontogênicos ($p = 0,028$). Em relação aos mastócitos, os casos de ameloblastoma apresentaram uma contagem média de 1,50 \pm 1,34 células. Por outro lado, os casos de ceratocistos odontogênicos apresentaram score médio de 1,80 \pm 1,54 mastócitos ($p = 0,105$). Não foi observada correlação entre o aumento do número de células e o aumento da deposição de colágeno tanto nos casos de ameloblastomas quanto nos de ceratocisto odontogênico. É possível que diferenças no padrão do tecido conjuntivo possam influenciar a concentração real de mastócitos e vice-versa e que essas diferenças sejam responsáveis pelas variações observadas entre as duas lesões.

Palavras-chave: Ameloblastoma. Mastócitos. Colágeno. Ceratocisto Odontogênico.

Abstract

Odontogenic lesions are among the most frequent destructive lesions of jaws which their pathogenesis and growth mechanism are not cleared. Recently, the presence of mast cells and collagen remodeling have been recognized in the pathogenesis of more aggressive odontogenic lesions. This study aimed to evaluate the presence of collagen deposition and mast cells in odontogenic lesions. Sample consisted of 20 cases each of odontogenic keratocysts and ameloblastomas. Histologic sections were submitted to histochemistry using Masson's Thricrome and Toluidine Blue stain. For the analysis of interstitial collagen and mast cell numbers, five fields were selected in each case, where the images were captured through the Motic Image Plus 2.0 program with final magnification in 400x. To compare if there was a significant statistical difference between the number of mast cells and the percentage area of collagen between the two lesions, the Mann-Whitney test was applied with a significance level of 5%. The results obtained in this work demonstrate differences in the deposition of collagen in ameloblastoma and odontogenic keratocyst. In relation to collagen deposition, an average percentage area of 17.28 ± 10.29 in ameloblastomas and 21.48 ± 13.11 in odontogenic keratocysts was found ($p = 0.028$). In relation to mast cells, the cases of ameloblastoma had a mean count of 1.50 ± 1.34 cells. On the other hand, odontogenic keratocysts presented a mean score of 1.80 ± 1.54 mast cells ($p = 0.105$). No correlation was observed between the increase in cell numbers and the increase of collagen deposition in both ameloblastomas and odontogenic keratocysts. It is possible that differences in connective tissue pattern may influence the actual concentration of mast cells and vice versa and that these differences are responsible for the observed variations between the two lesions.

Keywords: Ameloblastoma. Mast Cell. Collagen. Odontogenic Keratocyst.

Lista de ilustrações

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Via de sinalização Sonic hedgehog (SHH). | 20 |
| Figura 2 - Mastócitos..... | 46 |
| Figura 3 - Esquema demonstrativo papel dos Mastócitos..... | 51 |
| Figura 4 - Comando Color Threshold (ImageJ 1.47).. | 58 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------|--|
| APC | Células apresentadoras de antígenos |
| AT | Azul de toluidina |
| BCL2 | Marcador antiapoptótico BCL2 |
| BMP2 | Proteína morfogenética óssea 2 |
| BRAF | Proto-oncogene B-RAF |
| CD | Cisto dentífero |
| CDH12 | Caderina 12 |
| CDH13 | Caderina 13 |
| CDKN1A | Inibidor de cinase A1 |
| CO | Ceratocisto odontogênico |
| COL81A | Colágeno tipo VIII alfa 1 |
| FOS | Proto-oncogene C-FOS |
| IGE | Imunoglobulina E |
| IL1 | Interleucina-1 |
| IL4 | Interleucina-4 |
| IL6 | Interleucina-6 |
| Ki67 | Marcador de proliferação celular antígeno Ki67 |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MC | Mastócito |
| MEC | Matriz extra-celular |
| MF | Miofibroblasto |
| MMP1 | Metaloproteinase da matriz 1 |
| MMP2 | Metaloproteinase da matriz 2 |
| MMP3 | Metaloproteinase da matriz 3 |

| | |
|--------------|--|
| MMP9 | Metaloproteinase da matriz 9 |
| MMP12 | Metaloproteinase da matriz 12 |
| MMP13 | Metaloproteinase da matriz 13 |
| OMS | Oganização Mundial de Saúde |
| OPG | Osteoprotegerina |
| PAR2 | Receptor de protease ativado 2 |
| PTCH | Gene supressor tumoral patch |
| PCNA | Proliferação de antígeno de célula nuclear |
| RANK | Receptor ativador do fator nuclear Kappa B |
| SCNB | Síndrome do carcinoma nevíde basocelular |
| SHH | Via Sonic Hedgehog |
| SMO | Proteína de membrana smoothed |
| TDGF1 | Fator de crescimento derivado do teratocarcinoma 1 |
| TGFB1 | Fator de crescimento transformante beta 1 |
| TNF α | Fator de crescimento tumoral alfa |
| TO | Tumor odontogênico |
| TOC | Tumor odontogênico ceratocístico |
| TM | Tricrômico de masson |
| VEGF | Fator de crescimento do endotélio vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 | Ameloblastoma | 17 |
| 2.2 | Ceratocisto Odontogênico | 26 |
| 2.3 | Colágeno | 32 |
| 2.4 | Mastócitos | 43 |
| 3 | OBJETIVOS | 53 |
| 3.1 | Objetivo geral | 53 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 53 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 4.1 | Aspectos éticos | 54 |
| 4.2 | Tipo de estudo | 54 |
| 4.3 | Grupo de estudo | 54 |
| 4.3.1 | Método de coleta | 55 |
| 4.3.2 | Análise histomorfométrica | 56 |
| 4.3.3 | Análise estatística | 59 |
| 5 | RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL | 60 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |
| | ANEXO A – DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA E AUTORIZAÇÃO DO USO DE DADOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA (UEPB) | 98 |
| | ANEXO B – Declaração de Anuência e autorização do uso de dados Universidade Federal do Rio Grande do Norte | 99 |
| | ANEXO C – Parecer do comitê de ética | 101 |

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos dentes ocorre como resultado do arranjo das interações epitélio-mesenquimais. Além da formação dos dentes, as interações entre os tecidos do aparato odontogênico podem levar ao desenvolvimento de diversos cistos e tumores odontogênicos (TOs), abrangendo um amplo espectro de lesões que variam de cistos de desenvolvimento a neoplasias malignas. Alguns destes cistos e tumores exibem um curso agressivo resultando na destruição de estruturas adjacentes e tecidos mais profundos (RAJ et al., 2015).

Os Tumores Odontogênicos (TOs) constituem lesões de frequência relativamente comum dentre as neoplasias encontradas nos ossos gnáticos, com histogênese associada a remanescentes epiteliais, mesenquimais e mistos relacionados à odontogênese. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define os TOs e as lesões semelhantes a tumores como um grupo de doenças heterogêneas que variam desde proliferação hamartomatosa benigna não neoplásica a crescimentos neoplásicos benignos e malignos (EL NAGGAR et al., 2017).

Os cistos são definidos como uma cavidade patológica revestida por epitélio. Com raras exceções, cistos revestidos por epitélio nos ossos do corpo são observados somente nos ossos gnáticos. A maioria dos cistos dos ossos gnáticos são revestidos por epitélio derivado de epitélio odontogênico, logo, são denominados cistos odontogênicos. De acordo com sua origem são subclassificados em cistos de desenvolvimento ou inflamatórios (NEVILLE et al., 2016).

O epitélio dessas lesões foi investigado extensivamente em relação ao seu papel na proliferação e comportamento agressivo das lesões. Entretanto, há poucos estudos que relacionam o papel do tecido conjuntivo de suporte, especialmente do

colágeno, presente na Matriz Extracelular (MEC) dessas lesões (NAYAK et al., 2011; SINGH et al., 2012; SHETTY et al., 2015).

A MEC serve como arcabouço das células, exerce influência sobre o comportamento celular, afeta o crescimento, a diferenciação, a mobilidade e viabilidade celular. Esse microambiente pode ser alterado por condições patológicas e essas alterações ocorrem paralelamente à superexpressão de proteases que modificam sua composição (MARASTONI et al., 2008).

O tecido conjuntivo compreende essencialmente as células e a MEC que é composta por quatro famílias de proteínas intimamente associadas: colágenos, elastina, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (VISWANATHAN; VENKATAPATHY; DANASEKARAN, 2010).

Tem-se observado que o comportamento de cistos e TOs é dependente não somente do epitélio, mas também do tecido conjuntivo de suporte, e uma vez que as fibras colágenas são o maior componente do tecido conjuntivo em TOs, o estudo delas pode apresentar significância no entendimento do seu comportamento biológico (HANGELBROEK et al., 2012).

O colágeno representa aproximadamente um terço do conteúdo de proteína total do corpo e também é responsável por mais da metade do peso seco da pele, correspondendo à proteína predominante na MEC. As fibras colágenas desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade tecidual e também na determinação da função dos tecidos. Portanto alterações nessa proteína acarretam o desenvolvimento de diversas patologias. Alguns estudos têm demonstrado que alterações no tecido conjuntivo desempenham um papel

fundamental na patogênese de cistos e TOs (SHOULDERS, 2009; NAYAK et al., 2011; SINGH et al., 2012; SHETTY et al., 2015).

Os cistos odontogênicos são possivelmente as lesões benignas destrutivas mais comuns nos ossos gnáticos, sendo caracterizados por um crescimento expansivo não infiltrativo. O exato mecanismo de crescimento e expansão associados a essas lesões ainda não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que vários tipos de células, incluindo os mastócitos (MCs), podem participar desse fenômeno através da liberação de mediadores como a heparina e enzimas hidrolíticas que facilitam a desagregação dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos presentes na cápsula de tecido conjuntivo do cisto. (ANANDANI et al., 2017).

O desenvolvimento dos TOs é controlado pelo potencial proliferativo intrínseco das células tumorais e das circunstâncias do microambiente, como a inflamação no local do tumor, por exemplo (MALTBY, 2009). Os MCs são células imunes caracterizadas por pequeno núcleo e citoplasma granular. Quando ativadas, secretam substâncias biologicamente ativas que estão armazenadas em seus grânulos citoplasmáticos (por exemplo, triptase, histamina e heparina) ou são produzidas durante a ativação celular tais como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012; MARICHAL; TSAI; GALLI, 2013). Os MCs são conhecidos por sua participação nas reações de anafilaxia, reabsorção óssea e interação com outras células imunes (DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012).

Devido a poucos trabalhos na literatura investigando o papel do tecido conjuntivo, especialmente do colágeno, há ainda falta de compreensão de todos os

mecanismos envolvidos na patogênese e de seu papel no comportamento biológico dos cistos e TOs.

Nesse sentido, o presente estudo buscou identificar e quantificar a área de colágeno presente no ameloblastoma e no CO relacionando com a quantidade de MCs nessas duas lesões e diante dos resultados, traçar a significância clínica desse achado. Ainda não está claro como o tecido conjuntivo, o epitélio e as células inflamatórias, especialmente os MCs, relacionam-se no desenvolvimento das lesões odontogênicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ameloblastoma

O Ameloblastoma foi primeiramente descrito por Cusack, em 1827. Etimologicamente, o nome deriva da antiga palavra francesa “amel”, que significa esmalte e da palavra grega “blastos”, que significa germe ou broto. Ao longo do tempo, esse tumor foi referido por muitos nomes diferentes, incluindo cistosarcoma adamantino, epiteloma, adamantinoma e finalmente ameloblastoma (MCCLARY et al, 2016).

O ameloblastoma é um TO localmente agressivo que se origina do epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso (SCIUBA et al., 2013). Embora classificado como um tumor benigno, o ameloblastoma também é o TO mais comum de origem epitelial com implicações clínicas graves (BASSEY; OSUNDE; ANYANECHI, 2014).

Os fatores etiológicos associados ao ameloblastoma ainda não estão bem estabelecidos. Teorias mais antigas relacionaram o tumor a traumas, inflamações, deficiências nutricionais, exodontias dentárias e cáries. Outra teoria proposta foi a da morfodiferenciação dos pré-ameloblastos em ameloblastos na fase do sino. Os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento dentário, morfogênese e citodiferenciação foram associados ao desenvolvimento do ameloblastoma porque alguns deles estão alterados significativamente nos tecidos ameloblásticos (EFFIOM et al., 2017).

Uma análise de 34 genes diferentes dos tecidos de ameloblastoma demonstrou que 11 deles estavam superexpressos e 23 deles subexpressos em

relação ao germe dentário. Alguns dos genes superexpressos incluem o proto-oncogene de c-fos (*FOS*), o receptor do fator de necrose tumoral 1A (*TNFRSF1A*), o colágeno tipo VIII alfa 1 (*COL8A1*), o inibidor da cinase 1A (*CDKN1A*), a metaloproteinase da matriz 12 (elastase de macrófagos) (*MMP-12*) e metaloproteinase da matriz 13 (colagenase 3) (*MMP-13*). Os genes altamente subexpressos incluíram o sonic hedgehog (*SHH*), o fator 3 associado ao receptor de TNF (*TRAF3*), deletado no carcinoma colorretal, *ARHGAP4*, caderina 12 (*CDH12*), caderina 13 (*CDH13*), fator de crescimento derivado de teratocarcinoma 1 (*TDGF1*), fator de crescimento transformante beta 1 (*TGFB1*), patch (*PTCH*) e proteína morfogenética óssea 2 (*BMP2*) (EFFIOM et al., 2017).

A patogênese molecular do ameloblastoma é agora atribuída à desregulação da via de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), baseada em estudos usando tecidos de ameloblastoma, linhas celulares e camundongos transgênicos (BROWN E BETZ, 2015). Dentre os diversos marcadores imuno-histoquímicos, as moléculas envolvidas com as vias de sinalização celular tem sido demonstradas como principais ativadoras da proliferação celular desorganizada nesses tumores (KURPPA et al., 2014). Alguns trabalhos recentes tem demonstrado uma alta frequência da proteína mutada BRAF associadas aos ameloblastomas mandibulares. Essa mutação é denominada BRAF V600E e ocorre devido à substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico na posição 600 (HEIKINHEIMO; KURPPA; ELENIOUS, 2015; KURPPA et al., 2014). A mutação do gene *BRAF* é um evento precoce e crítico na etiopatogenia do ameloblastoma (BROWN E BETZ, 2015).

Os receptores da família tirosina/quinase, tais como fatores de crescimento epidérmico encontram-se expressos no epitélio odontogênico. A ativação desses receptores com seus ligantes ocorre no meio extracelular e uma vez ativados, esses receptores contribuem para ativação das vias intracelulares (SWEENEY et al., 2014).

A via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (RAS/MAPK) é ativada sequencialmente em cadeia e outras proteínas da via intracelular como a quinase específica para serina/treonina (RAF) e BRAF se tornam ativas (SWEENEY et al., 2014). A proteína BRAF é uma proteína da via intracelular derivada da RAF e promove a proliferação celular através de cascatas de fosforilação. Em condições fisiológicas normais, ocorre proliferação celular controlada, juntamente com as vias de apoptose. Em condições patológicas, ocorre proliferação celular descontrolada, inibição da apoptose e surgimento de neoplasias (SWEENEY et al., 2014).

A sinalização SHH/PTCH controla o destino das células, padronização e crescimento de numerosos tecidos, incluindo dentes (BITGOOD E MCMAHON, 1995), determinando seu crescimento e forma. O gene Patched-1 (*PTCH* ou *PTCH1*), que é mapeado no cromossomo 9q22.3-31 é considerado um gene supressor de tumor está envolvido na etiologia dos TOs (BARRETO et al, 2002). *PTCH1* codifica um receptor transmembrana para Sonic Hedgehog (SHH) e outras proteínas da via Hedgehog (HH). Normalmente, *PTCH1* reprime as funções do efetor de sinalização Smoothed (SMO) (HOOPER E SCOTT, 2005), formando um complexo na membrana da célula, que tem um efeito supressor da transdução do sinal de crescimento. Em casos de *PTCH* mutado, seu efeito inibitório sobre SMO é perdido, resultando em proliferação e estimulação celular. O ligante SHH ao interagir

com PTCH também interrompe esta inibição, permitindo a transdução do sinal e causando estes mesmos efeitos (MADRAS E LAPOINTE, 2008) (Figura 1).

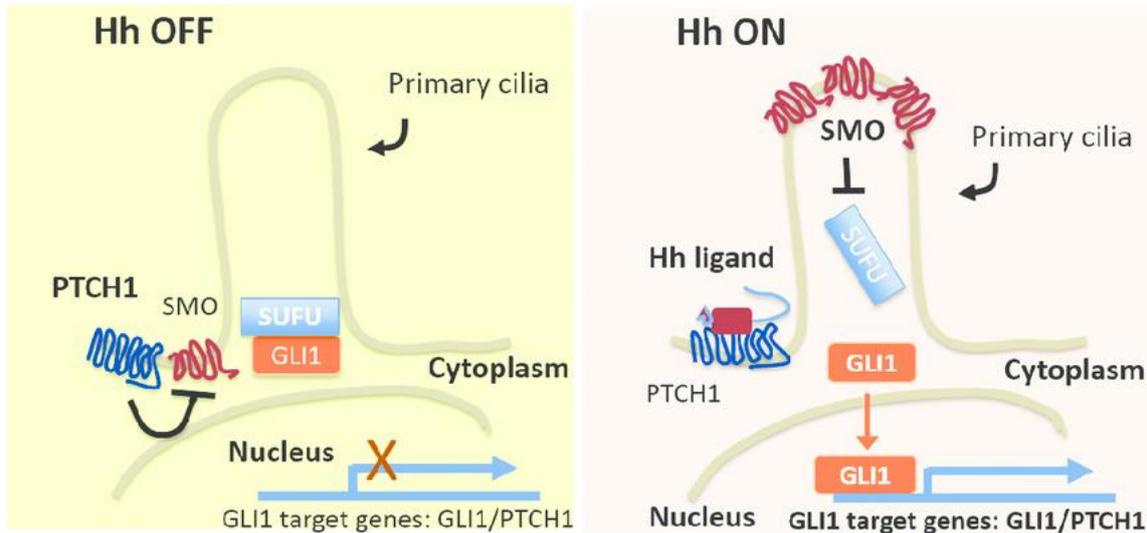


Figura 1: Esquema mostrando a via de sinalização Sonic hedgehog (SHH): na ausência do ligante Hedgehog, Smoothened (SMO) é sequestrada por Patch (PTCH1), receptor de membrana celular, não ocorrendo, portanto, sinalização intracelular. A ligação da proteína hedgehog ao receptor Patch (PTCH1) resulta na liberação e desinibição de SMO. A liberação de SMO ativa GLI1, que age na transcrição de diversos genes envolvidos na progressão tumoral. (TRIEU et al., 2016).

Com relação a via alterada, Sweeney et al (2014) demonstraram que a via MAPK e a mutação BRAF V600E está relacionada com ameloblastomas mandibulares. Já a via Hedgehog e as mutações da proteína pertencente a esta via, proteína SMO, está relacionada com ameloblastomas maxilares. Esse fato sugere que os ameloblastomas maxilares e mandibulares podem ter diferentes etiopatogenias.

De acordo com Kaye et al. (2014), a comprovação da mutação BRAF V600E abriu novas perspectivas para o tratamento do ameloblastoma. Em seu relato de caso foi demonstrado o uso de drogas específicas como o Dabrafenib e Trametinib

(inibidores da BRAF e MEK) em um paciente com ameloblastoma recorrente e metástase pulmonar que não era candidato à ressecção cirúrgica devido à extensão do tumor. Segundo os autores, houve uma resposta positiva sugerindo a possibilidade de terapias neoadjuvantes no manejo dos tumores.

No tocante a reabsorção óssea presente nestes tumores, é sabido que a remodelação óssea normal é regulada pelas interações do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) presentes em precursores de osteoclastos juntamente com o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Osteoblastos também secretam osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel que interage com RANKL para controlar as interações RANK-RANKL. Como RANK, RANKL e OPG são expressos em diferentes variantes de ameloblastoma, a desregulação da via de sinalização RANK-RANKL e os níveis alterados de OPG têm sido associados à reabsorção óssea nos ameloblastomas (STEFANIK et al., 2008).

O sistema de apoptose mediado por caspases é outra via que também pode estar implicada na etiopatogenia do ameloblastoma. Esse sistema apresenta-se regulado de forma desigual em diferentes variantes do ameloblastoma, levando a uma aberrante sobrevivência do tecido ameloblástico. A forte imunorreatividade de pAKT e PI3K em algumas variantes do ameloblastoma, especialmente o padrão histológico plexiforme, sugere que a via AKT / PI3K possa promover a proliferação de células ameloblásticas (JHAMB E KRAMER, 2014).

