



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



ANAÍRA RIBEIRO GUEDES FONSECA COSTA

**EXPRESSÃO DE CALRETININA EM TUMORES
ODONTOGÊNICOS EPITELIAIS BENIGNOS E
MALIGNOS**

UBERLÂNDIA

2017

ANAÍRA RIBEIRO GUEDES FONSECA COSTA

**EXPRESSÃO DE CALRETININA EM TUMORES
ODONTOGÊNICOS EPITELIAIS BENIGNOS E
MALIGNOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

UBERLÂNDIA

2017



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Anaíra Ribeiro Guedes Fonseca Costa** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **09 de novembro de 2017**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Anaíra Ribeiro Guedes Fonseca Costa, COM O TÍTULO: - "EXPRESSÃO DE CALRETININA EM TUMORES ODONTOGÊNICOS EPITELIAIS BENIGNOS E MALIGNOS"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

Uberlândia, 09 de novembro de 2017

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Profa. Dra. Gabriella Lopes de Rezende Barbosa
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Profa. Dra. Karla Zancopé
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

APROVADA

Aprovado/Reprovado

Frederick Khalil Karam
Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU

Aprovado/Reprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me incentivar em tudo o que eu tentei me tornar. À minha mãe, Edilamar, por ter me proporcionado sempre a melhor educação, à custa de incontáveis sacrifícios; o último deles, a solidão. Ao meu pai, Juarez, por apoiar incondicionalmente e possibilitar a realização deste sonho, mesmo após eu desistir de outro. Aos meus irmãos Raoni e Taiubi, por constituírem exemplos sólidos em suas profissões, sendo ambos grandes inspirações para mim.

Ao meu companheiro Eduvaldo, por sempre estar um passo à frente e me guiar pacientemente pelos obstáculos já conhecidos. Sou grata pelos quatro anos que trilhamos juntos na universidade e pelas memórias felizes dessa época. À minha amiga Stephany, por ter compartilhado comigo o mesmo sonho e uma jornada muito semelhante. Embora tenhamos nos tornado colegas de profissão, mas não mais de universidade, agradeço por dispor de sua franca amizade, ainda que à distância.

Às minhas amigas e parceiras Andressa, Paula e Ana Carolina, com as quais partilhei uma rotina integral de dedicação à Odontologia, agradeço, acima de tudo, pela paciência. Acompanhar o desenvolvimento de vocês contribuiu para o meu próprio, assim como conhecer um pouco da vida de cada uma me inspirou a ser uma pessoa melhor. Aos meus amigos engenheiros, Victor, Kennedy, Lorena e Rafael, agradeço pelo ano que passamos juntos, sem dúvidas um dos mais felizes que já vivi, graças à companhia de vocês.

Aos professores e técnicos, pela disposição em ensinar a arte e a ciência da Odontologia. Sou grata principalmente àqueles dos quais tornei-me mais próxima e que considero exemplos de vida e de profissão: os professores Adriano, Sérgio, Dhiancarlo, Fabrícia, Luiz Fernando, Gabriella, João César, Simone, Marcus, Ailton (*in memoriam*) e Fábio. Agradeço, ainda, aos atuais e ex-alunos da pós-graduação e residência: Rafaella, Livia, Tiago, João Paulo, Cássio, Aline, Roberta, Vinicius, Damillys, Soninha, Cibelly e Renata.

Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Adriano pelos dois anos e meio durante os quais estive sob sua orientação, assimilando valores não somente profissionais, mas também políticos e filosóficos. Sou muito grata por ter aberto as portas da Patologia para mim, e estou feliz por ter entrado e continuar seguindo este caminho. Agradeço à equipe do Laboratório de Patologia, Prof. Sérgio, Adalci e Lúbia, por terem gentilmente me recebido quase todos os dias neste último ano e que se tornaram uma família para mim.

Aos pacientes, serei grata durante toda a minha vida profissional pela paciência e confiança ainda no meus primeiros tímidos passos como cirurgiã-dentista.