Outras vias moleculares que foram associadas com a patogênese, invasividade e recorrência do ameloblastoma incluem a via p53-MDM2 (KITKUMTHORN et al., 2010) e a via de sinalização de Notch (SIAR et al., 2010) como também marcadores moleculares syndecan-1 (CD138) (AL-OTAIBI et al.,

2013; SAFADI et al.,2016) e CD10 (ABDEL-AZIZ E AMIN, 2012). Alguns destes também foram considerados como marcadores de diagnóstico ou marcadores de prognóstico tumorais (JHAMB E KRAMER, 2014).

Frequentemente, o ameloblastoma é assintomático e descoberto como um achado ocasional em exame radiográfico de rotina ou pode se manifestar como um aumento de volume de crescimento lento e indolor. O tumor também pode levar ao deslocamento e a perda de dentes, parestesia, dor e expansão das corticais. Cerca de 80% de todos os ameloblastomas estão localizados na mandíbula, principalmente na região do terceiro molar; 20% dos ameloblastomas surgem na maxila, particularmente na região posterior (MENDENHALL et al., 2007).

O ameloblastoma constitui cerca de 14% de todos os tumores e cistos do maxilar e são os TOs mais prevalentes nos países em desenvolvimento (LASISI et al, 2013; OGinni et al, 2015). A incidência global de ameloblastoma é de 0,5 casos por milhão de pessoas por ano (BROWN E BETZ, 2015), e é um tumor odontogênico frequentemente encontrado na África e na China (BASSEY; OSUNDE; ANYANECHI, 2014). No hemisfério ocidental, o ameloblastoma é o segundo TO mais comum, sendo o primeiro o odontoma. A população afro-americana é cinco vezes mais propensa a desenvolver ameloblastoma em comparação com a população caucasiana (MCCLARY et al, 2016). A maioria dos pacientes com ameloblastoma tem entre 30 e 60 anos de idade, mas a idade média no momento do diagnóstico varia de um continente a outro, estimado em aproximadamente 42,3 e 30,4 anos na Europa e África, respectivamente (OLUSANYA et al, 2013; OOMENS E VAN DER WAAL , 2014). Apenas 10-15% dos casos de ameloblastoma ocorrem

na população pediátrica, mas isso pode chegar a 25% na África e na Ásia (BANSAL et al, 2015).

O ameloblastoma se assemelha histologicamente ao órgão do esmalte de um dente em desenvolvimento que não forma tecidos rígidos dentários porque o estroma não possui as propriedades do mesênquima dentário. Apesar das semelhanças, é intrigante que o ameloblastoma ainda exiba um padrão distintivo de crescimento clinicamente invasivo e agressivo (ANYANECHI E SAHEEB, 2014).

Em 2017, o ameloblastoma sofreu modificações na classificação baseado nos resultados de estudos genéticos atuais. O debate do ameloblastoma benigno versus maligno foi realizado. Reconhecendo sua agressividade local e propensão a recorrência, o ameloblastoma permaneceu benigno, apesar da incrível variante rara conhecida como ameloblastoma maligno. Atualmente, a classificação foi simplificada pela OMS e reduzida ao ameloblastoma, ameloblastoma unicístico, extra-ósseo / periféricos e ameloblastoma metastático. O termo sólido / multicístico foi descartado porque a maioria dos ameloblastomas convencionais apresenta degeneração cística sem diferenças biológicas. O ameloblastoma desmoplásico foi reclassificado como um subtipo histológico e não como uma lesão separada, pois o ameloblastoma apresenta diferentes tipos histológicos, incluindo o folicular, plexiforme, acantomatoso, células granulares, basalóide e desmoplásico (SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O folicular é o padrão de diagnóstico mais comum, apresentando ilhas de epitélio cujas áreas centrais apresentam células frouxas assemelhando-se ao retículo estrelado do esmalte. Nas áreas centrais pode ocorrer degeneração cística. As células basais dessas ilhas são colunares, hipercromáticas e alinhadas em

paliçada. Tipicamente, seus núcleos são deslocados para longe da membrana basal e seu citoplasma é geralmente vacuolizado (NEVILLE et al., 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O padrão histológico plexiforme apresenta-se como cordões anastomosados, esses cordões são delimitados por células colunares que circundam células angulares e frouxas. Basicamente, é bem semelhante ao padrão folicular, o que diferencia são as anastomoses das ilhas formando longos cordões (NEVILLE et al., 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O padrão acantomatoso pode ser definido como um ameloblastoma folicular que sofreu metaplasia escamosa, ou seja, suas células centrais transformaram-se em ceratinócitos, sendo comum encontrar presença de ceratina no interior das ilhas (NEVILLE et al., 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O padrão desmoplásico caracteriza-se pela presença de finos cordões com o estroma densamente colagenizado (NEVILLE et al., 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O padrão granular é caracterizado pela presença de células claras e de citoplasma granular eosinofílico, as células periféricas são semelhante aos ameloblastos (colunares altas) (NEVILLE et al., 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O padrão basalóide é o mais raro e assemelha-se com o carcinoma de células basais (NEVILLE et al, 2016; REGEZI, 2013; WOO, 2013; SOLUK-TEKKEPÝN; WRIGHT, 2017).

O ameloblastoma unicístico representa um ameloblastoma que se apresenta como um cisto e tem menor taxa de recorrência após remoção conservadora. Pode apresentar três padrões de proliferação: luminal, intraluminal e mural. Esses subtipos podem interferir diretamente no comportamento biológico, tratamento e prognóstico da lesão. Robinson e Martinez foram os primeiros a descrever o ameloblastoma unicístico em 1977 e constataram que essa variação possui um comportamento biológico pouco agressivo e responde de maneira favorável ao tratamento conservador. As lesões unicísticas apresentam aspectos radiográficos caracterizados por áreas radiolúcidas, uniloculares e com margens bem definidas, podendo ou não estar associado a um dente não irrompido, lembrando clinicamente um cisto dentífero ou CO (GALE; POLJAK; ZIDAR, 2017).

As opções de tratamento atuais para o ameloblastoma incluem tratamento conservador (enucleação ou curetagem) e ressecção. O primeiro está associado a altas taxas de recorrência, enquanto o último resulta em deformidade facial significativa e morbidade (MENDENHALL et al., 2007).

O tratamento cirúrgico ressectivo com margens de segurança é o de eleição, pois o ameloblastoma apresenta agressividade local, crescimento infiltrativo e altas taxas de recidiva. Baseados nessas características clínicas e na morbidade causada por essa modalidade terapêutica, estudos de biologia molecular e com marcadores tumorais têm sido desenvolvidos para estabelecer o prognóstico tumoral e verificar respostas diante de terapias-alvo (KURPPA et al., 2014).

2.2 Ceratocisto Odontogênico

O Ceratocisto Odontogênico (CO) é uma lesão cística de natureza odontogênica. O termo “ceratocisto odontogênico” foi descrito pela primeira vez por Philisen em 1956 (ERYILMAZ et al., 2009) e suas características clínicas foram descritas pela primeira vez por Pindborg e Hansen em 1963 (PINDBORG E HANSEN, 1963). Ao longo dos anos, muitos pesquisadores têm tentado entender sua natureza, identificá-lo, classificá-lo e manejá-lo e em decorrência dos dados obtidos nas pesquisas, essa lesão foi classificada e reclassificada diversas vezes.

O CO é um cisto de desenvolvimento odontogênico controverso que sofreu mudanças conceituais e terminológicas nas últimas décadas (SHEAR, 2004; GOMES et al., 2007; WRIGHT et al., 2014; POGREL, 2015). O nome "ceratocisto" surgiu na década de 1950 para descrever qualquer cisto que exibisse ceratinização e foi recomendado como terminologia oficial para um tipo específico de cisto odontogênico nas classificações da OMS de 1971 e 1992. Havia dois subtipos histopatológicos de CO o subtipo paraqueratinizado e o ortoqueratinizado (PINDBORG, 1971; KRAMER et al., 1992).

O CO é assim chamado porque a ceratina é produzida pelo revestimento cístico. É um tipo de cisto intra-ósseo revestido com paraceratina. Corresponde a um cisto odontogênico de desenvolvimento que deriva da lâmina dentária, contendo em seu interior fluido límpido e um material caseoso que se assemelha a detritos de ceratina. Vale ressaltar que o CO é mais comumente encontrado em sua forma intra-óssea, mas a contraparte periférica foi relatada na região gengival bucal na altura dos caninos da mandíbula. Os COs periféricos têm predominância no sexo feminino (SHARIF et al., 2015; WENIG, 2015; DINIZ et al., 2018).

O CO é um diagnóstico clinicamente significativo devido ao seu comportamento destrutivo local e as taxas de recorrência variando até 62% (MAURETTE et al., 2006). Enquanto a maioria dos COs são esporádicos, em pacientes com a doença genética hereditária conhecida como Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular (SCNB) são observados múltiplos COs. Também conhecida como síndrome de Gorlin-Goltz, esta síndrome autossômica dominante rara caracteriza-se por múltiplos COs e associado a outras características clínicas, incluindo costelas bífidas, hipertelorismo, bossas frontais e múltiplos carcinomas basocelulares da pele (FIGUEIRA et al., 2018).

O CO geralmente é relatado em região posterior de mandíbula e está associado com dentes não irrompidos e/ou impactados. Quando classificados como um cisto odontogênico, os COs representam aproximadamente 7.8% de todos os cistos dos maxilares e sua incidência varia de 4% a 16.5%. Essa lesão ocorre em todas as idades, apresentando um pico de incidência entre a segunda e a quarta década de vida. Há predominância na população branca masculina, apresentando uma razão masculino/feminino de 1,6/1. Quanto à localização, o CO é encontrado com mais frequência na mandíbula, duas vezes mais quando comparado com a maxila, principalmente em região de ângulo e ramo (69% a 83% dos casos). Os cistos mandibulares podem atravessar a linha média e os maxilares podem acometer o espaço antral, assoalho de cavidade nasal e região dos terceiros molares. Uma localização incomum relatada pela literatura do CO é a articulação temporomandibular (ERYILMAZ et al., 2009).

O CO é geralmente descoberto em radiografias de rotina, com exceção das lesões extensas. Nos casos de lesões extensas, pode observar-se tumefação, dor

associada, aumento de volume, parestesia e mobilidade de dentes envolvidos pela lesão (MALLMANN et al., 2012).

Os pacientes geralmente apresentam massas lentamente expansivas e indolores dos maxilares que são frequentemente associadas a dentes não erupcionados e/ou impactados. Geralmente é uma lesão assintomática e na maioria dos casos não causa expansão da cortical óssea ou aumento de volume (BHARKAVA; DESHPANDE; POGREL, 2012). Apresenta-se como uma lesão encapsulada com um conteúdo fluído ou semissólido de coloração branco-amarelada, em seu interior.

Radiograficamente, a sua apresentação é variável. Apresenta-se como imagem radiolúcida unilocular ou multilocular, podendo ou não estar associada a dentes, porém raramente causa reabsorções dentárias. Essas são características imagiológicas comuns também a outras lesões odontogênicas, variando desde cistos dentígeros, radiculares e periodontais laterais até lesões tumorais como ameloblastomas. Por isso, o diagnóstico do CO ainda depende do exame histopatológico (LI, 2011). Os COs têm o potencial de se infectar secundariamente e tendem a ser mais destrutivos localmente devido à infecção secundária e à natureza estrutural do osso maxilar. A transformação maligna do revestimento de CO é extremamente rara (PHILIPSEN, 2005).

A cavidade cística é revestida por epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado com 5 a 10 camadas de células. As células da camada basal são colunares ou cúbicas, dispostas em paliçada e, muitas vezes, hipercromáticas. O epitélio se mostra fracamente aderido por uma fina e plana membrana basal a uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, friável, bem vascularizada e geralmente livre de

infiltrado inflamatório que pode conter microcistos. Restos epiteliais e cistos satélites podem ser encontrados na cápsula, essa característica associada à delgacidade e friabilidade da cápsula e do revestimento epitelial são alguns dos fatores responsáveis pelas altas taxas de recidiva do CO. A cavidade cística contém um líquido claro, semelhante ao exsudato do plasma, podendo estar preenchida com um material caseoso que consiste em restos de ceratina (DA CONCEIÇÃO et al., 2012).

Outras evidências histológicas e imuno-histoquímicas encontradas são o alto índice mitótico, hiperosmolalidade intraluminal, atividade colagenolítica na cápsula fibrosa, síntese de IL-1 e IL-6 por ceratinócitos, aumento da expressão da proteína relacionada ao hormônio da paratireóide e a maior expressão do PCNA (KAPLAN et al., 2004; KOLOKYTHAS et al., 2007).

O CO apresenta simultaneamente características clinicopatológicas de lesão cística e de neoplasia benigna (SHEAR, 2002). O comportamento e as características moleculares desta lesão, tais como, comportamento agressivo, altas taxas de recidiva, características histológicas distintas e alterações moleculares e genéticas ausentes em outras lesões odontogênicas sugerem um potencial verdadeiramente neoplásico e esse fato levou a OMS, em 2005, a alterar sua classificação para tumor odontogênico benigno intraósseo de comportamento potencialmente agressivo e infiltrativo (BARNES et al., 2005; HENLEY et al., 2005).

Nos anos seguintes, houve muita discussão sobre a necessidade de distinguir os dois subtipos histopatológicos de CO, uma vez que o paraceratinizado apresentou maior taxa de recorrência e uma eventual associação com a SCNB. Esta evidência resultou na separação desses subtipos em duas doenças distintas e no abandono do termo "CO" pela OMS em 2005. O subtipo paraceratinizado tornou-se

o "tumor odontogênico ceratocístico" (TOC), que integrou o grupo de tumores epiteliais odontogênicos em sua classificação, enquanto o subtipo ortoceratinizado continuou no grupo de cistos de desenvolvimento odontogênico como "cisto odontogênico ortoceratinizado" (BARNES et al., 2005).

A OMS, em 2017, voltou a classificar o TOC como cisto de desenvolvimento odontogênico, retomando a terminologia original "CO". Na classificação atual, o CO permanece distinto do cisto odontogênico ortoceratinizado e mantém os critérios histopatológicos estabelecidos em 2005: um revestimento epitelial paraceratinizado de cinco a oito camadas de células, podendo apresentar áreas de metaplasia escamosa quando há inflamação na cápsula (EL NAGGAR et al., 2017).

A classificação de 2005 da OMS levou em consideração o comportamento agressivo da lesão e o fato que uma proporção delas está associada com a mutação ou inativação do gene *PTCH1*, considerado como um fator chave que suporta a redesignação da lesão como TOC. Embora as alterações de *PTCH* sejam observadas em até 80% de TOCs, elas não são específicas, uma vez que a perda de heterozigose na região 9q22.3 (onde o gene *PTCH1* foi mapeado) foi encontrada em outros cistos de desenvolvimento incluindo cisto dentígeno. A marsupialização foi relatada como um tratamento eficaz para o CO e pode estar associada à reversão do epitélio ao padrão normal, e com baixas taxas de recorrência que normalmente não estão associadas à neoplasia. Ao considerar todos os dados disponíveis, o grupo de consenso da OMS concluiu que pesquisas adicionais são necessárias, mas, no presente momento, não houve evidências suficientes para sustentar uma origem neoplásica do CO. Foi decidido, portanto, que o CO continua sendo o nome mais apropriado para esta lesão, e o TOC foi removido da classificação (SPEIGHT et al., 2017).

O tratamento de COs continua controverso. Os desafios estão na minimização do risco de recorrência e da morbidade cirúrgica. Numerosas modalidades, que vão desde a descompressão isoladamente, até a enucleação simples com ou sem curetagem, até a ressecção, foram utilizadas no gerenciamento de COs (MADRAS, 2008). Os pesquisadores tentaram investigar os resultados desses procedimentos de forma sistemática. No entanto, a integração de dados em estudos individuais revelou muitas inconsistências para estabelecer conclusões definitivas.

A enucleação, com ou sem curetagem, consiste na remoção da lesão intacta e não há comprometimento das estruturas adjacentes (VOORSMIT, 1985). Ela é indicada para lesões de até três centímetros de diâmetro. Por ser difícil a remoção da lesão inteira, a curetagem é feita para raspar a parede do cisto, de forma a remover o conteúdo do mesmo (MEISELMAN, 1994). Pode ser radical, com a retirada de todo cisto juntamente com qualquer mucosa adjacente, com curetagem para redução do osso circundante e sem a utilização de medidas adjuvante ou convencional, já descrita anteriormente (IRVINE; BOWERMAN, 1985).

A solução de Carnoy é um fixador de tecidos, que desde a década de 80, é usado no tratamento de lesões ósseas. Sua composição é 3mL de clorofórmio, 6mL de álcool absoluto, 1mL de ácido glacial acético e 1g de clorito férrico. Foi proposto, originalmente que fosse utilizada na cavidade do cisto antes da Eucleação, mas é geralmente usada após. É aplicada na cavidade óssea com o intuito de eliminar os remanescentes teciduais do CO, promovendo uma necrose química superficial (RIBEIRO JUNIOR et al., 2007).

A marsupialização é indicada para cistos extensos e consiste em estabelecer cirurgicamente uma comunicação entre a cavidade patológica e o meio bucal, eliminando a pressão hidrostática no interior do cisto, o que causa uma redução progressiva da lesão. A crioterapia com nitrogênio líquido possui o princípio básico que consiste na agressão de lesões de pele, mucosas e ossos através do congelamento intenso da área afetada, seguido por período de reaquecimento e repetição do congelamento (FERNANDES; ETGES; TORRIANI, 2010).

O tratamento conservador, e mais indicado, do CO é enucleação com ou sem curetagem e marsupialização, pois possui a vantagem de preservar as estruturas anatômicas incluindo os dentes. O tratamento agressivo inclui osteotomia periférica, curetagem com uso da solução de Carnoy e/ou ressecção em bloco.

2.3 Colágeno

As fibras colágenas são produzidas predominantemente por fibroblastos tendo seu processo de formação complexo. As cadeias polipeptídicas de colágeno são sintetizadas em ribossomos e enviadas para o retículo endoplasmático, momento em que são denominadas cadeias pró-alfa. Cada uma dessas cadeias se combina com outras duas, enrolando-se, e forma uma molécula helicoidal de fita tripla, chamada pró-colágeno. Quando enviadas ao meio extracelular, peptídeos são removidos das moléculas de pró-colágeno convertendo-se em moléculas de colágeno. No meio extracelular, também, essas moléculas de colágeno agrupam-se em polímeros, originando fibrilas que irão se associar em feixes maiores: as fibras de colágeno (ALBERTS et al., 2002; RUBIN et al., 2006).

Os fibroblastos representam o principal componente celular do tecido conjuntivo e são eles os responsáveis pela síntese de sua matriz tecidual. Quando

desenvolve-se um quadro patológico, diversas alterações ocorrem no tecido conjuntivo. (MANGIA et al., 2011; OTRANTO et al., 2012).

O tecido conjuntivo é fundamental para a manutenção das funções e integridade dos tecidos epiteliais formando um ambiente em que existe uma contínua interação molecular. Alterações neste microambiente, induzidas por citocinas, podem contribuir para a invasão tumoral e o desenvolvimento das lesões. Sugere-se que fatores de crescimento que participam na cicatrização tecidual possam desempenhar um papel na mudança do microambiente do estroma, favorecendo o desenvolvimento tumoral (VERED et al., 2005).

É sabido que no microambiente estromal de alguns cânceres, a exemplo do carcinoma da mama, os fibroblastos adquirem um fenótipo modificado, semelhantes aos associados com a cicatrização tecidual (MANGIA et al., 2011). Em tumores sólidos, a presença deste tipo de fibroblastos está associada ao aumento da deposição de estroma colagenoso denso (MANGIA et al., 2011; OTRANTO et al., 2012).

Um estudo sobre fibrose cardíaca demonstrou que a triptase liberada dos MCs ativa o receptor de protease ativado (PAR-2) nos fibroblastos cardíacos. Esta ativação está associada à conversão dos fibroblastos quiescentes aos MFs hipersecretores, e geralmente é acompanhada pelo aparecimento de fibrose no coração hipertenso. Essa via exerce papel crucial nas doenças inflamatórias de diversos tecidos, como pele, intestino e vias aéreas (DIXON E CUNNINGTON, 2011; KETABCHI et al., 2007).

Os fibroblastos com fenótipo modificado são denominados MFs e são caracterizados morfológicamente por grandes células fusiformes com propriedades

fenotípicas de músculo liso (DESMOULIERE; GOYOT; GABBIANI, 2004; MANGIA et al., 2011).

Os MFs desempenham papel importante no microambiente do estroma tumoral e estão associados a processos como progressão neoplásica, angiogênese e metástase (MANGIA et al., 2011). Essas células atuam produzindo uma série de fatores que modulam o comportamento tumoral e endotelial e são capazes de degradar componentes da MEC através das metaloproteinases MMPs-2, 3 e 9 (DE WEVER et al., 2008), da uroquinase ativadora do plasminogênio (DESMOULIERE; GOYOT; GABBIANI, 2004) e da proteína ativadora de fibroblastos (CHEN et al., 2017). Produzem também, fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas remodeladoras da matriz dentro do microambiente do estroma (VONG; KALLURI, 2011).

Sabe-se que as interações teciduais ocorrem durante a odontogênese (fisiológica) e o processo da doença (patológico). Tecidos que contribuem para a odontogênese passam por etapas de diferenciação com o período de tempo. Assim, qualquer um dos tecidos que participam desse processo pode estar envolvido no desenvolvimento de uma miríade de patologias, seja na forma de cistos, hamartomas ou tumores, coletivamente referidos como cistos odontogênicos e TOs (WILSON et al., 2017).

A complexidade dos efeitos de indução no aparato odontogênico e o envolvimento dos tecidos ectodérmico e mesodérmico provavelmente são responsáveis por uma variedade de formas que as lesões odontogênicas apresentam (WILSON et al., 2017).

Uma sequência de interações indutivas entre o epitélio do órgão do esmalte e o tecido conjuntivo mesenquimal do saco dentário ocorre durante a odontogênese. As lesões odontogênicas representam uma gama de condições, cujas características provavelmente dependem do estágio de indução para a formação dos dentes, antes da proliferação neoplásica ou hamartomatosa. Além disso, tem sido sugerido que alterações indutivas podem permitir a progressão de um tipo de TO para outro (BECKER et al., 1992).

O estroma das lesões odontogênicas consiste de matriz fibrosa colagenosa com fibroblastos em proliferação, exibindo predominantemente fibras colágenas tipo I, III e tipo IV, juntamente com fibras de oxitalano, elastina e reticulina. Componente inflamatório é visto, se secundariamente infectado. As lesões também mostram boa vascularização. Juntamente com essas mudanças, evidências de alterações enameloideas, dentinóides, metaplásicas, alterações degenerativas (fibro-mixóide, hialinização), calcificações distróficas são observadas em muitas lesões como CO, cistos odontogênicos epiteliais calcificantes, tumor odontogênico adenomatoide, ameloblastoma e fibroma ameloblástico como resultado das interações epitélio-mesenquimais. Pode-se conjecturar a partir de vários estudos que as lesões odontogênicas mostram um grau variável de alterações indutivas no tecido conjuntivo e que o estroma desempenha um papel importante junto com o epitélio em exibir seu comportamento biológico desde a origem até sua progressão (SHAFER et al., 1983; HIRSHBERG et al., 1999).

No tocante às lesões císticas, acredita-se que o crescimento e a expansão dos cistos odontogênicos sejam resultado da pressão osmótica exercida pelos conteúdos císticos, mas estudos recentes têm se concentrado na importância das interações epitélio-mesenquimais. Tem sido sugerido que o tecido conjuntivo é

essencial para manter os tecidos epiteliais e ambos formam um ecossistema com interações moleculares contínuas. O tecido conjuntivo pode ser considerado como uma parte funcional do cisto e não apenas suporte estrutural (VIJ; RAO, 2011).

A expansão de vários cistos odontogênicos envolvem a degradação da matriz óssea e a ligação celular a vários componentes da MEC. Todos esses estudos chamam a atenção para as interações entre o epitélio e o tecido conjuntivo, que pode ser responsável pelo crescimento dos cistos. Alterações na capacidade de coloração do colágeno foram também observadas na fibrose submucosa oral, o que pode indicar as mudanças no nível bioquímico que, por sua vez, pode ser responsável pelas alterações do tecido conjuntivo que contribuem para as mudanças atípicas que muitas vezes ocorrem no epitélio suprajacente (VIJ; RAO, 2011).

O epitélio desempenha um papel importante na patogênese dessas lesões; O estroma provavelmente desempenha um papel igualmente importante na patogênese e no comportamento biológico. Evidências de proteínas características da MEC, presença de material enamelóide, dentinóide, granulo-filamentoso, substâncias eosinofílicas, cimento e calcificações e presença de osso distrófico apoiam e comprovam as interações epitélio-mesenquimais. Acredita-se também que as proteínas da MEC são componentes integrais do tecido conjuntivo estromal, que desempenha um papel importante nas características histomorfológicas e no comportamento biológico das lesões (HIRSHBERG et al., 1999).

Tem-se observado que o comportamento de cistos e TOs é dependente não somente do epitélio, mas também do tecido conjuntivo de suporte, e uma vez que as fibras colágenas são o maior componente do tecido conjuntivo destas lesões, o estudo delas pode apresentar significância no entendimento do seu comportamento

biológico (HANGELBROEK et al., 2012). O colágeno representa aproximadamente um terço do conteúdo de proteína total do corpo e também é responsável por mais da metade do peso seco da pele, correspondendo á proteína predominante na MEC. As fibras colágenas desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade tecidual e também na determinação da função dos tecidos, portanto alterações nessa proteína acarretam o aparecimento de diversas patologias. Alguns estudos têm demonstrado que alterações no tecido conjuntivo desempenham um papel fundamental na patogênese de cistos e TOs (SHOULDERS, 2009).

Durante o desenvolvimento de quadros patológicos, o colágeno pode mostrar variações na forma como as fibras individuais são organizadas em termos de diâmetro e perfil transversal. A formação de fibrilas de colágeno é complexa e depende de numerosas modificações secundárias ou pós-traducionais. Defeitos nestas modificações estão associados a várias doenças (EYDEN; TZAPHLIDOU, 2001).

Segundo Ross e Romrell (1995), as fibras colágenas têm aparência de estruturas ondeadas de largura variável e comprimento indeterminado. De forma contraditória, Rubin et al. (2006) descrevem que essas fibras têm tamanhos uniformes e exemplificam a sua organização macromolecular usando como modelo a córnea. Nessa estrutura, cerca de 10 a 20 camadas de fibras de colágeno são dispostas paralelamente umas às outras (ROSS e ROMRELL, 1995; RUBIN et al., 2006) numa arquitetura descrita como altamente organizada (REICHENBERGER et al., 2000). A densidade das fibras colágenas, em condições fisiológicas, se dá de duas formas distintas próximo à lâmina basal: junto às papilas do tecido epitelial, apresenta-se como uma camada de fibras colágenas finas e frouxamente arranjadas e, mais distante delas, dispõe-se na forma de uma camada de fibras colágenas que

se agrupam em espessos feixes paralelos (ARAÚJO E ARAÚJO, 1984; BERKOVITZ, HOLLAND e MOXHAM, 2004). É sabido que essas fibras são os principais componentes do tecido conjuntivo do folículo pericoronário, das cápsulas fibrosas do CO e do estroma tumoral do ameloblastoma (BROWNE, 1971; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997).

O colágeno é uma macromolécula de glicoproteína de formas e tamanhos variados, constituindo, quantitativamente, o principal componente do tecido conjuntivo e desempenhando um papel chave na arquitetura e integridade da MEC. A maioria dos tecidos do corpo humano é composta basicamente por fibras colágenas tipo I e III. O colágeno tipo I é o mais abundante e o mais encontrado, é responsável pela força tensora e possui elasticidade limitada. Já o colágeno tipo III é quem confere resistência para a distensibilidade do arcabouço estrutural, com limitada força tensora e tende a estar associado com o tipo I. Atualmente, diversas técnicas de colorações histológicas têm sido utilizadas com o intuito de diferenciar os tecidos e aprimorar o estudo destes, tanto em pesquisas científicas quanto em procedimentos para diagnóstico. A coloração histológica de Tricrômico de Masson proporciona visualizar e analisar quantitativamente as fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras, porém não permitindo a diferenciação entre os tipos I e III (SINGH et al., 2012).

O crescimento neoplásico requer um estroma funcional e a capacidade das células epiteliais de induzir a formação de tal estroma é de grande importância. O estroma do tecido conjuntivo desempenha a função de barreira, evitando assim a evasão do sistema imune do hospedeiro. Desempenha um importante papel no suprimento de nutrientes e também na remoção dos resíduos. Entretanto, a quantidade de estroma presente difere entre as lesões. O estroma é composto

principalmente por feixes de fibras de colágeno, que podem ser categorizados como fibras finas e grossas. Os colágenos tipo I e III são predominantes. O colágeno tipo I consiste em fibras grossas e maduras e o colágeno tipo III consiste em fibras finas e imaturas. Vários estudos comprovam que as lesões odontogênicas agressivas apresentam mais colágeno imaturo, o que pode ser atribuído à forma precursora de colágeno (procolágeno) (HIRSHBERG et al., 1999; MAHAJAN et al., 2013; RAJ et al., 2015).

Browne, em 1971, observou em seu estudo que as fibras colágenas que compunham as cápsulas do CO eram dispostas circunferencialmente em um arranjo menos denso do que em outros cistos odontogênicos, embora muitos COs avaliados pelo autor apresentassem fibras colágenas em um arranjo denso, relativamente livre de inflamação. Já, Ahlfors, Larsson e Sjögren (1984) referem dois tipos diferentes de densidade em COs: uma porção de colágeno em proximidade com o epitélio, arranjada frouxamente e outra, mais distante, disposta circunferencialmente de forma densa.

As fibras colágenas encontradas na parede do CO são estruturalmente desorganizadas. Esse padrão de arranjo solto e paralelo do colágeno observado no CO pode ser útil para facilitar a separação do revestimento epitelial da parede do tecido conjuntivo subjacente. O processo de colagenólise pode ser produzido por colagenase ou outra protease e é responsável pela separação do epitélio do CO de sua parede de suporte. Isso representa um problema para a enucleação e, portanto, contribui para a natureza recorrente e agressiva da lesão. Outras características importantes são a presença de cistos satélites e o potencial invasivo da lesão. O CO apresenta tecido conjuntivo frouxo, o que pode ser interpretado como patológico ou o pobre empacotamento de fibras colágenas como resultado do desenvolvimento de

processos inflamatórios. Pode-se especular que essa característica está associada a alterações induzidas pelo epitélio da lesão, promovendo degradação da MEC e crescimento infiltrativo. (HIRSCHBERG et al., 1999; MOURE et al., 2011).

O colágeno encontrado nessas lesões é fracamente compactado e pode ser composto por procolágenos e colágenos intermediários. Os colágenos desnaturados, fracamente compactados, são mais suscetíveis à degradação pela collagenase, assim como por outras proteinases, ao contrário do colágeno nativo, que possui estrutura helicoidal estável e é resistente à degradação. Essa característica pode sugerir uma natureza mais agressiva do CO em comparação com outros cistos odontogênicos como também explicar o mecanismo de expansão rápida da lesão e altas taxas de recidiva (HIRSCHEBERG et al., 1999).

O desenvolvimento dos TOs é controlado pelo potencial proliferativo intrínseco das células tumorais e das circunstâncias do microambiente, como a inflamação no local do tumor, por exemplo (MALTBY, 2009). As interações epitélio-mesenquimais desempenham um papel muito importante nos mecanismos homeostáticos dos tecidos adultos determinando o desenvolvimento do aparato odontogênico como também das patologias dele decorrentes. A MEC desempenha um papel fundamental no crescimento, regulação, diferenciação e organização dos tecidos (SHETTY et al., 2015).

Fatores relacionados aos componentes epiteliais e mesenquimais participam na regulação do crescimento de lesões císticas odontogênicas e tumores. A alteração na expressão de proteínas específicas da MEC, associada à presença exuberante de MMPs e a ausência de expressão de inibidores de metaloproteinases, pode influenciar o comportamento dessas lesões. No caso dos

tumores, esta situação contribui para o crescimento e maior agressividade da lesão (PINHEIRO et al., 2004).

Virchow já suspeitava que a inflamação e o câncer estão relacionados intimamente; naquele momento não havia ferramentas para confirmar esta visão, bem como a de Paget que inventou a teoria "sementes e solo", na qual as células (sementes) buscam um solo (microambiente) adequado. Somente na década de 1980, o conceito de microambiente tumoral foi introduzido. Desde então, com o avanço das pesquisas, vários aspectos das interações entre as lesões e seu ambiente foram elucidados. O microambiente tumoral inclui fibroblastos e MFs, MEC, vasos pré-existentes e recém- formados, bem como células inflamatórias (BARRETO et al., 2011).

Frente a condições patológicas, os componentes da MEC do tecido podem estar alterados. Processos inflamatórios e neoplásicos benignos são alguns dos exemplos dessas condições.

Na inflamação, o edema, fenômeno exsudativo associado à saída de plasma sanguíneo para o interstício, causa alteração morfológica do tecido pelo afastamento dos seus constituintes (BOGLIOLO, 1994; RUBIN et al., 2006). Além disso, os constituintes da MEC podem ser degradados quando da liberação de mediadores químicos de processos inflamatórios, uma vez que, ao exercerem fagocitose, os fagócitos liberam para o meio extracelular hidrolases ácidas e neutras - entre elas collagenases e elastases - que podem lesar fibras colágenas e elásticas, entre outros. Arquitetura alterada e disfunção do tecido podem ser resultantes também de processos de reparo incompletamente efetivos quando do processo inflamatório prolongado (BOGLIOLO, 1994).

Quando em neoplasias benignas, seu crescimento expansivo característico provoca compressão das estruturas adjacentes, que podem tornar-se hipotróficas. Assim, forma-se, com frequência, uma cápsula fibrosa em torno do tumor, que é constituída pela compressão do estroma próximo à lesão (BOGLIOLO, 1994; ROBBINS, KUMAR e COTRAN, 1994; BROOKS et al., 2002).

O ambiente tumoral é circundado por um infiltrado de células inflamatórias, como linfócitos, neutrófilos, macrófagos e MCs (RIBATTI et al., 2009). Tais células se comunicam através de uma complexa rede de vias de sinalização intracelulares, mediada por moléculas de superfície de adesão, citocinas e seus receptores (CRIVELLATO; RIBATTI, 2007; RIBATTI et al., 2009; MALTBY et al, 2009). As células inflamatórias estimulam a proliferação de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos, sendo um importante mecanismo para a progressão das lesões (ULLAH et al, 2013). Um estudo prévio demonstrou que os MCs estão relacionados ao desenvolvimento de TOs, sendo um importante componente de seu estroma (PEREIRA et al., 2012).

A função da inflamação pode ser extremamente complexa: além da óbvia reação imunológica contra as células cancerosas, os participantes de um processo inflamatório e reparador são realmente necessários para a progressão das lesões (ALLEN; LOUISE JONES, 2011; BIANCHI et al., 2011; WEINBERG, 2013). Embora se possa produzir uma imagem esboçada da função das células linfóides ou macrófagos, a compreensão de outros participantes é escassa ou inexistente. Uma dessas células esquecidas da interação parênquima-estromal é o MC.

O CO é conhecido por sua natureza agressiva e alta taxa de recorrência, especialmente em comparação com outros cistos odontogênicos. O ameloblastoma

é um TO epitelial benigno localmente agressivo, com um acentuado potencial de invasão, que resulta em múltiplas recorrências após enucleação e curetagem. Diante disso, um número crescente de estudos tem tentado identificar fatores epiteliais e mesenquimais que determinem o comportamento dessas doenças. Essas lesões surgem dos remanescentes da odontogênese, que é controlada pela interação entre os componentes epitelial e mesenquimal (HENRIQUES et al., 2011).

Como as lesões odontogênicas às vezes mimetizam os eventos relacionados à morfo-histodiferenciação necessária para o desenvolvimento dentário, acredita-se que durante a tumorigênese, as interações epitélio-mesenquimais também são determinantes para a evolução dessas lesões. Entretanto, segundo Silveira et al. (2007), muitos estudos têm investigado apenas os componentes epiteliais de cistos e TOs. O mecanismo de crescimento dos cistos odontogênicos, bem como o potencial invasivo e destrutivo de alguns TOs, pode ser influenciado pela secreção de MMPs, proteínas que podem ser produzidas pelo epitélio e pelas células mesenquimais (SILVEIRA et al., 2007).

2.4 Mastócitos

Os MCs são células importantes do sistema imunológico pertencentes da linhagem hematopoiética originando-se de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e amadurecem sob a influência do ligante c-kit e do fator de células-tronco (SCF) (HASSAN; ZANDER, 1996; KRYSTEL-WHITTEMORE et al., 2016).

Os MCs estão presentes em quase todos os tecidos, e muitas vezes próximos dos epitélios, fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Os MCs armazenam grânulos e após a ativação liberam um amplo espectro de mediadores biologicamente ativos que individualmente demonstraram ter efeitos positivos ou

negativos em várias células alvo. Os MCs podem ser ativados não só por IgE, antígenos específicos e superalérgenos, mas também por uma infinidade de estímulos imunológicos e não imunológicos (MARONE; GALLI; KITAMURA, 2002; GALLI; TSAI, 2012; BORRIELLO et al., 2014). Os MCs e seus mediadores têm sido classicamente associados a um papel prejudicial em distúrbios alérgicos, mas essas células podem aumentar a resistência aos venenos animais (SCHNEIDER et al., 2007).

MCs estão presentes em tecidos normais e patológicos. São células imunes caracterizadas por pequeno núcleo e citoplasma granular. Quando ativadas, secretam substâncias biologicamente ativas que estão armazenadas em seus grânulos citoplasmáticos (por exemplo, triptase, histamina e heparina) ou são produzidas durante a ativação celular tais como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012; MARICHAL; TSAI; GALLI, 2013). Os MCs são conhecidos por sua participação nas reações de anafilaxia, reabsorção óssea e interação com outras células imunes (DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012). Estudos in vitro demonstram que essas células influenciam muitos aspectos da biologia tumoral, a exemplo do crescimento tumoral, angiogênese induzida pelo tumor e remodelação tecidual (MOSHREF et al., 2010). No entanto, a contribuição definitiva dos MCs permanece controversa (MOSHREF et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Não está claro se essas células agem favorecendo ou inibindo o crescimento tumoral. Os MCs demonstraram desempenhar um papel importante na angiogênese por meio da produção de alguns fatores, por exemplo, triptase, VEGF, FGF, TNF, IL-8, histamina e heparina (MOSHREF et al., 2010; MOHTASHAM, 2010). A angiogênese tem um papel crítico em muitas condições patológicas como o desenvolvimento tumoral e as metástases. Por outro lado, os

MCs podem restringir o crescimento das lesões produzindo vários fatores, incluindo IL-1, IL-4, IL-6 e TNF (KUMAMOTO; OHKI; OOYA, 2002; MOHTASHAM, 2010).

Em condições normais, os MCs maduros não circulam na corrente sanguínea. No entanto, os progenitores de mastócitos migram para os tecidos e se diferenciam em MCs sob a influência do SCF e várias citocinas. Os MCs estão presentes em todo o corpo e desempenham papéis importantes na manutenção de muitas funções fisiológicas, bem como na fisiopatologia das doenças. Essas células têm uma distribuição generalizada nos tecidos e são encontrados predominantemente na interface entre o hospedeiro e o ambiente externo em locais de potencial entrada de agentes patogênicos ou contato com substâncias prejudiciais, como a pele, mucosa respiratória e trato gastrointestinal (METCALFE et al., 1997; GALLI; NAKAE; TSAI, 2005; METCALFE E BOYCE, 2006). Os MCs povoam o tecido conjuntivo, particularmente nas regiões subepiteliais e no tecido conjuntivo em torno de vasos sanguíneos, nervos, células musculares lisas, glândulas mucosas e folículos capilares (Fig. 2) (GALLI NAKAE; TSAI, 2005).