*“Ora, lege, lege, lege, relege, labora et
invenies.”*

(Mutus Liber)

SUMÁRIO

Resumo	07
Introdução	09
Materiais e Métodos	
Seleção da Amostra	13
Ensaio Imuno-histoquímico	13
Análise da Imunomarcagem	14
Descrição e análise dos dados	15
Resultados	
Dados sociodemográficos e clinicopatológicos	16
Dados imuno-histoquímicos	17
Discussão	22
Conclusão	26
Referências	27
Anexos	31

RESUMO

Os tumores odontogênicos (TO) constituem um grupo heterogêneo de lesões cuja complexidade morfológica e comportamento variado tem motivado a investigação de marcadores de diagnóstico e prognóstico. A calretinina é uma proteína ligante de cálcio que apresenta imunorreatividade ao epitélio odontogênico, identificada em TOs com diferenciação ameloblástica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de calretinina em diferentes TOs para avaliar sua utilidade como dado auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões e na avaliação de prognóstico. Foram avaliados 17 casos de ameloblastoma, sete ameloblastomas unicísticos (AMEU), seis tumores odontogênicos adenomatoides (TOA), 15 carcinomas ameloblásticos (CAME) e cinco carcinomas odontogênicos de células claras (COCC). Foram realizados ensaios imuno-histoquímicos utilizando a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase com anticorpo policlonal anti-calretinina humana. A análise da imunomarcção foi realizada através do método *Quickscore*, traduzindo o produto da proporção de células positivas pela intensidade de marcação em citoplasma e núcleo das células centrais e periféricas. A expressão de calretinina foi observada em 14 ameloblastomas, três AMEUs, oito CAMEs e três COCCs, localizada preferencialmente no citoplasma das células centrais, sendo mais intensa nas áreas de metaplasia escamosa e granular. A análise dos dados mostrou diferença significativa na distribuição de positividade entre carcinomas e ameloblastomas em comparação com o TOA e entre os casos agressivos e não agressivos. Resultados semelhantes foram observados para os *Quickscores*. Conclui-se que a calretinina pode ser considerada um marcador específico para a diferenciação entre ameloblastomas e carcinomas odontogênicos com o TOA e para a diferenciação entre lesões agressivas e não agressivas.

Palavras-chave: tumores odontogênicos; calretinina; imuno-histoquímica; odontogênese; prognóstico.

ABSTRACT

Odontogenic tumors (OTs) are a group of heterogeneous lesions whose morphological complexity and variable behavior have motivated the search for diagnosis and prognosis markers. Calretinin is a calcium-binding protein that presents immunoreactivity for odontogenic epithelium and has been identified in OTs with ameloblastic differentiation. The aim of this study was to assess the expression of calretinin in different OTs in order to evaluate its applicability as an adjunct data in the differential diagnosis of these lesions and in the definition of prognosis. A total of 17 cases of ameloblastoma (AME), seven unicystic ameloblastomas (UAME), six adenomatoid odontogenic tumors (AOT), 15 ameloblastic carcinomas (AMECA) and five clear cell odontogenic carcinomas (CCOC) were assessed. Immunohistochemical assays were performed with streptavidin-biotin-peroxidase technique with polyclonal rabbit anticalretinin antibody. Analysis of immunostaining was performed with Quickscore method, translating the product of the proportion of positive cells by the intensity of stain in the cytoplasm and nucleus of central and peripheral cells. Calretinin expression was observed in 14 AMEs, three UAMEs, eight AMECAs and three CCOCs, mainly located in the cytoplasm of central cells and with higher intensity in areas of squamous and granular metaplasia. Data analysis demonstrated significant differences in the distribution of positive cases among carcinomas and ameloblastomas in comparison with AOT and between aggressive and non-aggressive lesions. Similar results were observed in the Quickscore analysis. In conclusion, calretinin can be considered a specific marker for differential diagnosis of ameloblastomas and carcinomas with AOT and for the differentiation between aggressive and non-aggressive lesions.

Keywords: odontogenic tumors; calretinin; immunohistochemistry; odontogenesis; prognosis.

1. INTRODUÇÃO

Os ossos gnáticos sediam uma grande variedade de lesões, em parte devido à presença dos tecidos envolvidos na odontogênese. Tais lesões, cujas origens são atribuídas ao tecido odontogênico e seus remanescentes, podem exibir um curso biologicamente agressivo e ser de difícil diagnóstico. A histopatologia tradicional continua sendo o pilar para o diagnóstico destas lesões, enquanto a expressão gênica e detecção antigênica específica por técnicas moleculares e de imuno-histoquímica, respectivamente, contribuem de forma complementar para o diagnóstico (REGEZI, 2002).