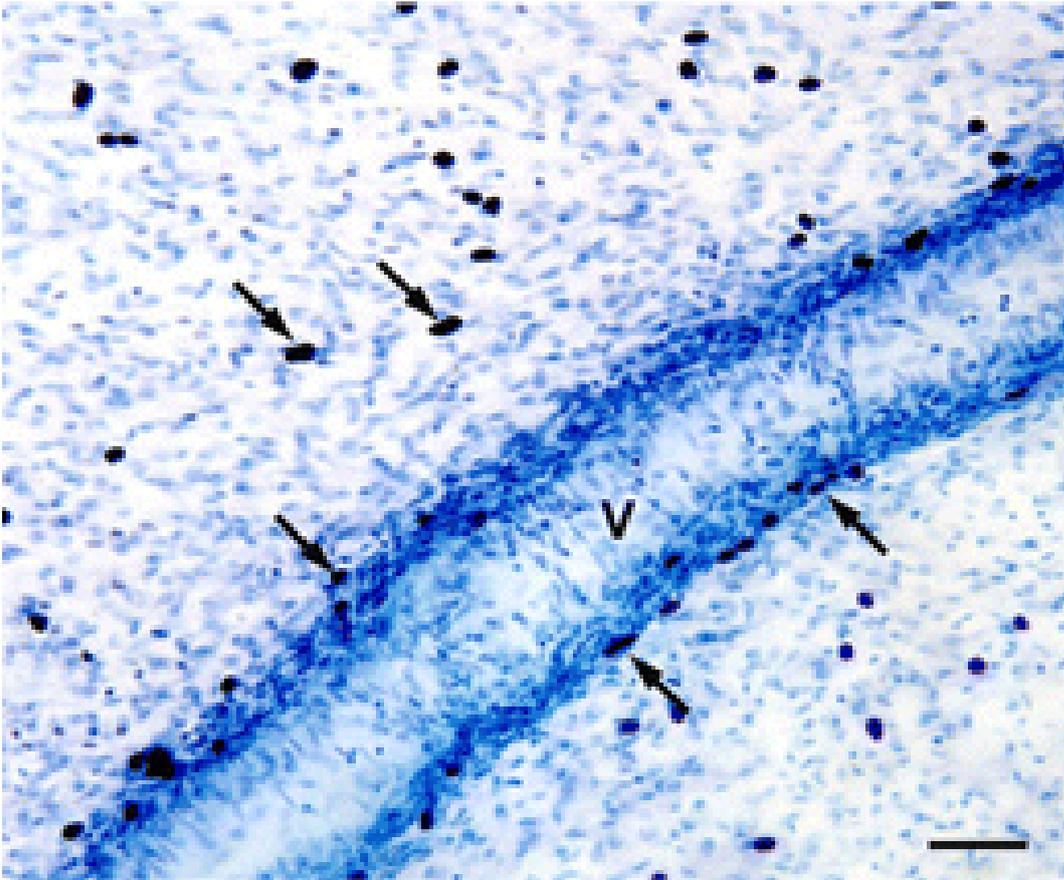


Figura 2: Os mastócitos (flechas) são vistos alinhados ao longo da parede de um vaso sanguíneo (V) do mesentério (Adaptado KRYSTEL-WHITTEMORE et al., 2016).

Os MCs são uma das células de defesa do sistema imunológico que contém grânulos citoplasmáticos metacromáticos (SEIFI et al., 2012). A degranulação de MCs desempenha um papel importante na iniciação da resposta inflamatória e é de grande importância na patogênese de diferentes doenças, como o líquen plano oral e as doenças periodontais (SHYLAJA, 2010). Além disso, os MCs são uma rica fonte de heparina e enzimas proteolíticas que participam da degradação do tecido conjuntivo (CHATTERJEE et al., 2008). Os MCs estimulam a produção de prostaglandinas que é considerada importante no processo de reabsorção óssea.

Com relação a vários papéis de MCs, como a participação na inflamação, a degradação da MEC e a reabsorção óssea, essas células podem desempenhar um papel na patogênese dos cistos dos maxilares e no seu mecanismo de crescimento.

Um estudo realizado por Teronen et al. (1996) constatou que os MCs estavam localizados em áreas de inflamação e logo abaixo do epitélio das lesões odontogênicas. Observaram também MCs na borda do osso, indicando alta atividade celular. Diante desses achados sugere-se que os MCs e suas enzimas podem contribuir significativamente para a remodelação tecidual durante o crescimento das lesões odontogênicas e para a destruição do osso circundante, levando a expansão da lesão.

MCs já foram encontrados em cistos e TOs, especialmente em cisto dentífero (CD) e CO. Os produtos de degranulação celular podem estar associados à destruição da MEC e estimulação da produção de citocinas, facilitando assim a expansão dessas lesões (CHATTERJEE et al., 2008).

A participação dos MCs nas lesões odontogênicas está parcialmente associada à inflamação. Essas células contribuem para o aumento cístico pela liberação de heparina e outras enzimas hidrolíticas, que facilitam a degradação dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos intraluminal aumentando assim a pressão osmótica e hidrostática. Os MCs liberam triptase e prostaglandinas, duas substâncias que participam na reabsorção óssea na interface cisto-osso, levando ao aumento cístico (CHATTERJEE et al., 2008).

Os MCs, no estágio maduro, contêm em seu interior uma grande quantidade de mediadores, como a histamina, citocinas e proteinases. Eles armazenam grandes quantidades de serinoprotease ativa pré-formadas, como a triptase e quimase, em seus grânulos secretores (METCALFE, BARAM, MEKORI, 1997; CAUGHEY, 2007; RIBATTIA et al., 2009; DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012).

Os Mcs participam na regulação das células e no controle do tecido conjuntivo. Vários estudos revelam que os MCs são células potencialmente fibrogênicas, através da liberação de potentes mediadores de fibrose (BERTON et al., 2000; GARBUZENKO et al., 2002).

A triptase secretada pelos MCs é um fator fibrogênico capaz de estimular a síntese de RNAm das fibras colágenas e quimiotaxia, onde o MC, mesmo em pouca quantidade, pode modular várias atividades dos fibroblastos localizados na matriz colagênica. Os principais efeitos incluem a proliferação celular, síntese de colágeno e de proteínas, produção e ativação de MMP-2 (BERTON et al., 2000).

Em estudos realizados, verificou-se que a triptase produzida pelos MCs estimula a atividade proliferativa dos fibroblastos conjuntivais em meio de cultura e este estímulo foi mediado pelo receptor para a triptase, o PAR2 (ASSANO-KATO, 2005).

O papel mais conhecido dos MCs é na reação alérgica (AKIN, 2014; WERNER-BUSSE et al, 2014), porém eles desempenham também a função de proteção, estando envolvidos no processo de cicatrização e na defesa contra organismos patogênicos (MANGIA et al., 2011; GALLI; BORREGAARD; WYNNI, 2011; AKIN, 2014; WERNER-BUSSE et al, 2014). Um dos papéis importantes dos MCs é regular a dinâmica do crescimento tumoral, interagindo com o seu microambiente, contribuindo para a progressão do tumor (PEREIRA et al., 2012; DE NORONHA SANTOS NETTO et al., 2012; STOCKMANN et al, 2014). Os MCs exercem efeitos poderosos sobre os fibroblastos, através de uma de suas proteinases, a triptase, que é um potente mitógeno, estimulando síntese de colágeno em pulmão e na derme (MANGIA et al., 2011). Estudos realizados em carcinoma

mamário mostraram que no microambiente do estroma tumoral havia presença significativa de MCs que se infiltram no estroma do tecido desde as etapas iniciais de carcinogênese e aumentam significativamente no carcinoma invasivo (ZUDAIRE et al., 2006; MANGIA et al., 2011). Diversos mediadores liberados pelos MCs, durante a sua degranulação, são capazes de modificar o microambiente do estroma tumoral, induzindo a proliferação de fibroblastos e sua transdiferenciação em MFs (MANGIA et al., 2011).

As enzimas mastocitárias apresentam um papel proteolítico, estimulando a angiogênese e degradando a MEC. A triptase atua estimulando a proliferação de células endoteliais vasculares humanas, promovendo a formação do tubo vascular em cultura e também degradando matriz do tecido conjuntivo para proporcionar espaço para o crescimento neovascular. Esta degradação ocorre através da ativação de MMPs latentes, com conseqüente liberação de VEGF e FGF-2 (RIBATTIA et al., 2009).

A quimase atua degradando componentes da MEC e, portanto, pode ocorrer liberação do VEGF. Esta proteinase também promove a angiogênese através da conversão de angiopoetina I em angiopoetina II (MURAMATSU et al., 2000; RIBATTI et al., 2009). A quimase é capaz de ativar a MMP-9, que está envolvida na remodelação angiogênica, estromal e invasão de células tumorais (KANBE et al., 1999; RIBATTI et al., 2009).

Os MCs podem desempenhar papéis distintos durante o desenvolvimento das lesões. Por um lado, eles podem exibir atividade supressora por secretarem diferentes interleucinas inibitórias e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Por outro lado, eles podem ajudar na progressão de tumores através da promoção da

angiogênese, da degradação da MEC e imunossupressão (THEOHARIDES E CONTI, 2004, GOMES et al., 2013). Com relação à sua capacidade pró-angiogênica, os MCs podem secretar moléculas como VEGF, FGF-2, IL-8 e TGF- β (CRIVELLATO; RIBATTI, 2008). Os MCs podem desempenhar um papel muito importante não só na angiogênese, mas também na linfangiogênese tumoral (GOMES et al, 2013).

O acúmulo de MCs em tumores humanos foi inicialmente relatado por Paul Ehrlich e por Eugen Westphal em 1889. Existem evidências convincentes de que os MCs associados aos tumores são um componente do infiltrado de uma longa lista de tumores humanos sólidos e hematológicos (ACIKALIN et al., 2005). Curiosamente, os MCs podem exercer atividades pro- ou anti-tumorigênicas, dependendo, entre outros, do estágio e do tipo de tumor, das características do microambiente tumoral e da sua localização no tumor (isto é, intra-tumoral vs peri-tumoral) enquanto que em alguns casos, eles parecem ser células inertes (ANTSIFEROVA et al., 2013; MARICHAL; TSAI; GALLI, 2013). As localizações distintas dos MCs refletem a heterogeneidade funcional e impactam significativamente em vários aspectos da iniciação e progressão do tumor. Assim, entender essas diferenças e sua correlação com o resultado do tumor fornecerão informações importantes para entender o papel dos mastócitos e sua utilidade terapêutica.

Os MCs se acumulam no estroma em torno de certos tumores e as moléculas que secretam podem favorecer o crescimento tumoral. Estes incluem heparina, IL-8 e VEGF, que induzem neovascularização, histamina, que é um imunossupressor, fatores mitogênicos, como o PDGF, NGF, SCF e proteases, que degradam a matriz circundante. Em contraste, os mediadores de MCs prejudiciais ao tumor incluem

citocinas, tais como IL-1, IL-4, IL-6 e TNF- α , que podem induzir apoptose de células tumorais (Figura 3).

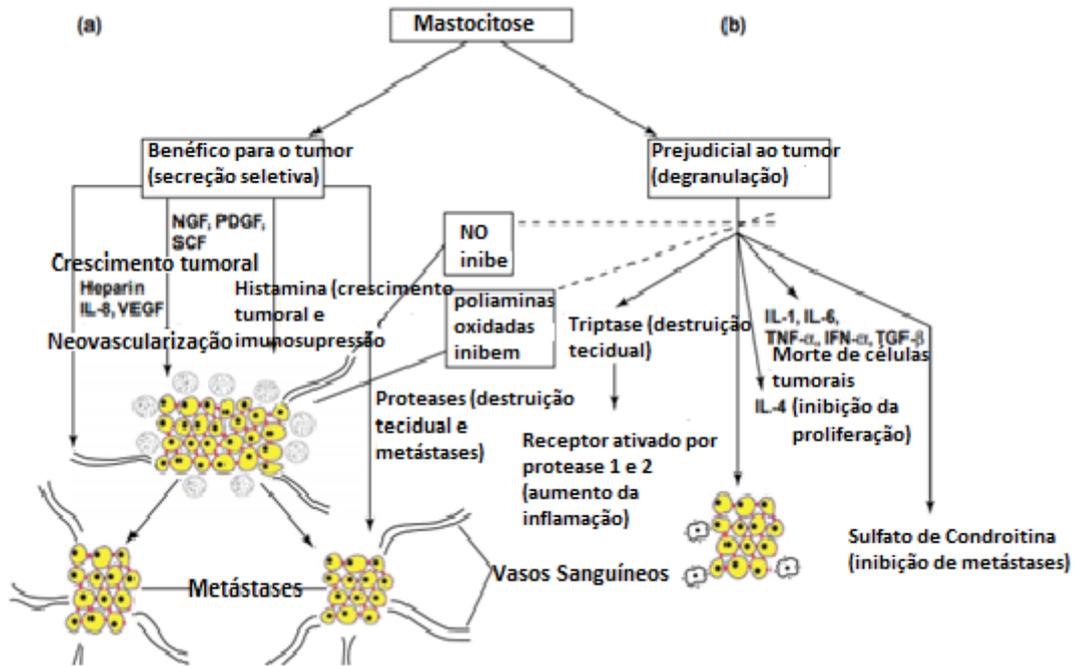


Figura 3: O possível papel do aumento do número de mastócitos no estroma de alguns tumores. (a) Os mastócitos podem ser recrutados por quimiotáticos derivados de tumores, tais como MCP-1, RANTES e SCF, para secretar seletivamente moléculas benéficas para o tumor; estes poderiam incluir fatores de crescimento, a histamina, que é mitogênica (H1) e uma imunossupressora (H2), agentes de neovascularização, tais como heparina, VEGF e IL-8, bem como proteases que poderiam permitir a formação de novos vasos sanguíneos e metástases. A degranulação parece ser bloqueada por inibidores derivados de tumores, tais como poliaminas oxidadas ou óxido nítrico (NO) derivado de novos vasos sanguíneos. (b) Os mastócitos podem se acumular em reação ao tumor. Podem desgranular e secretar moléculas, tais como IL-4 e TNF- α , que induzem a apoptose, IL-1 e IL-6, que são pró-inflamatórias ou triptase, o que estimula a inflamação induzida pelos receptores ativado por protease, bem como sulfato de condroitina, que pode bloquear as metástases. Abreviaturas: IFN- α , interferon- γ ; IL-8, interleucina-8; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1; NGF, fator de crescimento neural; NO, óxido nítrico; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; SCF, fator de células-tronco; TGF- β , factor de crescimento transformante β ; TNF- α , factor de necrose tumoral- α ; VEGF, fator de crescimento de células endoteliais vasculares (Adaptado: THEOHARIDES; CONTI, 2004).

Os MCs parecem mais ativos no local da interação tumor-hospedeiro, onde moldam o microambiente para favorecer a invasão de tecidos normais próximos. A ativação do MC ocorre em resposta a sinais recebidos através de uma grande variedade de receptores e culmina na liberação de moléculas solúveis capazes de influenciar as células estromais, imunes e tumorais vizinhas. As atividades imunológicas dos MCs dependem do seu relacionamento com outras células imunes

cuja modulação pode contribuir para imunossupressão local ou inflamação. No entanto, os MCs podem modular diretamente a atividade das células tumorais e moldar o microambiente tumoral modificando a MEC. A elucidação do real papel dos MCs no desenvolvimento e progressão do tumor dará a oportunidade de desenvolver novas terapias direcionadas ao MC como parte de tratamentos combinatórios para pacientes com câncer (RIGONI et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a deposição de colágeno e a presença de MCs no ameloblastoma e no CO.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se existe relação entre a quantidade de MCs e a deposição de colágeno na MEC das duas lesões;
- Medir a relação entre o número de células e a área percentual de colágeno de cada grupo
- Comparar os valores médios do número de MCs e da área percentual de colágeno de cada grupo;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A execução do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), através do parecer 2.219.558 bem como através da declaração de anuência e autorização do uso de dados dos laboratórios de Patologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Anexo A, B e C), obedecendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do CNS.

4.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional descritivo de caráter quali-quantitativo e com corte transversal.

4.3 Grupo de estudo

A pesquisa foi realizada com amostras de tecidos obtidas no Serviço de Patologia Oral nos laboratórios da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), localizados respectivamente em Campina Grande (PB) e Natal (RN).

Foram selecionados 40 blocos de parafina contendo fragmentos das lesões, obtidas através de biópsias excisionais realizadas em pacientes diagnosticados com ameloblastoma (20 casos) e CO (20 casos).

Foram incluídos os blocos correspondentes às lesões diagnosticadas como ameloblastoma e CO, os quais apresentavam material disponível para obtenção dos cortes a serem utilizados para a avaliação histológica do colágeno e dos MCs. Como

critério de exclusão foram dispensados blocos de parafina degradados, com quantidade de material insuficiente para realização do estudo e lesões secundariamente inflamadas.

4.3.1 Método de coleta

Tais amostras foram seccionadas de forma seriada em micrótomo RM 2125 RTS Leica (cortes histológicos 5 μm de espessura), coletadas em lâmina histológica e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para estudo microscópico.

A análise e avaliação histopatológica das lâminas coradas em HE foram realizadas para fins diagnósticos segundo os critérios de classificação da OMS de 2017 (EL NAGGAR et al., 2017).

Para análise histológica, os cortes obtidos em duplicata foram montados em lâminas histológicas. Posteriormente os cortes foram submetidos às técnicas de coloração Tricrômico de Masson (TM) e Azul de Toluidina (AT).

As lâminas para montagem histológica foram quimicamente lavadas e desengorduradas com solução detergente alcalino Extran[®]. Após a limpeza, foi aplicada uma fina camada de resina extraída das folhas de Babosa (*Aloe vera*) garantindo a aderência e evitando o desprendimento do tecido durante os procedimentos de coloração.

Após a microtomia dos blocos de parafina, os cortes histológicos obtidos (5 μm) foram desparafinizados, hidratados e submetidos à técnica de coloração especial TM, para evidenciar a deposição de colágeno intersticial, AT para evidenciar os MCs e à técnica HE que é utilizada rotineiramente para obtenção dos

diagnósticos histopatológicos. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em etanol 95%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Entellan[®].

A coloração histológica de TM proporciona visualizar e analisar quantitativamente as fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras. A coloração AT é frequentemente utilizada para identificar os MCs em virtude da heparina contida em seus grânulos citoplasmáticos. Essa coloração confere cor púrpura aos MCs.

4.3.2 Análise histomorfométrica

Para análise do colágeno intersticial e da quantidade dos MCs foram selecionados aleatoriamente cinco campos em cada caso, na região periférica das células tumorais (ameloblastoma) e da região periférica das células do revestimento cístico (CO), onde foram captadas imagens com magnificação final em 400x. A captura das imagens dos cortes histológicos foi realizada através de uma *workstation* composta por sistema de vídeo-câmera Moticam 1000 1.3 MP, resolução de 1280 x 1024 (Moticam[®]) acoplado à um microscópio óptico (Labomed Lx 400) e computador contendo o *software* MOTIC IMAGE PLUS[®] 2.0.

O parâmetro morfométrico adotado foi a distribuição da área média de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 227.55 X 170.66 μm^2). Foram eleitos 05 campos em cada caso de ameloblastoma e de CO. Totalizando 100 campos de ameloblastoma (20 casos) e 100 campos de CO (20 casos). Todas as análises foram realizadas na magnificação de 400x. Os dados obtidos foram anotados em planilhas e posteriormente enviados para análise estatística.

Para a contagem de MCs, foi utilizado microscópio óptico (Labomed Lx 400) e o *software* ImageJ[®] 1.47, com uma magnitude de 400x. A metodologia utilizada para contagem das células é a mesma utilizada pelo protocolo do CAP (*College of American Pathologists*) em pacientes com carcinoma de mama invasivo (LESTER et al., 2009). A leitura foi realizada em cinco campos por lâmina, na região periférica das células tumorais (ameloblastoma) e na região periférica das células do revestimento cístico (CO), totalizando uma área de 0,65 mm² por campo. A soma total dos cinco campos equivale à aproximadamente 3,25 mm². As respectivas áreas do campo foram calculadas de acordo com a tabela do protocolo do CAP. O número médio de MCs foi obtido pela leitura dos cinco campos e expressos como células / campo

Para o cálculo da área percentual de colágeno por campo foi utilizado o *software* ImageJ[®] 1.47, com uma magnitude de 400x cuja leitura foi realizada em cinco campos por lâmina. A coloração especial TM confere cor azul às fibras colágenas. Foi utilizada a ferramenta *Color Threshold* do *software* ImageJ[®] 1.47 para medição da área percentual de colágeno em cada um dos cinco campos. As fotomicrografias foram avaliadas pelo software após a calibração das imagens pelo comando Color threshold (Image > Adjust > Color threshold) na função RGB color para a cor azul (Mínimo de 140 e Máximo de 190), saturação (Mínimo de 0 e Máximo de 254) e brilho (Mínimo de 0 e Máximo de 190). Após a calibração e seleção das áreas de colágeno da imagem, foi utilizado o comando Analyze (Analyze > Measure), efetuando assim a medição da área de colágeno em cada um dos cinco campos da lâmina (Figura 4).