Os tumores odontogênicos constituem um grupo heterogêneo de lesões que variam desde proliferações não neoplásicas de tecidos até tumores benignos e malignos com potencial metastático. Originam-se de células epiteliais e/ou ectomesenquimais da odontogênese. Estes tumores são, de maneira geral, raros, mas representam desafios diagnósticos e terapêuticos significativos (BARNES et al., 2005; WRIGHT e VERED, 2017).

O diagnóstico preciso dos tumores odontogênicos é fundamental para a formulação terapêutica e prognóstica adequada. Contudo, identifica-se, com frequência, uma sobreposição morfológica entre estas lesões, o que limita o seu diagnóstico preciso. Para vencer estas dificuldades e, ao mesmo tempo, aperfeiçoar o diagnóstico histopatológico das mesmas, a técnica imuno-histoquímica tem sido empregada, tendo como princípio a identificação de antígenos que seriam próprios à doença sob análise. Trata-se de uma técnica rápida e pouco dispendiosa, que, além de aperfeiçoar o diagnóstico, abre caminhos para investigação de alterações que justifiquem o padrão de expressão obtido para determinado antígeno tumoral, especialmente no campo da biologia celular e molecular (MOURTZOUKOU, FISHER e THWAY, 2015; FISHER, 2011).

A complexidade no diagnóstico dos tumores odontogênicos se deve, em grande parte, à raridade destas lesões e à consequente dificuldade em ganhos de experiência durante a sua avaliação. A atenção cuidadosa à morfologia, associada às características clínicas e radiográficas, são necessárias ao estabelecimento do diagnóstico. Quando isto não for possível, a análise imuno-histoquímica pode ser útil. Os marcadores imuno-histoquímicos podem não ser específicos e tampouco sensíveis o bastante para auxiliar no diagnóstico, porém desenvolvem, em alguns casos, um papel significativo na diferenciação destas lesões (JOSHI et al., 2015).

Vários marcadores imuno-histoquímicos são atualmente utilizados no diagnóstico diferencial de tumores odontogênicos e não-odontogênicos, como as citoqueratinas CK1,

CK5/6, CK7, CK10, CK13, CK14, CK18 e CK19, os antígenos Ki-67, CD-34, CD-44, CD-56, CD-68, as proteínas apoptóticas Bcl-2, BAX, p53, a beta-catenina, o fator de transcrição SOX2, o antígeno PCNA, e as proteínas S-100, com impacto variável sobre a possibilidade de diagnóstico diferencial entre os tumores (HUNTER e SPEIGHT, 2014).

A calretinina (CR) é uma proteína ligante de cálcio intracelular predominantemente citosólica, codificada pelo gene *CALB2* localizado no cromossomo 16q22.2 em humanos. Foi primeiramente identificada como um DNA clone (cDNA) da retina da galinha, sendo por isso denominada calretinina (**cálcio + retina**) (ROGERS, 1987). Pertence à família de proteínas *EF-hand* e sub-família da calbindina, cujos membros compartilham de seis domínios estruturados como hélice-*loop*-hélice, conhecidos como domínios *EF-hand*. Estas estruturas moleculares foram identificadas pela primeira vez na estrutura em cristal da parvalbumina, sendo assim denominadas devido às hélices E e F desta proteína. O domínio *EF-hand* é composto por duas alfa-hélices com aproximadamente 10 aminoácidos e um *loop* quelante de íons cálcio com 12 aminoácidos. A segunda alfa-hélice apresenta uma orientação perpendicular em relação à primeira, assemelhando-se com os dedos polegar e indicador esticados de uma mão humana (KRETSINGER et al., 1973; REVETT et al., 1997).

A calretinina possui uma massa molecular de 30-31 kDa (média de 29 kDa) e aproximadamente 269 a 273 aminoácidos (mais comumente 271 aminoácidos) (ROGERS, 1987; STEVENS e ROGERS, 1997). Possui seis domínios *EF-hand* e cinco sítios ligantes funcionais de íons cálcio (Ca^{2+}). Os primeiros cinco domínios *EF-hand* constituem os sítios funcionais, enquanto o sexto domínio é inativo. Quatro destes domínios funcionais são sítios de ligação cooperativos e o quinto é um sítio de ligação independente. Os sítios cooperativos formam dois pares, EF1-2 e EF3-4, com propriedades de ligação semelhantes. O quinto sítio, EF5, possui uma afinidade muito baixa por Ca^{2+} , indicando que raramente está em forma ligante no citoplasma, exceto quando próximo a canais de Ca (FAAS et al., 2007).

Os pares cooperativos da calretinina influenciam uns aos outros de forma alostérica. Considerando um destes pares, quando um sítio ligante está em estado tenso, com baixa afinidade e taxas de ligação lentas, o outro permanece desocupado. Por outro lado, quando um sítio de ligação está ocupado, o outro permanece em estado relaxado, com alta afinidade por íons Ca e taxas rápidas de ligação.

Tal propriedade é responsável pela regulação não linear de Ca^{2+} realizada pela calretinina. Quando uma elevação curta e limitada da concentração intracelular íons Ca ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ocorre em uma célula com níveis basais de cálcio (50-100nM), a calretinina atua como um típico *buffer* (ligante temporário) de iniciação lenta. Em contrapartida, quando este

mesmo aumento ocorre em uma célula com elevada $[Ca^{2+}]_i$ (1 μM), na qual o primeiro sítio de um dos pares cooperativos está em forma de ligação, a calretinina atua como um *buffer* rápido. A velocidade de *buffer* da calretinina, é, portanto, fortemente dependente dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ no momento em que ocorre outra elevação citosólica deste íon. Além de suas propriedades como *buffer* de Ca, a calretinina também sofre alterações conformacionais dependentes de Ca^{2+} , o que indica também o seu papel como proteína sensora (SCHWALLER, 2008; 2014).

O papel biológico da calretinina ainda não foi completamente elucidado, porém suas possíveis funções, além da manutenção dos níveis citosólicos de Ca e da sinalização intracelular, incluem a modulação do processo de apoptose, regulação da expressão de fatores de crescimento e mediação dos processos celulares de proliferação, diferenciação e transformação neoplásica (HEIZMANN, 1992; SHERBET, 2010; SUNDAGARI et al., 2010).

Sua expressão é abundante no sistema nervoso central e periférico, assim como em células não neurais, por exemplo, as células mesoteliais, adipócitos, mastócitos, no fuso muscular, nas camadas superficiais queratinizadas do infundíbulo pilar, nos túbulos contorcidos dos rins, nas glândulas écrinas, nas células de Leydig e Sertoli, nas células estromais dos ovários, nas ilhotas pancreáticas e na cortical das adrenais. Além de sua expressão nos tecidos humanos normais, a calretinina também pode ser encontrada em uma grande variedade de neoplasias, principalmente em mesoteliomas, tumores dos cordões sexuais, da cortical da adrenal, do sistema nervoso central, em tumores de tecidos moles, por exemplo, lipomas, lipossarcomas, Schwannomas e tumor de células granulares, entre vários outros (DOGLIONI et al., 1996; LUGLI et al., 2003; ORDÓÑEZ, 2014).

Como marcador imuno-histoquímico, a calretinina é considerada altamente sensível e específica para o diagnóstico diferencial entre mesotelioma epitelióide e adenocarcinoma pulmonar (CARELLA, 2001; ABUTAILY, ADDIS & ROCHE, 2002), entre células mesoteliais reativas e carcinomas em efusões (BARBERIS et al., 1997; CHHIENG et al., 2000; SIMSIR et al., 2001), bem como para a identificação de mixoma cardíaco (TERRACCIANO et al., 2000), de tumores dos cordões sexuais (CAO, JONES e LI, 2001; MCCLUGGAGE e MAXWELL, 2001; MOVAHEDI-LANKARANI e KURMAN, 2002), para o diagnóstico de neuroblastoma olfatório (WOOFF et al., 2011) e doença de Hirschprung (MUSA et al., 2017).

A calretinina apresenta também imunorreatividade ao epitélio odontogênico de ratos, principalmente ao órgão do esmalte durante a odontogênese (ALTINI et al., 2000; MISTRY,

2001). Além disso, sua expressão foi estudada nos tecidos de estruturas faríngeas e bucais destes animais, incluindo a polpa dentária, ligamento periodontal e fibras nervosas (MISTRY, 2001; ICHIKAWA, DEGUCHI e SUGIMOTO, 1992; ICHIKAWA et al., 1994. ICHIKAWA, JACOBOWITZ e SUGIMOTO, 1997). Inicialmente, acreditava-se que a calretinina atuava transportando íons cálcio através do citoplasma do ameloblasto para a matriz do esmalte, sendo responsável por sua mineralização (MISTRY et al., 2001), porém, tendo em vista o seu pico de expressão nos pré-ameloblastos ao fim da campânula e a sua *down-regulation* após a histomorfodiferenciação do epitélio interno e secreção da matriz (HUBBARD et al., 2011), a função desta proteína parece estar associada à diferenciação celular de maneira inversamente proporcional.