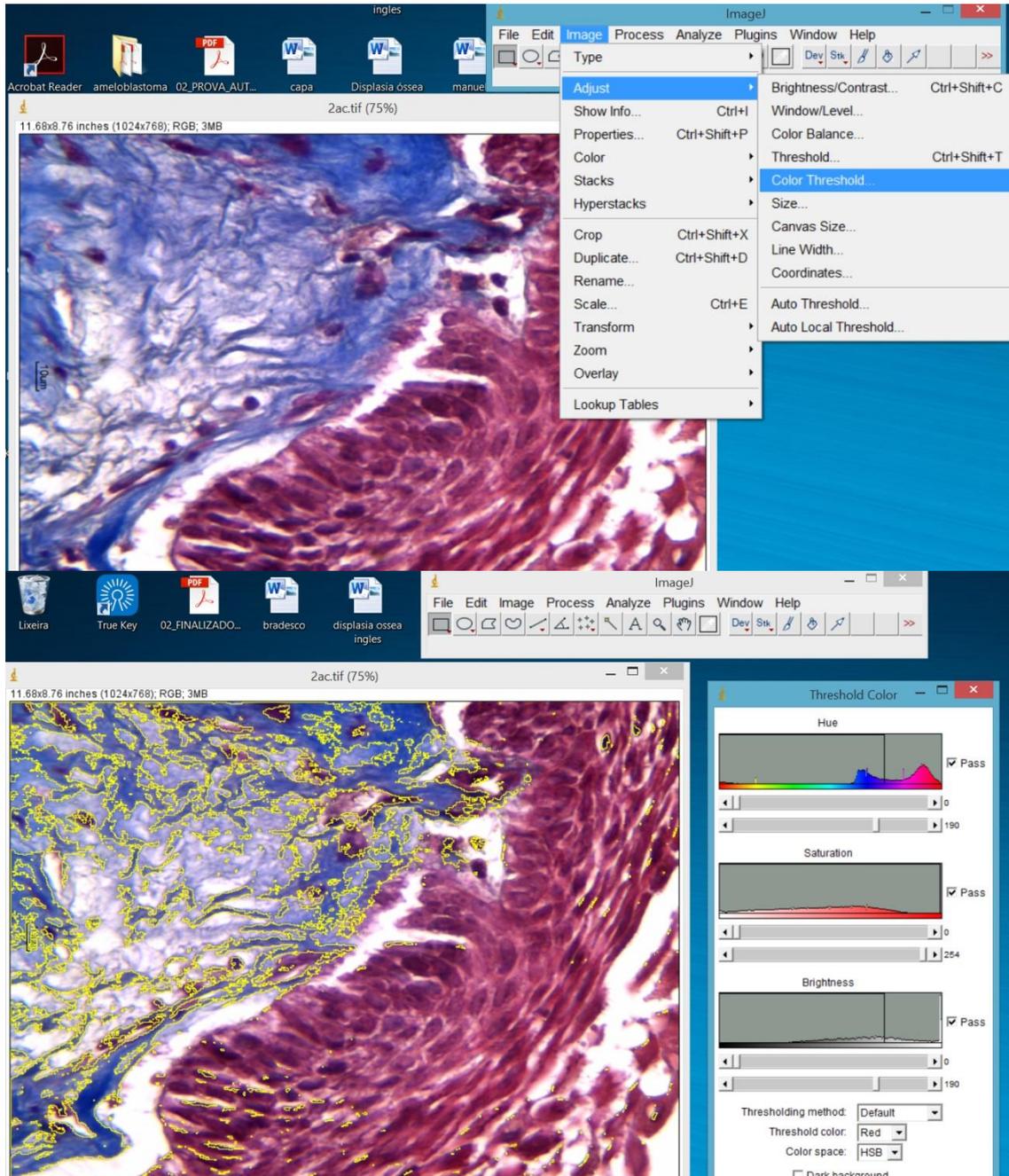


Figura 4: Comando Color Threshold (ImageJ 1.47).

4.3.3 Análise estatística

Os dados obtidos para cada variável avaliada foram registrados, tabulados e calculados em planilha no *software SPSS* versão 20.0 para *Windows*. Para comparar se havia diferença estatística significativa nos valores medianos da contagem de células (mastócitos/campo) e área percentual de colágeno (%), o teste de Mann-Whitney para amostras independentes foi aplicado. Foi adotado o nível de significância de 5%. Para medir a relação entre contagem de MCs e área percentual de colágeno (%), calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman para cada grupo.

5 RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL

ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E DISTRIBUIÇÃO DE MASTÓCITOS EM AMELOBLASTOMA E CERATOCISTO ODONTOGÊNICO

Sousa, R.C. ¹; Godoy, G.P.¹

Resumo

As lesões odontogênicas estão entre as lesões destrutivas mais frequentes dos maxilares, cuja patogênese e mecanismo de crescimento não são totalmente conhecidos. Recentemente, a presença de mastócitos e o remodelamento do colágeno foram reconhecidos na patogênese de lesões odontogênicas mais agressivas. Este estudo teve como objetivo avaliar de forma quantitativa, a presença da deposição de colágeno e os mastócitos em lesões odontogênicas. A amostra consistiu de 20 casos de ceratocisto odontogênico e 20 casos de ameloblastoma. Secções histológicas foram submetidas às técnicas histoquímicas utilizando Tricrômico de Masson e o Azul de Toluidina. Para a análise do colágeno intersticial e do número de mastócitos, cinco campos foram selecionados em cada caso, onde as imagens foram capturadas através do programa *Motic Image Plus 2.0* com ampliação final em 400x. Para comparar se havia diferença estatística significativa entre o número de mastócitos e a área percentual de colágeno das duas lesões, o teste de Mann-Whitney foi aplicado com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram diferenças na deposição de colágeno em ameloblastoma e em ceratocisto odontogênico. Em relação à deposição de colágeno, foi encontrada uma área percentual média de 17,28% \pm 10,29 nos ameloblastomas e de 21,48% \pm 13,11 nos ceratocistos odontogênicos ($p = 0,028$). Em relação aos mastócitos, os casos de ameloblastoma apresentaram uma contagem média de 1,50 \pm 1,34 células. Por outro lado, os casos de ceratocistos odontogênicos apresentaram score médio de 1,80 \pm 1,54 mastócitos ($p = 0,105$). Não foi observada correlação entre o aumento do número de células e o aumento da deposição de colágeno tanto nos casos de ameloblastomas quanto nos de ceratocisto odontogênico. É possível que diferenças no padrão do tecido conjuntivo possam influenciar a concentração real de mastócitos e vice-versa e que essas diferenças sejam responsáveis pelas variações observadas entre as duas lesões.

Keywords: Cistos Odontogênicos. Mastócitos. Colágeno.

Rodrigo Csillaz de Sousa

rcsillaz@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia-Universidade Federal de Pernambuco-Brasil.

Introdução

O ameloblastoma é uma neoplasia odontogênica, de origem epitelial, localmente invasiva, que se apresenta comumente como um aumento de volume de crescimento lento e indolor, podendo apresentar também deslocamentos, perdas dentárias, parestesia, dor e expansão das corticais (1) (2). O ceratocisto odontogênico (CO) é um cisto de desenvolvimento que difere de outros cistos odontogênicos em virtude do crescimento mural associado com a proliferação do revestimento epitelial no osso esponjoso. Além disso, a alta taxa de recorrência sugere o comportamento agressivo e o potencial inerente ao crescimento dessa lesão (3).

O epitélio dessas lesões foi investigado extensivamente em relação ao seu papel na proliferação e comportamento agressivo das lesões, entretanto o comportamento de cistos e tumores odontogênicos não dependente exclusivamente do epitélio, mas também do tecido conjuntivo de suporte.

As interações epitélio-mesenquimais que ocorrem durante a odontogênese dão origem a dentes e a uma variedade de patologias nas formas de cistos e tumores odontogênicos. A proliferação de células epiteliais é indispensável na formação de cistos odontogênicos e o tecido conjuntivo é parte funcional dos cistos e não somente estrutural (4).

O tecido conjuntivo compreende essencialmente as células e a MEC que é composta por quatro famílias de proteínas intimamente associadas: colágenos, elastina, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos.

As fibras colágenas são o maior componente do tecido conjuntivo em tumores odontogênicos e o seu estudo pode apresentar significância no entendimento do seu comportamento biológico (5). O desenvolvimento dos tumores odontogênicos é controlado pelo potencial proliferativo intrínseco das células tumorais e das circunstâncias do microambiente, como a inflamação no local do tumor, por exemplo (6). A matriz extracelular (MEC) é um componente essencial do microambiente estromal, pois serve como arcabouço das células, exerce influência sobre o comportamento celular, afeta o crescimento, a diferenciação, a mobilidade e viabilidade celular (7).

A região periférica das células tumorais e do revestimento cístico é circundada por um infiltrado de células inflamatórias, como linfócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos (8). Tais células estimulam a proliferação de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos, sendo um importante mecanismo para a progressão das lesões (9). Os Mcs são conhecidos por sua participação nas reações de anafilaxia, reabsorção óssea e interação com outras células imunes (10). Essas células influenciam muitos aspectos da biologia tumoral, a exemplo do crescimento, angiogênese induzida pelas lesões e remodelação tecidual (11). No entanto, a contribuição definitiva dos mastócitos permanece controversa (11) (12). Não está claro se essas células agem favorecendo ou inibindo o crescimento das lesões (13) (14) (15).

Os MCs parecem desempenhar um papel central na patogênese de cistos odontogênicos. A pressão hidrostática do fluido luminal é importante no aumento do cisto e a atividade dessas células pode contribuir para isso, aumentando a pressão osmótica do fluido de pelo menos três maneiras: a) pela liberação direta de heparina no fluido luminal; b) pela liberação de enzimas hidrolíticas que poderiam degradar componentes da MEC capsular e facilitar sua passagem para o fluido; c) pela ação da histamina na contração da musculatura lisa, aumentando a permeabilidade vascular e facilitando a transudação de proteínas do soro (16). Há ainda falta de compreensão de todos os mecanismos envolvidos na patogênese e do papel do tecido conjuntivo e das células inflamatórias, particularmente, dos MCs, no comportamento biológico dos cistos e tumores odontogênicos.

O presente estudo buscou determinar a ocorrência e caracterizar a deposição de colágeno e quantificar os mastócitos no microambiente de ameloblastomas e COs.

Material e métodos

Aspectos éticos

A execução do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), através do parecer 2.219.558, obedecendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Coleta dos dados e das amostras

A pesquisa foi realizada com amostras de tecidos obtidas em dois serviços de Patologia Oral.

Foram selecionados 40 blocos de parafina contendo fragmentos das lesões, obtidas através de biópsias excisionais realizadas em pacientes diagnosticadas com ameloblastoma (20 casos) e CO (20 casos). Foram incluídos os blocos que apresentavam material disponível para obtenção dos cortes. Como critério de exclusão foram dispensados blocos de parafina degradados, com quantidade de material insuficiente e lesões secundariamente inflamadas.

Os blocos foram seccionados de forma seriada em micrótomo RM 2125 RTS Leica (cortes histológicos 5 μm de espessura) e obtidos em triplicata. Os cortes foram montados em lâminas histológicas e submetidos ao processamento histológico de rotina. Foram utilizadas técnicas de coloração Hematoxilina-Eosina (HE), tricrômico de Masson (TM) e Azul de Toluidina (AT) proporcionando confirmar o diagnóstico, visualizar e analisar quantitativamente as fibras colágenas do tecido conjuntivo, conferindo a coloração azul a todas estas fibras e também a visualização dos mastócitos, respectivamente.

Para análise do colágeno intersticial e da quantidade dos mastócitos foram selecionados cinco campos em cada caso, totalizando 100 campos de cada grupo de lesões, onde foram captadas imagens das regiões periféricas das células tumorais e do revestimento cístico, com magnificação final em 400x. A captura das imagens dos cortes histológicos foi realizada através de uma *workstation* composta por sistema de vídeo-câmera Moticam 1000 1.3 MP, resolução de 1280 x 1024

(Moticam[®]) acoplado à um microscópio óptico (Labomed Lx 400) e computador contendo o *software* MOTIC IMAGE PLUS[®] 2.0.

Para a contagem dos mastócitos, a leitura foi realizada em cinco campos por lâmina, com uma magnitude de 400x, totalizando 100 campos de cada grupo de lesões, uma área de 0,65 mm² por campo. A soma total dos cinco campos equivale à aproximadamente 3,25 mm².

Para o cálculo da área percentual de colágeno por campo foi utilizado o *software* ImageJ[®] 1.47, com uma magnitude de 400x. A coloração especial TM confere cor azul às fibras colágenas. Foi utilizada a ferramenta *Color Threshold* do *software* ImageJ[®] 1.47 para medição da área percentual de colágeno em cada um dos cinco campos. As fotomicrografias foram avaliadas pelo software após a calibração das imagens pelo comando Color threshold (Image > Adjust > Color threshold) na função RGB color para a cor azul (Mínimo de 140 e Máximo de 190), saturação (Mínimo de 0 e Máximo de 254) e brilho (Mínimo de 0 e Máximo de 190). Após a calibração e seleção das áreas de colágeno da imagem, foi utilizado o comando Analyze (Analyze > Measure), efetuando assim a medição da área de colágeno em cada um dos cinco campos da lâmina (Figura 01).

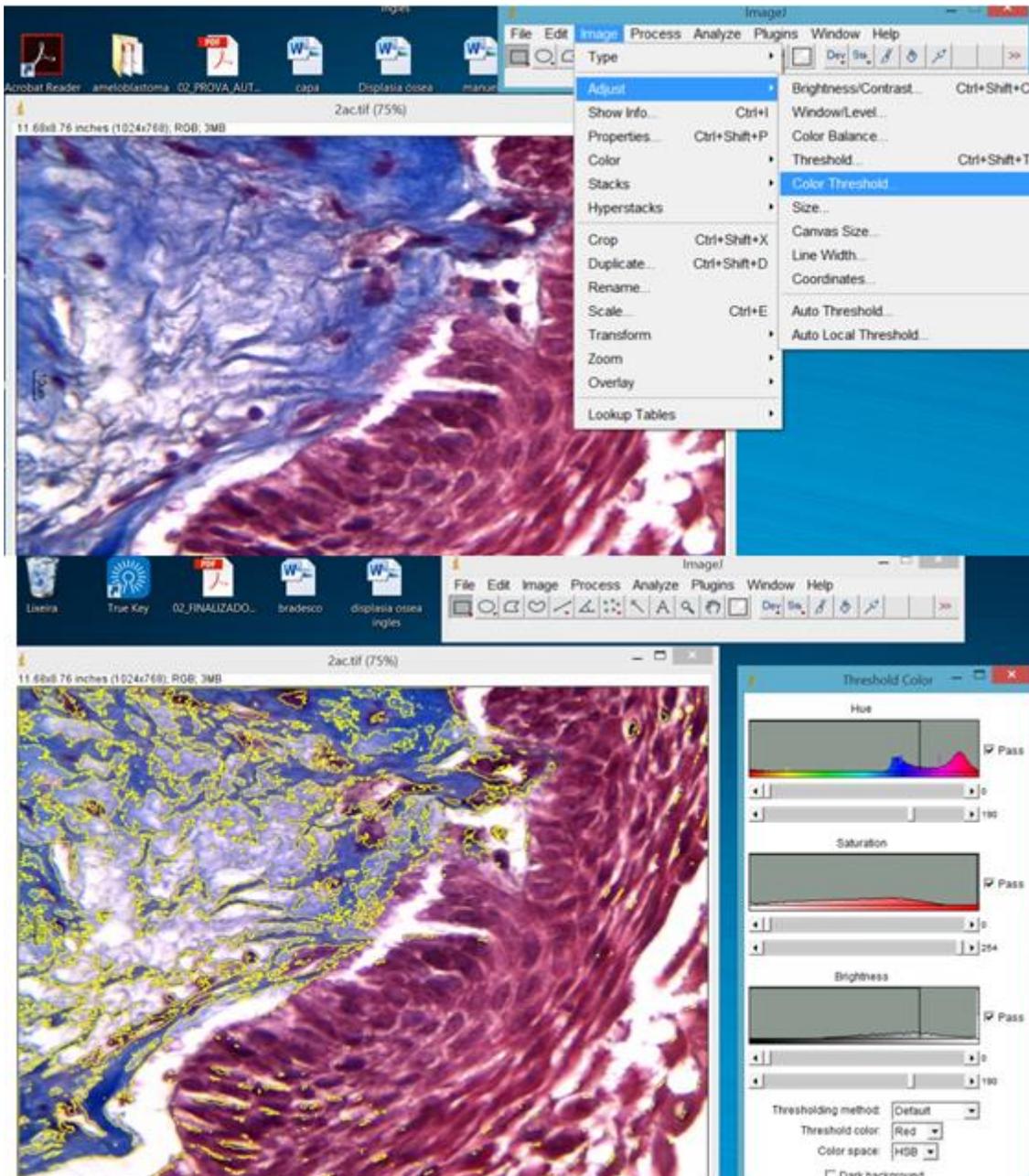


Figura 1: Comando Select da ferramenta Color Threshold *software* ImageJ® 1.47

O parâmetro morfométrico adotado foi a distribuição da área média de colágeno intersticial por campo captado na lâmina histológica (área total do campo = 227.55 X 170.66 μm^2). Todas as análises foram realizadas na magnificação de 400x. Os dados obtidos foram anotados em planilhas no *software* SPSS versão 20.0 para *Windows*. Para comparar se havia diferença estatística significativa nos valores medianos da

contagem de células (mastócitos/campo) e área percentual de colágeno (%), o teste de Mann-Whitney para amostras independentes foi aplicado. Foi adotado o nível de significância de 5%. Para medir a relação entre contagem de MCs e área percentual de colágeno (%), calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman para cada grupo.

Resultados

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a presença de deposição de colágeno em todos os casos de Ameloblastoma e de CO (Figuras 02 e 03). As áreas percentuais de colágeno das duas lesões estão descritas na tabela 1, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$) (tabela 1).

Em relação aos casos de Ameloblastomas, foram encontrados diferentes tipos histológicos: Folicular (08 casos), Plexiforme (07 casos) e Acantomatoso (05 casos). Não foram encontradas as variantes histológicas desmoplásica, células granulares e células basais.