A partir destes estudos em modelos animais surgiram outros analisando a expressão de calretinina em diferentes lesões odontogênicas em humanos. A calretinina foi identificada em ameloblastomas sólidos e unicísticos (ALTINI et al., 2000; ALAEDDINI et al., 2008; DEVILLIERS, et al., 2008; D'SILVA et al., 2023; ANANDANI et al., 2014), bem como em carcinomas ameloblásticos (LEY et al., 2014); no cisto dentígero, cisto radicular, cisto odontogênico botrioide, queratocisto odontogênico, tumor odontogênico epitelial calcificante, fibroma ameloblástico, tumor odontogênico adenomatoide, mixoma odontogênico e tumor odontogênico primordial, não houve expressão de calretinina (PIATTELLI et al., 2003; ALAEDDINI et al., 2008; DEVILLIERS, et al., 2008; D'SILVA et al., 2013; ANURADHA et al., 2014; ANANDANI et al., 2014; BOLOGNA-MOLINA et al., 2017).

Sendo assim, a calretinina parece apresentar-se como um marcador imuno-histoquímico com certa especificidade para o epitélio ameloblástico neoplásico, tendo em vista os altos índices de positividade desta proteína em ameloblastomas. Nesta linha, a calretinina tem sido testada como ferramenta adjuvante no diagnóstico diferencial do ameloblastoma com outras lesões bucais. Entretanto, carece ainda a literatura de mais trabalhos relatando a imunorreatividade à calretinina nas demais neoplasias odontogênicas, investigando o seu papel no desenvolvimento e progressão das mesmas, como também sua influência sobre o comportamento e prognóstico das doenças.

Os objetivos deste trabalho foram, portanto: (1) identificar a expressão de calretinina em diferentes tumores odontogênicos; (2) descrever qualitativamente e avaliar semiquantitativamente seus padrões de expressão nas lesões; (3) verificar a aplicabilidade da calretinina como marcador específico para o diagnóstico diferencial entre estas lesões; (4) estabelecer uma correlação entre os achados clínicopatológicos e imuno-histoquímicos,

analisando a relação da calretinina com o comportamento biológico e prognóstico dos tumores malignos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Seleção da Amostra

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (UFU), registrado na Plataforma Brasil (CAAE: 52906815.7.0000.5152).

Foram selecionados para o desenvolvimento deste estudo casos de ameloblastoma (AME) (n=17), ameloblastoma unicístico (AMEU) (n=7), tumor odontogênico adenomatoide (TOA) (n=6) carcinoma ameloblástico (CAME) (n=15) e carcinoma odontogênico de células claras (CCOC) (n=5). As amostras foram obtidas do arquivo do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. O diagnóstico de cada caso foi confirmado com exame histopatológico de secções teciduais coradas pela técnica da Hematoxilina & Eosina (H&E) em microscopia de luz visível, com base na classificação histológica dos tumores odontogênicos da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005; WRIGHT e VERED, 2017).

Dos casos incluídos neste estudo, foram coletados dados acerca da idade, gênero e cor do paciente, localização e dimensão da lesão, sintomatologia, tratamento e dados de intercorrências, como recorrências, metástases e óbito.

2.2. Ensaio Imuno-histoquímico

Inicialmente, os cortes obtidos das amostras de interesse foram montados em lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano (3-aminopropiltrietóxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Seguiu-se uma etapa de desparafinação, mediante duas passagens em soluções de xilol, realizadas à temperatura ambiente por 18 horas e 15 minutos, respectivamente. Os cortes histológicos foram hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e submetidos à solução de hidróxido de amônia a 10%, durante 10 minutos, para remoção do pigmento formólico, sendo em seguida imersos em água deionizada.

Procedeu-se a recuperação antigênica com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1mM) tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em três ciclos de 5 minutos no forno de microondas à potência máxima. Após resfriamento, os cortes foram submetidos ao

bloqueio de ligação à avidina e biotina endógenas, aplicando-se, primeiro, uma solução para bloqueio de avidina por 10 minutos, preparada com 180mL de água deionizada e 30g de leite em pó desnatado (Molico®). Para o bloqueio da biotina, foi utilizada uma solução preparada com 200mL de água deionizada e 2 claras de ovo não-refrigerados, também por 10 minutos. As lâminas foram, então, submetidas a 5 banhos em água deionizada e TRIS-HCl.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da imersão em solução de peróxido de hidrogênio dez volumes (três banhos de 10 minutos cada). Em seguida, os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos em solução tampão TRIS-HCl (pH 7,4) e, em seguida, incubados com Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA) por 15 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida e à temperatura ambiente por duas horas com o anticorpo policlonal anti-calterinina obtido de coelho (Código SKU: 092, Biocare Medicals, Concord, Calif., USA), diluído em TRIS-HCl, sendo consideradas as recomendações do fabricante e acrescidas as modificações necessárias segundo os resultados obtidos na padronização laboratorial.

A reação foi amplificada com a utilização do sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB⁺®, Dako, Carpinteria, CA, EUA), incubando-se primeiramente o anticorpo secundário anti-IgG biotinilado por 20 minutos, seguido do complexo de estreptavidina-peroxidase por dez minutos, ambos em câmara úmida. Entre estas etapas, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCl em dois banhos de dois minutos. A reação foi revelada com a utilização de solução cromógena contendo 3,3-tetrahidroclorato de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, por cinco minutos, seguido de banho em água corrente por cinco minutos. Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 80%, 90% e duas vezes a 100%), diafanizados em dois banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Em todos os ensaios, foram utilizados como controles positivos cortes histológicos de carcinoma ductal invasivo e de mesotelioma (conforme indicado pelo fabricante). Nos controles negativos foi omitido o anticorpo primário em cortes destes mesmos tecidos.

2.3. Análise da Imunomarcação

As lâminas submetidas aos ensaios imuno-histoquímicos foram avaliadas, inicialmente, quanto à presença ou não de marcação, quanto aos tipos celulares (células periféricas e células centrais) e, por fim, quanto ao compartimento celular de marcação

predominante (membrana, citoplasma e/ou núcleo) (PIMENTA; PINHEIRO; GOMEZ, 2004). A intensidade de marcação também foi avaliada (fraca, moderada ou intensa), bem como a proporção de células positivas (classificadas entre os limites de 0 a 100%), da seguinte forma: escore 1 (até 4% de células positivas); escore 2 (de 5 a 19%); escore 3 (de 20 a 39%); escore 4 (de 40 a 59%); escore 5 (de 60 a 79%) e escore 6 (de 80 a 100%). A partir disto foi obtido o *quickscore* (QS), definido como resultado da multiplicação do parâmetro intensidade de marcação pelo parâmetro proporção de células positivas (DETRE; SACLANIJOTTI; DOWSETT, 1995).

Cada lâmina foi avaliada em 10 áreas distintas em aumento de 40x, iniciando pela área mais intensamente marcada. Ao final foram calculadas as médias dos *quickscores* dos compartimentos celulares das células centrais e periféricas de cada região avaliada. Esta etapa foi realizada por dois avaliadores calibrados e, quando verificadas divergências acima de 2 pontos no QS final, um terceiro avaliador realizava uma nova análise da amostra. A média Do QS final foi obtida através da média do parâmetro intensidade de marcação geral multiplicada pela média do parâmetro de proporção geral de células positivas. Por sua vez, a média do parâmetro intensidade de marcação geral foi obtida através da soma entre a média de intensidade do avaliador 1 e a média de intensidade do avaliador 2, dividindo-a por dois. De forma similar foi obtida a média do parâmetro proporção geral de células positivas.

2.4. Descrição e análise dos dados

Os dados foram inseridos a partir de estatística descritiva, considerando médias, medianas e percentuais. A análise estatística dos dados foi realizada considerando a seguinte estratégia: após a análise de distribuição dos valores dos escores de expressão antigênica pelo teste de D'Agostino & Pearson e Kolmogorov-Smirnov, quando indicados, os grupos amostrais foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste utilizando teste *U* de Mann-Whitney, para comparações múltiplas dos grupos realizadas aos pares. Estas análises foram executadas para avaliação de diferenças entre grupos de tumores testados quanto à intensidade e proporção de imunomarcação para calretinina; bem como para a comparação entre grupos de lesões benignas e malignas, agressivas e não agressivas, grupos de lesões malignas metastáticas e não metastáticas e grupos de lesões malignas que evoluíram ou não para o óbito. A análise da distribuição das proporções de casos positivos e negativos entre os diferentes grupos de tumores foi realizada com o teste chi-quadrado de Pearson, verificando diferenças significativas na quantidade de

amostras positivas ou negativas para calretinina através da comparação entre os diferentes tumores, agrupando-os conforme citado anteriormente. As análises estatísticas foram executadas com o *software* GraphPad Prism, versão 6.0, considerando os parâmetros padrões do *software* para o intervalo de confiança (95%) e o valor de $p = 0,05$. Os resultados foram significativos quando os valores de p foram menores que 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos casos