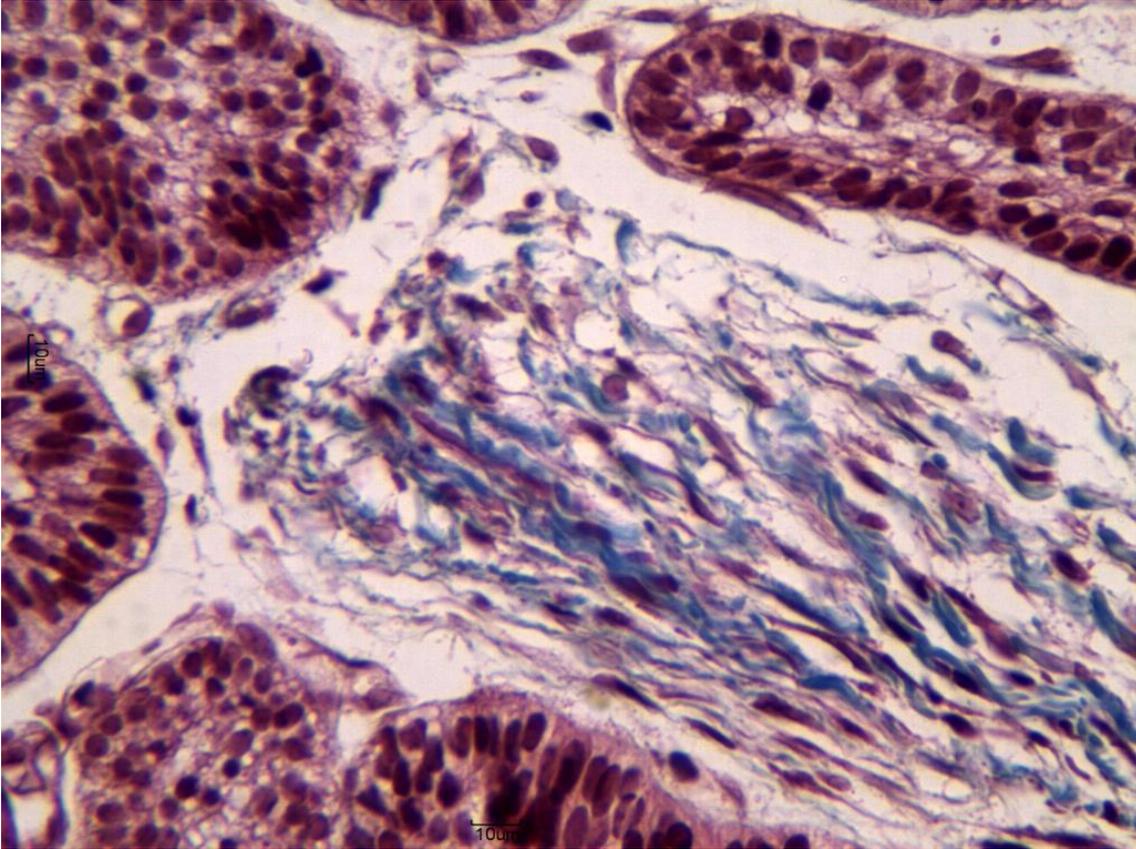


Figura 2: Caso de Ameloblastoma com fibras colágenas frouxamente arranjadas. Tricômico de Masson 400x

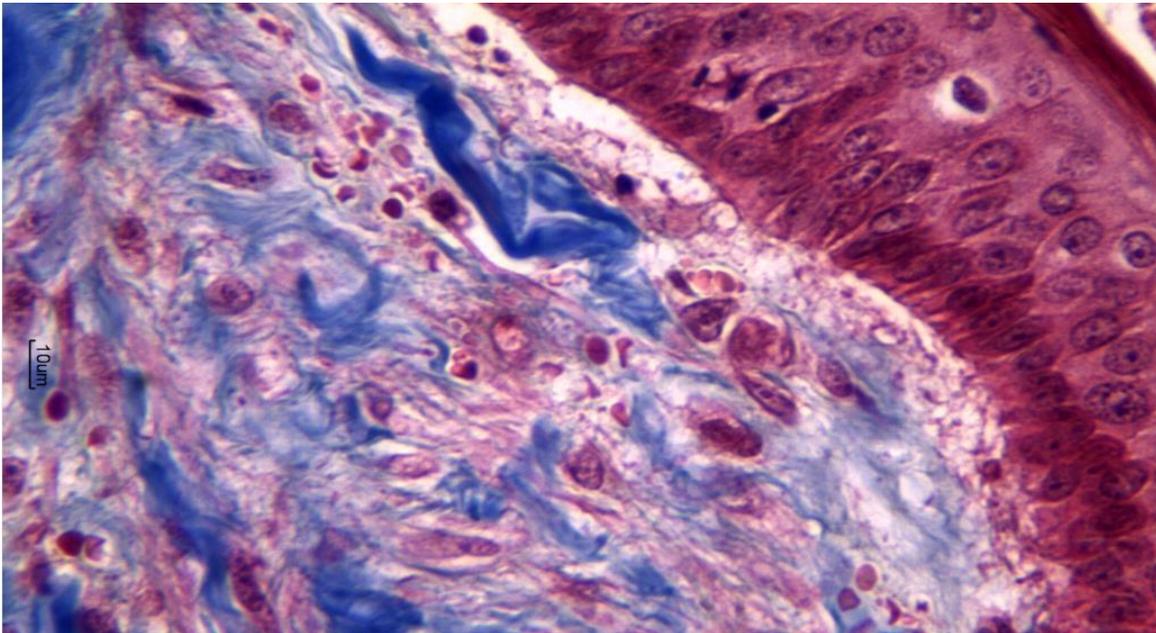


Figura 3: Caso de Ceratocisto Odontogênico. Apesar dessa pequena área mais densa, em geral o que se observa é um arranjo mais frouxo e paralelo das fibras colágenas. Tricômico de Masson 400x.

Tabela 01 - Medidas descritivas da Área (%) segundo os grupos Ameloblastoma e Ceratocisto Odontogênico

| GRUPO | N | Média | Desvio-padrão | Mínimo | Máximo | Coefficiente de variação (%) | p-valor ¹ |
|---------------|----|-------|---------------|--------|--------|------------------------------|----------------------|
| Ameloblastoma | 20 | 17,28 | 10,29 | 0,02 | 50,24 | 59,55 | 0,028 |
| Ceratocisto | 20 | 21,48 | 13,11 | 0,61 | 48,71 | 61,03 | |
| Total | 40 | 19,38 | 11,94 | 0,02 | 50,24 | 61,63 | |

1- Teste não paramétrico de Mann Whitney

A contagem de células (mastócitos/campo) está descrita na tabela 2 e essa diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa $p=0,105$ (tabela 02).

Tabela 02 - Medidas descritivas do número de células por campo segundo os grupos Ameloblastoma e Ceratocisto Odontogênico

| GRUPO | N | Média | Desvio-padrão | Mínimo | Máximo | Coefficiente de variação (%) | p-valor ¹ |
|---------------|----|-------|---------------|--------|--------|------------------------------|----------------------|
| Ameloblastoma | 20 | 1,50 | 1,34 | 0,00 | 8,00 | 89,14 | 0,105 |
| Ceratocisto | 20 | 1,80 | 1,54 | 0,00 | 9,00 | 85,41 | |
| Total | 40 | 1,65 | 1,44 | 0,00 | 9,00 | 87,57 | |

1- Teste não paramétrico de Mann Whitney

No presente estudo, dos 200 campos analisados, totalizando casos de ameloblastoma (20) e CO (20), encontrou-se mastócitos em 80,5% dos campos. Nos casos de ameloblastoma, dos 100 campos analisados, 80% dos campos havia MCs. Nos casos de CO, dos 100 campos analisados, em 81% dos campos havia MCs. Foram observados MCs em pelo menos um dos cinco campos analisados de cada caso, totalizando 100% dos casos (figura 04 e 05).

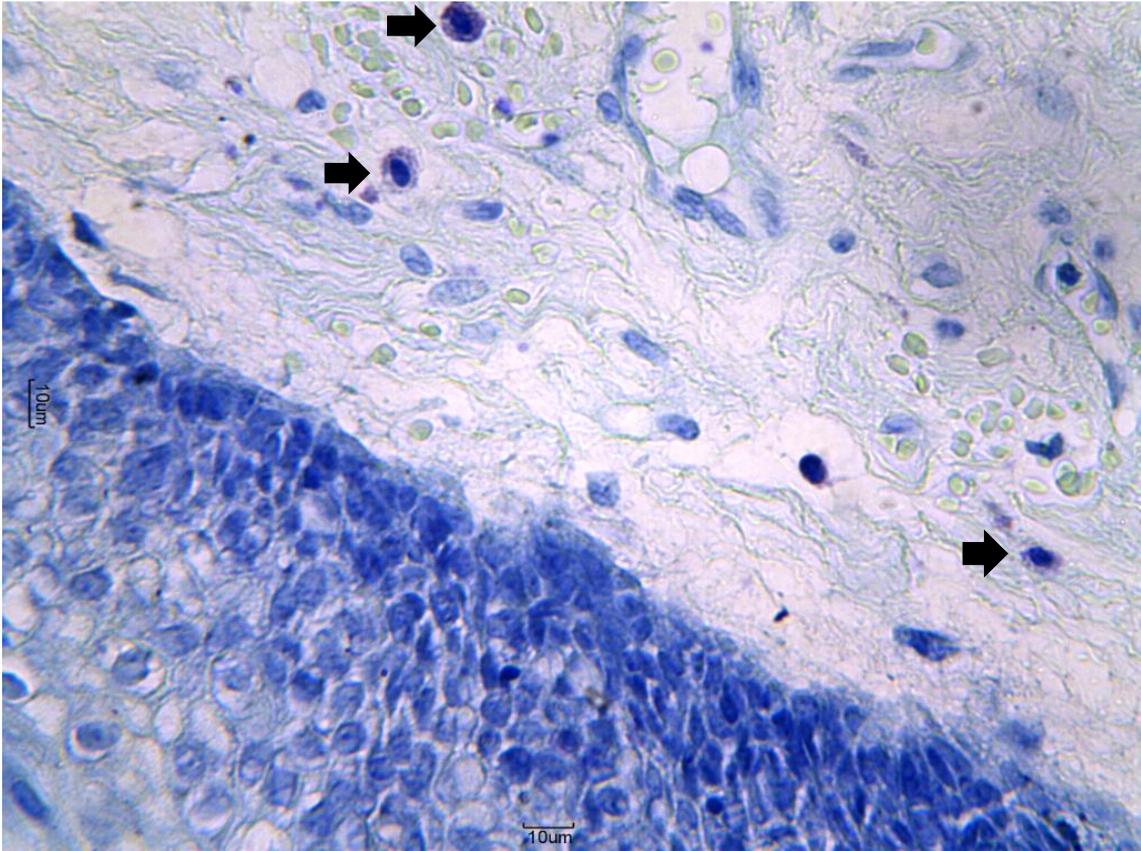


Figura 4: Mastócitos encontrados em caso de CO.

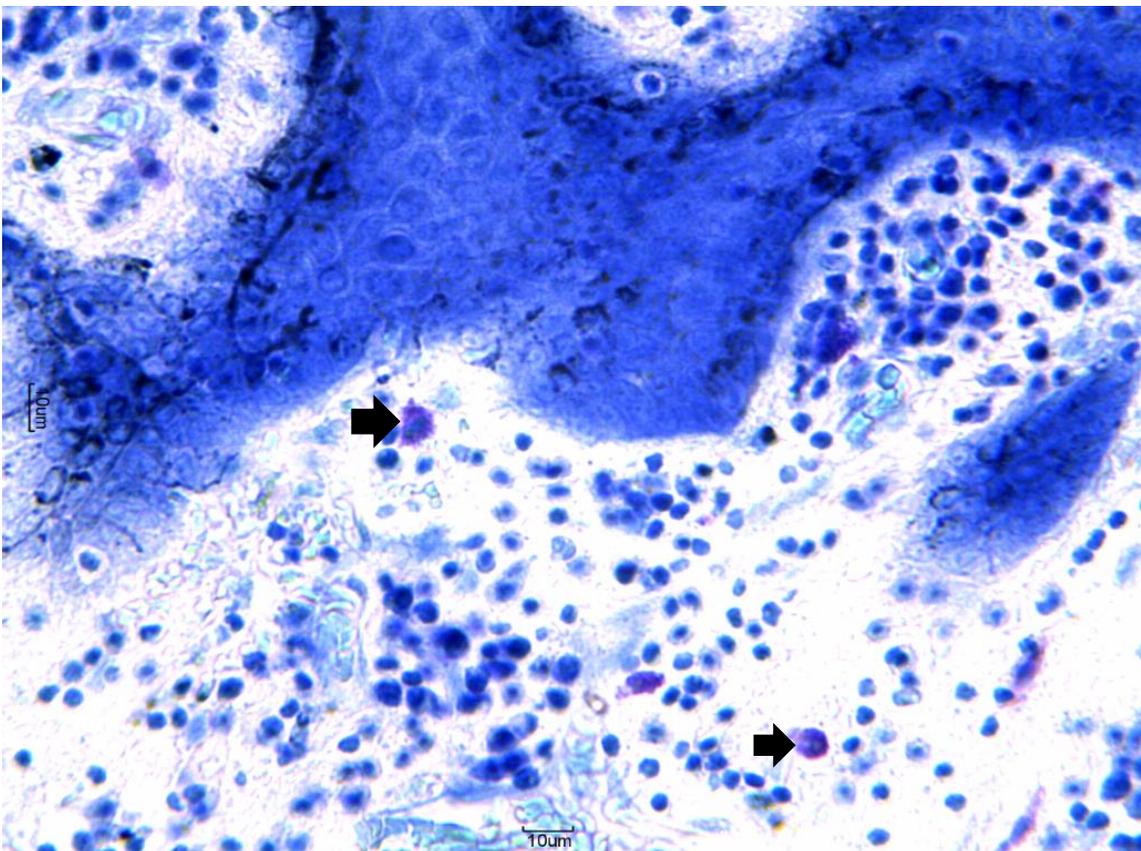


Figura 5: Mastócitos encontrados em caso de Ameloblastoma.

Em relação ao paralelismo das fibras colágenas, 80% dos casos de CO mostrou arranjo paralelo das fibras em relação à superfície epitelial, enquanto que os ameloblastomas apresentaram menor porcentagem, em 30% dos casos observou-se o paralelismo das fibras.

Não há nenhuma correlação entre a contagem de Mastócitos / campo x área (%) tanto nos casos de ameloblastoma como nos de CO (tabela 03).

Tabela 03 - Correlação de Spearman entre as variáveis contagem de mastócitos e Área (%).

| Grupo | Contagem (Mastócitos) x Área (%) | | |
|---------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|
| | N | Correlação de Spearman | p-valor ¹ |
| Ameloblastoma | 20 | 0,066 | 0,782 |
| Ceratocisto | 20 | 0,042 | 0,859 |

1-Teste de significância da correlação

Discussão

A maioria dos estudos tem se concentrado na avaliação da atividade proliferativa epitelial das lesões odontogênicas (17), mas o papel do mesênquima não pode ser subestimado. O estroma é essencial para manter os tecidos epiteliais e ambos formam um ambiente com interações moleculares contínuas (18).

O crescimento tumoral representa processos dinâmicos regulados por alterações moleculares induzidas pelas próprias células tumorais, bem como por condições microambientais favoráveis que são essenciais para a sobrevivência e multiplicação celular. Participam desse processo certas citocinas, fatores de crescimento e células inflamatórias, como os MCs (19), (20). Devido a essas funções, acredita-se que os MCs também podem desempenhar um papel importante no crescimento e expansão dos tumores e cistos odontogênicos.

Além das células tumorais e inflamatórias, a MEC desempenha um papel muito importante na regulação do crescimento, na diferenciação e na organização dos tecidos. O colágeno é o principal componente da MEC. Durante a expansão tumoral, o colágeno pode mostrar variações na maneira como as fibrilas individuais são compactadas em fibras como também pode apresentar mudanças no diâmetro e perfil transversal das fibras. Essas alterações são oriundas dos mecanismos patológicos que operam nessas situações e são caracterizados por diferentes ambientes biomoleculares. A formação de fibrilas de colágeno é complexa e depende de numerosas modificações secundárias ou pós-traducionais. Defeitos nessas modificações estão associados a várias doenças (21).

Várias pesquisas sugerem que os MCs podem participar de processos desmoplásicos e fibróticos. Em 1995, foi demonstrada a participação destas células em um processo de fibrose presente no quadro de escleroderma em camundongos,

quando ficou evidenciada uma redução da fibrose associada à depleção mastocitária (22). Também foi descrita a associação entre o aumento da população de mastócitos e o processo fibrótico desenvolvido no coração, em modelos experimentais, bem como em casos de fibrose hepática em humanos (23) (24) (25).

No presente estudo não foi encontrado processos fibróticos tanto no ameloblastoma quanto no CO, mesmo nos casos que apresentaram alta concentração de MCs. Nos casos de ameloblastoma, não foi encontrada a variante desmoplásica, caracterizada por um estroma densamente colagenizado.

Diversos mediadores secretados pelos MCs estão envolvidos no processo de remodelação da MEC e na deposição de colágeno. A histamina apresentou capacidade de induzir proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, sendo esse mesmo tipo de atividade comum à heparina (26) (27). Outra substância também estocada nos grânulos, a triptase, foi capaz de induzir a proliferação de fibroblastos *in vitro*. Mais ainda, os MCs podem liberar uma ampla gama de citocinas com atividade fibrogênica, nestas estão inclusas IL-4, IL-13, TNF- α , TGF- β e FGF. Outra possibilidade seria uma contribuição direta dos MCs para o processo de fibrose através da potencialidade destas células em produzir glicoproteínas de MEC (28).

Num estudo realizado em 2012, o qual analisou a distribuição de mastócitos em ameloblastoma convencional e unicístico, tumor odontogênico adenomatóide, tumor odontogênico calcificante, mixoma odontogênico e CO foi detectada a presença de MCs em 96% dos casos analisados e a maioria das células estavam localizadas na região periférica das células tumorais e das células do revestimento cístico (12).

No presente estudo, os MCs apresentavam uma forma alongada, oval e / ou arredondada, com marcação histoquímica arroxeadada, comumente localizada

próxima aos vasos sanguíneos. Na maioria dos campos, os MCs estavam localizados na região periférica das células tumorais e das células do revestimento cístico, totalizando aproximadamente (87%) dos campos analisados, enquanto que menos MCs foram encontrados adjacentes à células tumorais e epiteliais do CO.

Segundo Maltby et al. (29), a localização de MCs nas regiões periparenquimais de tumores sugere que o recrutamento dessas células pode ocorrer devido à sua migração de tecidos circundantes saudáveis ou da migração de progenitores de MCs via vasos sanguíneos próximos ao tumor. No presente estudo foi observada a presença de mastócitos próximo aos vasos sanguíneos, um achado relativamente comum (19). Além desse achado, parece haver uma íntima comunicação celular entre essa população de células e o sistema vascular tumoral, criando um microambiente favorável ao desenvolvimento neoplásico. Alguns autores observaram forte associação entre a secreção de fatores angiogênicos e o crescimento tumoral. Os mastócitos secretam diversos fatores angiogênicos, tais como FGF2, VEGFA, TNFs, CXCL8 (30), (31) como também diversas proteases, tais metaloproteinases (MMPs) (principalmente MMP9), assim como quimase e triptase que modificam as pró-MMPs para suas formas ativas (32) (33).

Os MCs são células importantes do sistema imune inato e sistema imune adquirido que secretam uma série de produtos biologicamente ativos armazenados em seus grânulos incluindo triptase e quimase (34), (35), (36). Estas células também participam no processo de angiogênese e nos tecidos reparo e remodelação (37), (38), (39). Segundo Ribatti (34) e Crivellato (8) e Stockmann et al. (39), os MCs estão envolvidos na tumorigênese e progressão tumoral, principalmente por sua capacidade de liberar fatores proangiogênicos.

No presente estudo, foi na região periférica das células tumorais e das células do revestimento cístico em que foi encontrado maior quantidade de MCs. Isso está em concordância com diversos estudos que indicam que essas células podem desempenhar um papel central na patogênese de cistos e tumores odontogênicos.

Na patogênese do CO, a pressão hidrostática intraluminal é um fator importante para o crescimento cístico e os MCs contribuem com a liberação de heparina no fluido luminal, com a liberação de enzimas hidrolíticas que degradam componentes da MEC da cápsula e pela liberação de histamina que age na musculatura lisa e aumenta a permeabilidade vascular (40). Os MCs estão também implicados na estimulação da produção de prostaglandinas, que são importantes mediadores inflamatórios e que estão associadas à reabsorção óssea. Os MCs podem agir como apresentadores de antígeno para os linfócitos T. A subsequente ativação de células T levaria à ativação de mastócitos, o que produziria degranulação e liberação de citocinas, como o TNF- α , com subseqüentes efeitos pró-inflamatórios e pró-secretórios no mastócito. Podem também agir nos processos de fibrose e síntese de colágeno bem como na produção de enzimas que degradam a matriz e facilitam a expansão das lesões (13) (19) (41) (42). Portanto, há várias maneiras que essas células podem estar implicadas com o crescimento de cistos e tumores odontogênicos.

O colágeno desempenha um papel significativo na manutenção da integridade estrutural e na determinação da função do tecido. Portanto, métodos para detectar, quantificar e analisar o colágeno são valiosos (43). Em relação ao percentual da área de deposição de colágeno, todos os casos de ameloblastoma e CO apresentaram deposição de colágeno. Neste trabalho utilizou-se a coloração TM que cora em azul as fibras colágenas sem diferenciar o tipo de colágeno. Através da

análise histomorfométrica calculou-se a área percentual de colágeno de cada campo analisado e posteriormente a média das áreas. Optou-se por calcular a área de colágeno sem diferenciá-los e correlacioná-la com a contagem de mastócitos em cada campo.

Quando foi calculada a área percentual de colágeno relacionando-a com a quantidade de células, observou-se que nos casos de CO, o aumento do número de células foi acompanhado respectivamente pelo aumento na área de deposição de colágeno ao contrário dos casos de Ameloblastoma que não demonstrou essa relação. Quando se comparou as duas lesões, o CO apresentou maiores áreas de deposição de colágeno e essa comparação foi estatisticamente significativa ($p=0,028$).

A maioria dos casos de CO mostrou arranjo paralelo das fibras de colágeno em relação à superfície epitelial, enquanto que os ameloblastomas apresentaram menor porcentagem. O arranjo frouxo das fibras colágenas foi encontrado próximo ao epitélio e um arranjo mais denso estava presente numa região mais afastada. Este arranjo solto e paralelo de fibras de colágeno observado no CO pode atuar como um fator adicional na facilitação da separação do revestimento epitelial da cápsula do tecido conjuntivo subjacente. Em relação aos casos de ameloblastoma, um arranjo mais frouxo e desorganizado estava presente, as fibras colágenas apresentavam pouco paralelismo. Diante dos resultados encontrados, vale ressaltar que as fibras colágenas apresentaram diferentes características morfológicas em relação à orientação e arranjo. A qualidade e organização das fibras de colágeno afetam significativamente a resistência à tração de um tecido conjuntivo e, conseqüentemente, sua capacidade de suportar tecidos e órgãos. Nos casos de CO, as fibras finas, paralelas e pobremente empacotadas de colágeno provavelmente

representam colágeno intermediário. Isso também pode validar o comportamento agressivo do CO (44) (45) (46).

O componente inflamatório da lesão também modifica a síntese de colágeno, sua degradação como também está envolvido nos processos de fibrose. Os MCs produzem triptase e quimase, ambas enzimas envolvidas no processos de síntese e degradação de colágeno. Estudos prévios demonstraram que tanto a quimase quanto a triptase estão envolvidas nos processos de fibrose tecidual (47) (48).

No presente estudo, não foi observado infiltrado inflamatório na maioria dos campos e quando apresentava, o mesmo era leve. Quando há infiltrado inflamatório intenso no tecido conjuntivo, as características típicas das lesões podem ser perdidas. Nesse estudo foi encontrado áreas com infiltrado inflamatório leve e presença de muitos MCs, entretanto, a maioria dos casos não apresentou infiltrado inflamatório considerável, e mesmo assim, foram encontrados uma quantidade considerável de MCs, podendo-se inferir que essas células participam de alguma forma no desenvolvimento das lesões odontogênicas.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a deposição de colágeno nas lesões odontogênicas estudadas é frequente, sugerindo que podem existir diferentes tipos de colágenos como também diferenças na compactação, no diâmetro e no paralelismo das fibras. Assim sendo, infere-se que a qualidade e os tipos de fibras colágenas podem ter um impacto sobre o comportamento biológico da lesão, corroborando assim, que o tecido conjuntivo desempenha um papel vital na progressão dos cistos e tumores odontogênicos. Sendo assim, investigações sobre a base bioquímica e molecular são necessárias para delinear exatamente o papel do colágeno e do mesênquima no comportamento de lesões odontogênicas.

Parece que os MCs podem estar envolvidos na patogênese do Ameloblastoma e do CO. Essas células são biossensores naturais do tecido intersticial, regulando o tônus dos vasos sanguíneos e a remodelação da MEC. A liberação lenta de vesículas de MCs com citocinas profibróticas, fatores de crescimento e enzimas podem induzir a expressão de colágeno nos fibroblastos como também degradá-lo e facilitar a expansão das lesões. Recomenda-se a realização de mais estudos para confirmar o papel dessas células no comportamento biológico e na progressão das lesões, como também detalhar por quais mecanismos essas células exercem seu papel biológico nas lesões odontogênicas.

Referências

1. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: Biological profile of 3677 cases. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*. 1995 março; 31(2).
2. Mendenhall M, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall P. Ameloblastoma. *American journal of clinical oncology*. 2007; 30(6).
3. Siwach P, Joy T, Tupkar J, Thakur A. Controversies in Odontogenic Tumours. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2017 outubro; 17(3).
4. Singh H, Shetty D, Wadhwan V, Aggarwal P. A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma on biological behavior of odontogenic cysts: A histochemical study. *National journal of maxillofacial surgery*. 2012; 3(1).
5. Hangelbroek J, Raubenheimer E, Vorster R, Ngwenya S. COLLAGEN IN ODONTOGENIC TUMOURS: A HISTOCHEMICAL- AND. *Medical Technology SA*. 2012 junho; 26(1).
6. Maltby , Khazaie , McNagny M. Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2009 agosto; 1796(1).
7. Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connective tissue research*. 2008; 49(3-4).

8. Ribatti , Crivellato , Molica. Mast cells and angiogenesis in haematological malignancies. *Leukemia Research*. 2009 julho; 33(7).
9. Ullah E, Nagi A, Ashraf M. Angiogenesis and mast cell density as predictors of patient survival in squamous cell carcinoma of lung. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2013; 9(4).
10. Santos Netto J, Pires F, Fonseca E, Silva L, Lourenço S. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2012; 41(8).
11. Mashhadiabbas F, Moghadam S, Moshref M, Elahi M. Immunohistochemical detection and ultrastructure of myofibroblasts in the stroma of odontogenic cysts and ameloblastoma. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2010; 12(4).
12. Pereira F, Gurgel C, Ramos E, Vidal M, Pinheiro A, Jurisic V, et al. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. *Tumor Biology*. 2012 abril; 33(2).
13. Allen M, Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of pathology*. outubro 2010; 23(2).
14. Bianchi G, Borgonovo G, Pistoia V, Raffaghello L. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: Focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histology and histopathology*. 2011; 26(7).
15. Weinberg R. *The biology of cancer*: Garland Science; 2013.
16. Partidar KA, Parwani RN, Wanjari SP, Partidar AP. Mast cells in human odontogenic cysts. *Biotechnic & Histochemistry*. 2012; 87(6).
17. Patielli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncology*. 1998 setembro; 34(5).
18. Bissell M, Radisky D. Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*. 2001; 1(1).
19. Conti P, Castellani M, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tetè S, et al. Role of Mast Cells in Tumor Growth. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2007; 37(4).
20. Alaeddini M, Salah S, Dehghan F, Eshghyar N, Etemad-Moghadam S. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastomas. *Oral diseases*. 2009; 15(6).
21. Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*. 2001 abril; 32(3).
22. Everett ET, Pablos JL, Harley A, LeRoy EC, Norris S. The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1995; 110(2).

23. Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *The American journal of gastroenterology*. 1999; 94(7).
24. Hara M, Ono K, Hwang M, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, et al. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195(3).
25. Akgul A, Youker K, Noon G, Loebe M. Quantitative changes in mast cell populations after left ventricular assist device implantation. *ASAIO journal*. 2005; 51(3).
26. Kunzmann S, Schmidt-Weber C, Zingg J, Azzi A, Kramer B, Blaser K, et al. Connective tissue growth factor expression is regulated by histamine in lung fibroblasts: potential role of histamine in airway remodeling. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2007; 119(6).
27. Murota H, Bae S, Hamasaki Y, Maruyama R, Katayama I. Emedastine difumarate inhibits histamine-induced collagen synthesis in dermal fibroblasts. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008; 18(4).
28. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiological reviews*. 1997; 77(4).
29. Maltby S, Khazaie K, McNagny K. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2009; 1796(1).
30. Galdiero M, Bianchi P, Grizzi F, Di Caro G, Basso G, Ponzetta A, et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2016 março; 139(2).
31. Varricchi G, Galdiero M, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are mast cells MASTers in cancer? *Frontiers in immunology*. 2017 abril; 8(424).
32. Bruno A, Pagani A, Pulze L, Albin A, Dallaglio K, Noonan D, et al. Orchestration of angiogenesis by immune cells. *Frontiers in oncology*. 2014 julho; 4.
33. Coussens L, Raymond W, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & development*. 1999; 13(11).
34. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental Biology*. 2012 dezembro; 372(2).
35. Caughey H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunological reviews*. 2007 junho; 217(1).
36. Stone K, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 fevereiro; 125(2).

37. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Perspective Article: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound repair and regeneration*. 2005; 13(1).
38. Castro I, Rocha C, Henriques A, Sousa A, Lisboa M, Sotero D, et al. Do laser and led phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen? *Lasers in Medical Science*. 2014 julho; 29(4).
39. Stockmann C, Schadendorf D, Klose R, Helfrich I. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. *Frontiers in oncology*. 2014 abril; 4.
40. Smith G, Smith AJ, Basu MK. Mast cells in human odontogenic cysts. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1989; 18(5).
41. Walsh L, Davis M, Xu L, Savage N. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *Journal of oral pathology & medicine*. 1995; 24(6).
42. Baram D, Valday G, Salamon P, Drucker I, Hershkoviz R, Mekori Y. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF- α . *The Journal of Immunology*. 2001; 167(7).
43. Rich L, Whittaker P. Collagen And Picrosirius Red Staining: A Polarized Light Assessment. *Braz J Morphol Sci*. 2005; 22(2).
44. Hirshberg A, Sherman S, Buchner A, Dayan D. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. *Journal of oral pathology & medicine*. outubro 1999; 28(9).
45. Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, Kaplan I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral oncology*. 2007 março; 43(3).
46. Moure SP, Carrard VC, Lauxen IS, Manso PPA, Oliveira MG, Martins MD, et al. Collagen and elastic fibers in odontogenic entities: analysis using light and confocal laser microscopic methods. *The open dentistry journal*. 2011; 5.
47. Dixon M, Cunnington H. Mast cells and cardiac fibroblasts: accomplices in elevation of collagen synthesis in modulation of fibroblast phenotype.. *Hypertension*. 2011; 58(2).
48. Chen , Xu , Yang , Zhang , Huang , Yu , et al. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway.. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017; 14(5).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados deste trabalho evidenciam que a deposição frequente de colágeno nas duas lesões odontogênicas estudadas não pode ser considerada um achado aleatório, necessitando averiguação das implicações clínicas.
- A deposição de colágeno e sua degradação pode representar uma ferramenta adicional para a estratificação do risco e do prognóstico tumoral.
- Os achados sugerem um papel para os MCs no comportamento clínico agressivo das lesões odontogênicas estudadas, entretanto novos estudos são necessários para melhor compreensão do papel biológico que essas células exercem nas lesões.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, Azza; AMIN, Maha M. EGFR, CD10 and proliferation marker Ki67 expression in ameloblastoma: possible role in local recurrence. **Diagnostic pathology**, v. 7, n. 1, p. 14, 2012.

ACIKALIN, M. F. et al. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. **Digestive and liver disease**, v. 37, n. 3, p. 162-169, 2005.

AHLFORS, Eva; LARSSON, Åke; SJÖGREN, Sven. The odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor?. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 1, p. 10-19, 1984.

AKIN, Cem. Mast cell activation disorders. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 3, p. 252-257. e1, 2014.

ALBERTS, Bruce et al. **Fundamentos da biologia celular**. Artmed Editora, 2002.

AL-OTAIBI, Ohoud et al. Syndecan-1 (CD 138) surface expression marks cell type and differentiation in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor, and dentigerous cyst. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, n. 2, p. 186-193, 2013.

ALLEN, Michael; LOUISE JONES, J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 163-177, 2011.

AMALINEI, CORNELIA et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-228, 2010.

ANANDANI, Chitra et al. Evaluation of mast cells in odontogenic cysts by toluidine blue & c-kit gene product (CD117). **Journal of Dental Specialities**, v. 5, n. 1, p. 40-45, 2017.

ANTSIFEROVA, Maria et al. Mast cells are dispensable for normal and activin-promoted wound healing and skin carcinogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 12, p. 6147-6155, 2013.

ANYANECHI, C. E.; SAHEEB, B. D. A review of 156 odontogenic tumours in Calabar, Nigeria. **Ghana medical journal**, v. 48, n. 3, p. 163-167, 2014.

ARAÚJO, N. e ARAÚJO, V. **Patologia Bucal**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1984.

ASANO-KATO, Naoko et al. Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 46, n. 12, p. 4622-4626, 2005.

BANSAL, S. et al. The occurrence and pattern of ameloblastoma in children and adolescents: an Indian institutional study of 41 years and review of the literature. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 6, p. 725-731, 2015.

BARNES, Leon et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumors**, 2005.

BARRETO, D. C. et al. Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. **Journal of dental research**, v. 81, n. 11, p. 757-760, 2002.

BARRETO, Rosimar et al. O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.

BASSEY, G. O.; OSUNDE, O. D.; ANYANECHI, C. E. Maxillofacial tumors and tumor-like lesions in a Nigerian teaching hospital: an eleven year retrospective analysis. **African health sciences**, v. 14, n. 1, p. 56-63, 2014.

BECKER, J. et al. Ectomesenchyme of ameloblastic fibroma reveals a characteristic distribution of extracellular matrix proteins. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 21, n. 4, p. 156-159, 1992.

BERKOVITZ, B.; HOLLAND, G. e MOXHAM, B. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BERTON, A. et al. Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 4, p. 485-492, 2000.

BIANCHI, Giovanna et al. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. **Histology and histopathology**, v. 26, n. 7, p. 941, 2011.

BITGOOD, Mark J.; MCMAHON, Andrew P. Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell-Cell Interaction in the Mouse Embryo. **Developmental biology**, v. 172, n. 1, p. 126-138, 1995.

BHARGAVA, Darpan; DESHPANDE, Ashwini; POGREL, M. Anthony. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT)—a cyst to a tumour. **Oral and maxillofacial surgery**, v. 16, n. 2, p. 163-170, 2012.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

BORRIELLO, Francesco et al. Immunopharmacological modulation of mast cells. **Current opinion in pharmacology**, v. 17, p. 45-57, 2014.

BROWN, Noah A.; BETZ, Bryan L. Ameloblastoma: a review of recent molecular pathogenetic discoveries. **Biomarkers in cancer**, v. 7, n. Suppl 2, p. 19, 2015.

BROWNE, R. M. The odontogenic keratocyst. Histological features and their correlation with clinical behaviour. **Brit dent J**, v. 131, p. 249-259, 1971.

BROOKS, John K. et al. Clinicopathologic characterization of oral angioleiomyomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 2, p. 221-227, 2002.

CAUGHEY, George H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immunological reviews**, v. 217, n. 1, p. 141-154, 2007.

CHATTERJEE, Shailja et al. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 7, n. 26, 2008.

CHEN, Hongming et al. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 5, p. 4438-4442, 2017.

CRIVELLATO, E.; RIBATTI, D. Role of inflammatory cells in angiogenesis. **Angiogenesis: basic science and clinical applications. Transworld Research Network**, p. 229-46, 2007.

CRIVELLATO, Enrico; NICO, Beatrice; RIBATTI, Domenico. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. **Cancer letters**, v. 269, n. 1, p. 1-6, 2008.

DA CONCEIÇÃO, Ana Carolina Alves et al. Tumor odontogênico queratocístico: atualidades. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 4, 2012.

DE NORONHA SANTOS NETTO, Juliana et al. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 8, p. 630-636, 2012.

DESMOULIERE, Alexis; GUYOT, Christelle; GABBIANI, Giulio. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 509-517, 2004.

DINIZ, Bárbara Brasileiro et al. Ceratocisto odontogênico: um relato de caso. **Archives of Health Investigation**, v. 7, 2018.

DIXON, Ian MC; CUNNINGTON, Ryan H. Mast cells and cardiac fibroblasts: accomplices in elevation of collagen synthesis in modulation of fibroblast phenotype. **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 142-144, 2011.

EFFIOM, O. A. et al. Ameloblastoma: current etiopathological concepts and management. **Oral Diseases**, 2017.

EL-NAGGAR, A. K. et al. WHO classification of head and neck tumours. **Lyon, France: IARC**, 2017.

ERYILMAZ, Tolga et al. Odontogenic keratocyst: an unusual location and review of the literature. **Annals of plastic surgery**, v. 62, n. 2, p. 210-212, 2009.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 287-300, 2001.

FERNANDES, M. M. S.; ETGES, A.; TORRIANI, M. O. Uso da Crioterapia com Nitrogênio Líquido em Lesões Intra-Ósseas dos Maxilares. **Revista brasileira de cirurgia buco-maxilo-facial**, v. 10, n. 2, p. 49-57, 2010.

GALE, Nina; POLJAK, Mario; ZIDAR, Nina. Update from the 4th edition of the world health organization classification of head and neck tumours: what is new in the 2017 WHO blue book for tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space. **Head and neck pathology**, v. 11, n. 1, p. 23-32, 2017.

GALLI, Stephen J.; NAKAE, Susumu; TSAI, Mindy. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 6, n. 2, p. 135, 2005.

GALLI, Stephen J.; BORREGAARD, Niels; WYNN, Thomas A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nature immunology**, v. 12, n. 11, p. 1035, 2011.

GALLI, Stephen J.; TSAI, Mindy. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 693, 2012.

GARBUZENKO, E1 et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 2, p. 237-246, 2002.

GOMES, Carolina Cavaliéri; GOMEZ, Ricardo Santiago. Odontogenic keratocyst: A benign cystic neoplasm?. **Oral oncology**, v. 43, n. 6, p. 619-620, 2007.

GOMES, Fausto Gueths et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. **Life sciences**, v. 92, n. 2, p. 101-107, 2013.

HANGELBROEK, Jele et al. Collagen in odontogenic tumours: a histochemical- and immunohistochemical study of 19 cases: peer reviewed original article. **Medical Technology SA**, v. 26, n. 1, p. 28-33, 2012.

HASSAN, H. T.; ZANDER, A. R. Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. In: **Molecular Biology of Hematopoiesis 5**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 549-558.

HEIKINHEIMO, K.; KURPPA, K. J.; ELENIUS, K. Novel targets for the treatment of ameloblastoma. **Journal of dental research**, v. 94, n. 2, p. 237-240, 2015.

HENLEY, J. et al. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. **Histopathology**, v. 47, n. 6, p. 582-586, 2005.

HENRIQUES, Águida Cristina Gomes et al. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 112, n. 4, p. 468-475, 2011.

HIRSHBERG, Abraham et al. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 28, n. 9, p. 410-412, 1999.

IRVINE, G. H.; BOWERMAN, J. E. Mandibular keratocysts: surgical management. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 23, n. 3, p. 204-209, 1985.

JHAMB, Tania; KRAMER, Jill M. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: implications for therapeutics. **Experimental and molecular pathology**, v. 97, n. 3, p. 345-353, 2014.

JUNQUEIRA, J. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

KANBE, Naotomo et al. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. **European journal of immunology**, v. 29, n. 8, p. 2645-2649, 1999.

KAYE, Frederic J. et al. Clinical and radiographic response with combined BRAF-targeted therapy in stage 4 ameloblastoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 1, 2015.

KAPLAN, Ilana; HIRSHBERG, Abraham. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. **Oral Oncology**, v. 40, n. 10, p. 985-991, 2004.

KETABCHI, S. et al. Expression of protease-activated receptor-1 and-2 in orofacial granulomatosis. **Oral diseases**, v. 13, n. 4, p. 419-425, 2007.

KITKUMTHORN, N. et al. Association of P53 codon 72 polymorphism and ameloblastoma. **Oral diseases**, v. 16, n. 7, p. 631-635, 2010.

KOLOKYTHAS, Antonia et al. Odontogenic keratocyst: to decompress or not to decompress? A comparative study of decompression and enucleation versus resection/peripheral ostectomy. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 65, n. 4, p. 640-644, 2007.

KRAMER, Ivor RH; PINDBORG, Jens Jørgen; SHEAR, Mervyn. **Histological typing of odontogenic tumours**. Springer Science & Business Media, 1992.

KRYSTEL-WHITTEMORE, Melissa; DILEEPAN, Kottarappat N.; WOOD, John G. Mast cell: a multi-functional master cell. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 620, 2016.

KUMAMOTO, Hiroyuki; OHKI, Kousuke; OOYA, Kiyoshi. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31, n. 1, p. 28-34, 2002.

KUMAMOTO, H. Molecular pathology of odontogenic tumors. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 35, n. 2, p. 65-74, 2006.

KURPPA, Kari J. et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **The Journal of pathology**, v. 232, n. 5, p. 492-498, 2014.

LASISI, Taye J.; ADISA, Akinyele O.; OLUSANYA, Adeola A. Appraisal of jaw swellings in a Nigerian tertiary healthcare facility. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 5, n. 1, p. e42, 2013.

LESTER, Susan C. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 133, n. 10, p. 1515-1538, 2009.

LI, T.-J. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm?. **Journal of dental research**, v. 90, n. 2, p. 133-142, 2011.

MADRAS, Jonathan; LAPOINTE, Henry. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 74, n. 2, 2008.

MAHAJAN, Aarti M. et al. The role of stroma in the expansion of odontogenic cysts and adenomatoid odontogenic tumor: A polarized microscopy study. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 316, 2013.

MALLMANN, Camila Taís et al. Tumor odontogênico ceratocístico-levantamento de casos e revisão de literatura. **Odonto**, v. 20, n. 40, p. 67-72, 2012.

MALTBY, Steven; KHAZAIE, Khashayarsha; MCNAGNY, Kelly M. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1796, n. 1, p. 19-26, 2009.

MANGIA, Anita et al. Tissue remodelling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1096-1106, 2011.

MARASTONI, S. et al. Extracellular matrix: a matter of life and death. **Connect Tissue Res**, v. 49, p. 203-6, 2008.

MARICHAL, Thomas; TSAI, Mindy; GALLI, Stephen J. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. **Cancer Immunology Research**, v. 1, n. 5, p. 269-279, 2013.