O detalhamento dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos está demonstrado nas Tabelas 1 e 2. Os ameloblastomas foram mais prevalentes no gênero masculino, apresentando uma média de idade no momento do diagnóstico situada na terceira década de vida. Todos os casos relatados envolveram a mandíbula, em sua maioria assintomáticos. Quando presentes, os sinais e sintomas incluíram dor e aumento de volume.

Tabela 1 - Dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos tumores odontogênicos avaliados.

Variáveis		Ameloblastoma	Ameloblastoma Unicístico	Tumor Odontogênico Adenomatóide	Carcinoma Ameloblástico	Carcinoma Odontogênico de Células Claras
Idade (anos)	Média Variação	29,5 15-71	24,8 9-44	25,4 13-49	44 21-62	45,2 20-64
Gênero	Feminino	5 (35,7%)	3 (42,8%)	4 (66,7%)	5 (33,3%)	1 (25%)
	Masculino	9 (64,3%)	3 (42,8%)	2 (33,3%)	10 (66,67%)	4 (75%)
	ND ¹	0	1	0	0	0
Cor	Leucoderma	6 (42,8%)	2 (28,6%)	1 (16,7%)	7 (46,7%)	3 (60%)
	Feoderma	4 (28,6%)	1 (14,2%)	3 (50%)	5 (33,3%)	2 (40%)
	Melanoderma	0	2 (28,6%)	1 (16,7%)	3 (20%)	0
	ND ¹	4	2 (28,6%)	1	0	0
Epicentro	Maxila	0	0	4 (66,7%)	4 (26,7%)	2 (40%)
	Mandíbula	13 (92,8%)	6 (85,7%)	2 (33,3%)	11 (73,3%)	3 (60%)
	ND ¹	1	1	0	0	0
Dimensão (mm)	Média Variação	83,3 30-190	58,3 20-100	42,3 20-60	93,9 25-200	42 10-60
Sinais e Sintomas	Assintomático	8 (57,1%)	3 (42,8%)	6 (100%)	0	0
	Dor	1 (7,2%)	2 (28,6%)	0	3 (20%)	2 (40%)
	Tumoração	0	1 (14,3%)	0	15 (100%)	5 (100%)
	Hemorragia	0	0	0	7 (46,7%)	1 (20%)
	MD ²	0	0	0	3 (20%)	2 (40%)
	ND ¹	5 (35,7%)	1	0	0	0

1.ND = Não descrito; 2.MD = Mobilidade dentária

O tumor odontogênico adenomatoide foi mais prevalente no gênero feminino, com uma idade média de diagnóstico de aproximadamente 25 anos. Houve uma predileção pela maxila, sendo os casos identificados na mandíbula envolvendo a região mentoniana. Em todos os casos, a lesão foi assintomática.

Tabela 2 - Dados de tratamento e intercorrências observadas nos carcinomas odontogênicos.

Variáveis		Carcinoma Ameloblástico	Carcinoma Odontogênicos de Células Claras
Tratamento	Cirurgia	12 (80%)	2 (40%)
	Cirurgia + RT ²	3 (20%)	1 (20%)
	Curetagem	0	1 (20%)
	ND ¹	0	1 (20%)
Margens cirúrgicas	Livres	6 (40%)	2 (40%)
	Comprometidas	6 (40%)	2 (40%)
	ND ¹	3 (20%)	1 (20%)
Recidivas	Sim	12 (80%)	4 (80%)
	Não	3 (20%)	0
	ND ¹	0	1 (20%)
Metástases	Regional	3 (20%)	0
	À distância	2 (13,3%)	1 (20%)
	Não	8	0
	ND ¹	2 (13,3%)	0
Estado	SED ³	6 (40%)	1 (20%)
	VCD ⁴	3 (20%)	2 (40%)
	ODD ⁵	4 (26,7%)	2 (40%)
	ND ¹	2 (13,3%)	0
Acompanhamento (meses)	Média	91,8	177,6
	Variação	18-276	6-504

1.ND = Não descrito; 2.RT=radioterapia; 3.SED=sem evidências da doença; 4.VCD=vivo com a doença; 5.ODD=óbito devido à doença.