MARONE, Gianni; GALLI, Stephen J.; KITAMURA, Yukihiro. Probing the roles of mast cells and basophils in natural and acquired immunity, physiology and disease. **Trends in immunology**, v. 23, n. 9, p. 425-427, 2002.

MAURETTE, Paul Edward; JORGE, Jacks; DE MORAES, Marcio. Conservative treatment protocol of odontogenic keratocyst: a preliminary study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 3, p. 379-383, 2006.

MCCLARY, Andrew C. et al. Ameloblastoma: a clinical review and trends in management. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 7, p. 1649-1661, 2016.

MEISELMAN, Frederick. Surgical management of the odontogenic keratocyst: conservative approach. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 52, n. 9, p. 960-963, 1994.

MENDENHALL, William M. et al. Ameloblastoma. **American journal of clinical oncology**, v. 30, n. 6, p. 645-648, 2007.

METCALFE, Dean D.; BARAM, Dana; MEKORI, Yoseph A. Mast cells. **Physiological reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

METCALFE, Dean D.; BOYCE, Joshua A. Mast cell biology in evolution. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 117, n. 6, p. 1227-1229, 2006.

MOHTASHAM, Nooshin et al. Mast cell density and angiogenesis in oral dysplastic epithelium and low-and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 68, n. 5, p. 300-304, 2010.

MOSHREF, M. et al. Evaluation of CD31 expression and mast cell count in dysplastic lesions and squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 2010, n. 3, p. 272-276, 2010.

MOURE, Sabrina P. et al. Collagen and elastic fibers in odontogenic entities: Analysis using light and confocal laser microscopic methods. **The open dentistry journal**, v. 5, p. 116, 2011.

MURAMATSU, Michiko et al. Chymase as a Proangiogenic Factor A Possible Involvement Of Chymase-Angiotensin-Dependent Pathway In The Hamster Sponge Angiogenesis Model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5545-5552, 2000.

NAYAK, V. N. et al. Comparative evaluation of collagen fibers in Odontogenic Keratocyst and Unicystic Ameloblastoma. **World Journal of Dentistry**, v. 2, n. 2, p. 125-27, 2011.

NEVILLE, Brad. **Patologia oral e maxilofacial**. Elsevier Brasil, 2016.

OGINNI, F. O. et al. A prospective epidemiological study on odontogenic tumours in a black African population, with emphasis on the relative frequency of ameloblastoma. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 9, p. 1099-1105, 2015.

OOMENS, Marjolijn AE M.; VAN DER WAAL, Isaïc. Epidemiology of ameloblastomas of the jaws; A report from the Netherlands. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 19, n. 6, p. e581, 2014.

OLUSANYA, A. A. et al. Gross surgical features and treatment outcome of ameloblastoma at a Nigerian tertiary hospital. **African journal of medicine and medical sciences**, v. 42, n. 1, p. 59-64, 2013.

OTRANTO, Marcela et al. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. **Cell adhesion & migration**, v. 6, n. 3, p. 203-219, 2012.

PATIDAR, K. A. et al. Mast cells in human odontogenic cysts. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 6, p. 397-402, 2012.

PEREIRA, Francisco de Assis Caldas et al. Distribution of mast cells in benign odontogenic tumors. **Tumor Biology**, v. 33, n. 2, p. 455-461, 2012.

PINDBORG, J. J.; HANSEN, Jes. Studies on odontogenic cyst epithelium. **APMIS**, v. 58, n. 3, p. 283-294, 1963.

PINDBORG, Jens Jørgen. Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions. **International histological classification of tumours**, v. 5, 1971.

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

POGREL, M. Anthony. Decompression and marsupialization as definitive treatment for keratocysts—a partial retraction. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 65, n. 2, p. 362-363, 2007.

POGREL, M. A. The keratocystic odontogenic tumour (KCOT)—an odyssey. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 12, p. 1565-1568, 2015.

RAJ, YuKti et al. Evaluation of the Nature of Collagen Fibers in KCOT, Dentigerous Cyst and Ameloblastoma using Picrosirius Red Stain—A Comparative Study. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 11, p. ZC01, 2015.

REGEZI, J.A; SCIUBA, J.J; JORDAN R.C.K. **Patologia Oral: Correlações Clinicopatológicas**. 6ª edição. Elsevier, 2013.

REGEZI, Joseph. **Patologia oral: correlações clinicopatológicas**. Elsevier Brasil, 2017.

REICHENBERGER, E. et al. Collagen XII mutation disrupts matrix structure of periodontal ligament and skin. **Journal of dental research**, v. 79, n. 12, p. 1962-1968, 2000.

RIBATTI, Domenico; CRIVELLATO, Enrico; MOLICA, Stefano. Mast cells and angiogenesis in haematological malignancies. **Leukemia research**, v. 33, n. 7, p. 876-879, 2009.

RIBEIRO JUNIOR, O. et al. Complications of Carnoy solution in the treatment of odontogenic tumors. **RGO**, v. 55, p. 263-266, 2007.

RIGONI, Alice et al. Mast cells infiltrating inflamed or transformed gut alternatively sustain mucosal healing or tumor growth. **Cancer research**, v. 75, n. 18, p. 3760-3770, 2015.

ROBBINS, S.; KUMAR, V.; COTRAN, R. **Pathologic Basis of Disease**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1994.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J.; KAYE, G. I. **Histology: A text and atlas** 3rd ed. 1995.

RUBIN, Raphael et al. (Ed.). **Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

SAFADI, Rima A.; QUDA, Basma F.; HAMMAD, Huda M. Immunohistochemical expression of K6, K8, K16, K17, K19, maspin, syndecan-1 (CD138), α -SMA, and Ki-67 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma: diagnostic and prognostic correlations. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 121, n. 4, p. 402-411, 2016.

SCHNEIDER, Lars A. et al. Molecular mechanism of mast cell-mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 11, p. 2629-2639, 2007.

SEIFI, Safoura et al. Evaluation of mast cell and blood vessel density in inflammatory periapical lesions. **Journal of Mashhad Dental School**, v. 36, n. 2, p. 121-132, 2012.

SHAFER, William G. et al. **A textbook of oral pathology**. Philadelphia: Saunders, 1983.

SHARIF, F. N. H. et al. Interventions for the treatment of keratocystic odontogenic tumors. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, 2010.

SHEAR, Mervyn. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. **Oral oncology**, v. 38, n. 4, p. 323-331, 2002.

SHETTY, Anusha et al. Study of polarization colors in the connective tissue wall of odontogenic cysts using picosirius red stain. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 7, n. 2, p. 119, 2015.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929-958, 2009.

SIAR, Chong Huat et al. Notch4 overexpression in ameloblastoma correlates with the solid/multicystic phenotype. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 110, n. 2, p. 224-233, 2010.

SHYLAJA, S. Mast cells in odontogenic cysts. **J Clin Diagn Res**, v. 4, n. 1, p. 2226-36, 2010.

SILVEIRA, Éricka Janine Dantas da et al. Role of matrix metalloproteinases in the etiopathogeny of odontogenic cysts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 203-209, 2007.

SINGH, Harkanwal Preet et al. A quantitative and qualitative comparative analysis of collagen fibers to determine the role of connective tissue stroma on biological behavior of odontogenic cysts: a histochemical study. **National journal of maxillofacial surgery**, v. 3, n. 1, p. 15, 2012.

SOLUK-TEKKEPÝN, Merva; WRIGHT, John M. The World Health Organization Classification of Odontogenic Lesions: A Summary of the Changes of the 2017 (4th) Edition. 2017.

SPEIGHT, Paul M.; TAKATA, Takashi. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. **Virchows Archiv**, p. 1-9, 2017.

STEFANIK, D. et al. Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate. **Oral diseases**, v. 14, n. 5, p. 465-471, 2008.

STOCKMANN, Christian et al. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 69, 2014.

SWEENEY, Robert T. et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nature genetics**, v. 46, n. 7, p. 722-725, 2014.

TERONEN, Olli et al. Mast cell-derived tryptase in odontogenic cysts. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 25, n. 7, p. 376-381, 1996.

THEOHARIDES, Theoharis C.; CONTI, Pio. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. **Trends in immunology**, v. 25, n. 5, p. 235-241, 2004.

ULLAH, Ehsan et al. Angiogenesis and mast cell density as predictors of patient survival in squamous cell carcinoma of lung. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 701, 2013.

VERED, Marilena et al. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral oncology**, v. 41, n. 10, p. 1028-1033, 2005.

VIJ, Ruchieka; VIJ, Hitesh; RAO, Nirmala N. Evaluation of collagen in connective tissue walls of odontogenic cysts—A histochemical study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 257-262, 2011.

VISWANATHAN, S.; VENKATAPATHY, R.; DANASEKARAN, B. Role of collagen fibres in the expansion of odontogenic cysts—A Histochemical Study. **The Internet Journal of Pathology**, v. 11, n. 2, 2010.

VONG, Sylvia; KALLURI, Raghu. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. **Genes & cancer**, v. 2, n. 12, p. 1139-1145, 2011.

VOORSMIT, R. A. The incredible keratocyst: a new approach to treatment. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 40, n. 6, p. 641, 1985.

WAHLGREN, Jaana et al. Expression and induction of collagenases (MMP- 8 and-13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. **The Journal of pathology**, v. 194, n. 2, p. 217-224, 2001.

WEINBERG, Robert. **The biology of cancer**. Garland science, 2013.

WENIG, Bruce M. **Atlas of Head and Neck Pathology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2015.

WERNER-BUSSE, Alexandra; ZUBERBIER, Torsten; WORM, Margitta. The allergic emergency–management of severe allergic reactions. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 5, p. 379-388, 2014.

WILSON, D. F. et al. **Oral diseases in the tropics**. Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited, 2017.

WOO, S. B. **Atlas de patologia oral**. 1. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2013.

WRIGHT, John M. et al. Odontogenic tumors, WHO 2005: where do we go from here?. **Head and neck pathology**, v. 8, n. 4, p. 373-382, 2014.

ANEXO A – Declaração de Anuência e autorização do uso de dados da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
LABORATÓRIO DE HISTOPATOLOGIA ORAL

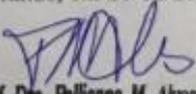
CARTA DE ANUÊNCIA COM AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos (o) a pesquisador (a) RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA, a desenvolver o seu projeto de pesquisa ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO, que está sob a orientação do(a) Prof. (a) GUSTAVO PINA GODOY cujo objetivo é identificar características do microambiente tumoral de Ameloblastoma sólido e Tumor odontogênico ceratocístico, através de análise histopatológica e técnicas histomorfométricas computadorizadas, nesta Instituição, bem como cederemos o acesso aos dados do arquivo de lâminas histológicas e blocos para serem utilizados na referida pesquisa.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o/a mesmo/a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Campina Grande, em 21/06/2017.


Prof. Dra. Pollianna M. Alves
PATÓLOGISTA BUCAL
C.R.O. 3657

Pollianna Muniz Alves

ANEXO B – Declaração de Anuência e autorização do uso de dados da Universidade Federal do Rio Grande do Norte



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

AUTORIZAÇÃO DE USO DE ARQUIVOS/DADOS DE PESQUISA

Declaro para os devidos fins, que cederemos ao pesquisador RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA, o acesso aos arquivos de lâminas histológicas e blocos para serem utilizados na pesquisa: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO, que está sob a orientação do/a Prof. GUSTAVO PINA GODOY.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o(a) mesmo(a) a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

A handwritten signature in blue ink, which reads "Éricka Janine Dantas da Silveira". Below the signature, there is a small rectangular stamp containing the text "Prof. Éricka Janine Dantas da Silveira" and "03/02/2014".

Profª Dra Éricka Janine Dantas da Silveira
Professora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
Patologista do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Odontologia da UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

CARTA DE ANUÊNCIA COM AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos (o) a pesquisador (a) RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA, a desenvolver o seu projeto de pesquisa ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO, que está sob a orientação do(a) Prof. (a) GUSTAVO PINA GODOY cujo objetivo é identificar características do microambiente tumoral de Ameloblastoma sólido e Tumor odontogênico ceratocístico, através de análise histopatológica e técnicas histomorfológicas computadorizadas, nesta Instituição, bem como cederemos o acesso aos dados do arquivo de lâminas histológicas e blocos para serem utilizados na referida pesquisa.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o/a mesmo/a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

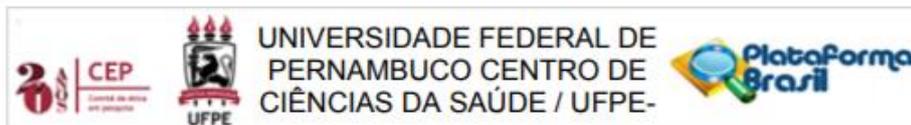
Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Natal, 12 de junho de 2017

Ericka Silveira
Colaboradora do Serviço de Histopatologia do Departamento de odontologia da UFRN

Ericka Silveira
Cirurgiã - Dentista
CRO:2343-RN

ANEXO C – Parecer do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL EM AMELOBLASTOMA E TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO

Pesquisador: RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70797017.9.0000.5208

Instituição Proponente: Departamento de Pós Graduação em Patologia- UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.219.558

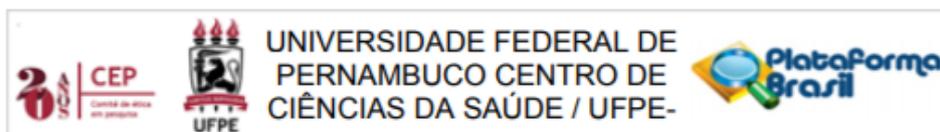
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação apresentado ao programa de pós-graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde - UFPE, de autoria de Rodrigo Csillaz de Souza, para obtenção do grau de Mestre em Patologia, sob orientação do prof Gustavo Pina Godoy, e co-orientação do prof. Mário Ribeiro de Melo-Junior. Diz respeito a um estudo observacional descritivo de caráter qualiquantitativo e com corte transversal, consistindo em uma análise histoquímica descritiva e comparativa em lesões diagnosticadas como AS e TOC, para o qual serão selecionados 40 blocos de parafina contendo fragmentos das lesões, obtidas através de biópsias realizadas em pacientes diagnosticadas como ameloblastoma sólido (20 casos) e tumor odontogênico ceratocístico (20 casos) no serviço de patologia oral nos laboratórios da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e Universidade Federal do Rio Grande do Norte (RN), localizados respectivamente em Campina Grande (PB) e Natal (RN). O critério de inclusão e exclusão dos blocos foram devidamente descritos, bem como a análise histopatológica, histomorfométrica e estatística.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa é Identificar características do microambiente tumoral de Ameloblastoma sólido - AS e Tumor odontogenico ceratocístico - TOC, através de análise histopatológica e utilizando técnicas histomorfométricas computadorizadas.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.219.558

Os objetivos específicos são:

*Avaliar as principais alterações histopatológicas do ambiente tumoral associado às lesões odontogênicas estudadas;

*Analisar a deposição de colágenos e a densidade dos mastócitos associadas ao AS e TOC;

*Comparar os resultados obtidos entre as lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram devidamente descritos. Os riscos consistem na probabilidade de ocorrer extravio ou perda dos blocos de parafina obtidos nos laboratórios de patologia oral da UEPB e UFRN para confecção das lâminas histológicas como também degradação dos blocos. Para minimizar os riscos de degradação dos blocos, a secção respeitará a espessura de 5 micras observando o desgaste e a disponibilidade da amostra biológica. Também serão confeccionadas no máximo 4 lâminas de cada bloco e usando insumos de qualidade padrão. Após a microtomia, os blocos serão catalogados e devolvidos assim que realizada a confecção das lâminas.

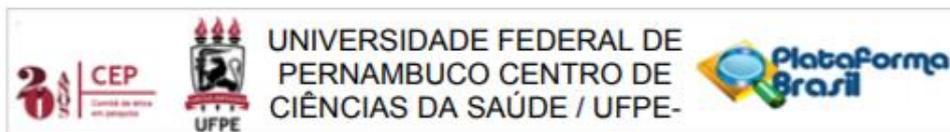
Quanto aos benefícios, os autores referem que ao oferecer informações adicionais a respeito da patogênese das lesões odontogênicas estudadas nesta pesquisa, o benefício será a obtenção de conhecimentos mais detalhados que envolvem mecanismos de progressão dessas lesões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é justificada em face de que os tumores odontogênicos constituem lesões de frequência relativamente comum dentre as neoplasias encontradas nos ossos gnáticos, com histogênese associada a remanescentes epiteliais e/ou ectomesenquimais relacionados à odontogênese. Entre os vários tipos de tumores odontogênicos, os ameloblastomas e os tumores odontogênicos ceratocísticos merecem destaque, ambos com comportamento agressivo localmente e vasta recorrência. Isto posto, destacam que considerando a importância do estroma tumoral e do colágeno no processo de desenvolvimento do tumor, a análise histomorfométrica quantitativa e qualitativa do colágeno poderá contribuir na compreensão dos mecanismos de patogênese e do comportamento biológico do ameloblastoma sólido e do tumor odontogênico ceratocístico. O entendimento desse tecido estromal pode também ser útil no desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e de monitoramento dessas lesões, dentre elas auxiliar no entendimento de características inerentes ao comportamento biológico dessas lesões, como a capacidade infiltrativa dessas enfermidades, bem como a possibilidade de formação ou não de abaulamento de corticais ósseas pelas respectivas lesões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.219.558

Quanto aos documentos obrigatórios, foram apresentados:

- 1) FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, assinada e carimbada nos campos de Pesquisador Responsável e Instituição Proponente.
- 2) CARTAS DE ANUÊNCIA com autorização do uso de dados do laboratório de Histopatologia oral, do departamento de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e do Programa de Pós-graduação em Patologia - Centro de Ciências da Saúde/UFPE (todas timbradas, assinadas e carimbadas, com referência à Resolução 466/12)
- 3) DOCUMENTO DE DISPENSA DE TCLE, justificado por serem utilizados unicamente dados secundários na referida pesquisa;
- 4) CURRÍCULO LATTES de todos os pesquisadores da referida pesquisa;
- 5) PROJETO DETALHADO, apresentando o cronograma adequado, e orçamento financeiro detalhado, como de inteira responsabilidade do pesquisador principal, e destacando que os dados coletados nesta pesquisa (blocos de parafina e lâminas histológicas) ficarão armazenados em caixas específicas para armazenamento e pasta-arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço indicado, pelo período de mínimo 5 anos.
- 6) TERMO DE CONFIDENCIALIDADE assinado pelo pesquisador responsável;
- 7) DECLARAÇÃO DE VINCULO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

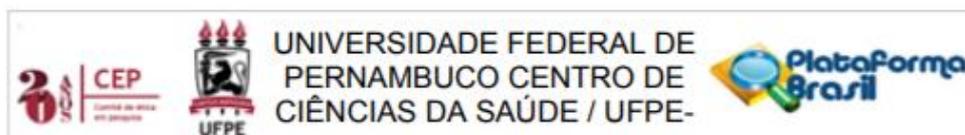
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



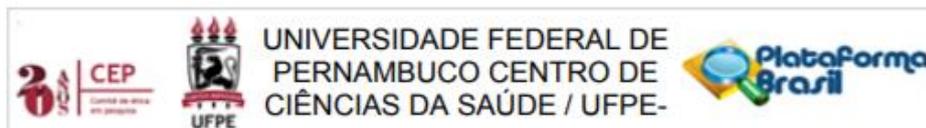
Continuação do Parecer: 2.219.558

Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|--|------------------------|-----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_935213.pdf | 09/08/2017 16:03:36 | | Aceito |
| Outros | cartapendencias.docx | 09/08/2017 15:51:02 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | anunciapospatufpe.pdf | 09/08/2017 15:50:34 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoRodrigomodificado.docx | 09/08/2017 15:47:40 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Rodrigow.docx | 05/07/2017 14:21:27 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | mario.pdf | 02/07/2017 20:14:25 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | uepb.pdf | 02/07/2017 18:31:59 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | declaracao_vinculo.pdf | 26/06/2017 10:42:45 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosto.pdf | 26/06/2017 10:42:14 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | RodrigoCsillazdeSousa.pdf | 25/06/2017 17:43:46 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | GustavoPinaGodoy.pdf | 25/06/2017 17:43:02 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | dispensa_tcle.pdf | 25/06/2017 17:28:21 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.219.558

| | | | | |
|--------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------|--------|
| Outros | autorizacao_uso_dados_UFRN.pdf | 25/06/2017 17:27:43 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | anuencia_ufrn.jpg | 25/06/2017 17:27:07 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |
| Outros | termo_confidencialidade.pdf | 25/06/2017 17:25:50 | RODRIGO CSILLAZ DE SOUSA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 15 de Agosto de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepcca@ufpe.br