Os carcinomas foram prevalentes entre os pacientes do sexo masculino, com maior proporção para o sexo feminino entre os COCC. A idade média de diagnóstico foi identificada na quinta década, com casos diagnosticados a partir da terceira década de vida. O paciente mais idoso foi observado para o carcinoma ameloblástico (71 anos), uma década acima do mais velho com COCC (64 anos). A mandíbula foi mais afetada para ambos os tipos de carcinomas, sendo as lesões maiores, em média, observadas nos casos de carcinomas ameloblásticos. Em geral, os carcinomas se apresentaram clinicamente como aumentos volumétricos, assintomáticos, com um atraso no diagnóstico semelhantes, aproximadamente cinco anos. A maioria dos pacientes com carcinomas receberam tratamento cirúrgico, em alguns casos complementados com radioterapia. A recidiva foi observada em frequência similar para ambos os grupos de carcinomas, sendo as metástases cinco vezes mais frequentes

neste grupo comparativamente aos COCC. A maioria dos pacientes se encontram vivos com doença ou evoluíram para óbito em função da doença.

3.2. Dados imuno-histoquímicos

No total, cinquenta amostras teciduais tumorais foram submetidas ao ensaio imuno-histoquímico, sendo vinte e oito das quais positivas para imunomarcação da calretinina. Apenas o tumor odontogênico adenomatoide foi negativo para calretinina. Os maiores valores percentuais de marcação foram observados para o ameloblastoma (82,4%) e carcinomas, estes últimos apresentando positividade acima de 50% (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição do número e percentual de imunopositividade para calretinina em função dos tipos de tumores odontogênicos estudados.

Grupos	N ¹	Positivos (%)	Negativos (%)
Ameloblastoma	17	14 (82,4)	3 (17,6)
Ameloblastoma Unicístico	7	3 (42,9)	4 (57,1)
Tumor Odontogênico Adenomatoide	6	0 (0)	6 (100)
Carcinoma Ameloblástico	15	8 (53,3)	7 (46,7)
Carcinoma odontogênico de células claras	5	3 (60)	2 (40)
Total	50	28	22

1.N = número de amostras

O padrão de imunomarcação das amostras positivas para a expressão de calretinina manteve certa similaridade entre os grupos tumorais com diferenciação ameloblástica (Figura 1). Em geral, positividade foi observada em pequenos grupos de células, mostrando-se agregadas ou espalhadas pelo tecido neoplásico. Para os carcinomas e ameloblastomas, o tipo celular com maior proporção e intensidade de marcação foi a célula central do parênquima (similares àquelas do retículo estrelado do órgão dentário). A imunomarcação foi predominantemente citoplasmática; os núcleos, com menos frequentemente positivos, mostraram maior intensidade de marcação, quando comparados aos citoplasma. A imunorreatividade foi objetivamente mais expressiva nas células com metaplasia escamosa, na presença ou não de degeneração cística do parênquima, e nas células granulares. Por outro lado, nas células periféricas (diferenciação ameloblástica), a imunomarcação foi citoplasmática, de fraca intensidade e em menor proporção. A expressão de calretinina nas

amostras de ameloblastoma unicístico ocorreu somente nas células centrais, próximas às células periféricas. A marcação foi difusa e homogênea ao longo do epitélio, sendo moderada no citoplasma e intensa nos núcleos. A Tabela 4 mostra a distribuição dos valores dos *quickscores* observados para as lesões estudadas.

Tabela 4 – Distribuição dos valores do *quickscore* nos tumores odontogênicos.

Grupos	<i>Quickscore</i> *			
	Células centrais		Células periféricas	
	C ¹	N ²	C ¹	N ²
AME	3,81 ± 2,51	1,17 ± 2,17	1,95 ± 2,24	0
AMEU	1,19 ± 2,37	0,4 ± 1,26	0	0
TOA	0	0	0	0
CAME	2,25 ± 2,54	1,03 ± 1,13	1,25 ± 2,38	0,26 ± 0,69
COCC	3,92 ± 4,90	2,38 ± 4,78	3,36 ± 3,39	1,12 ± 2,5

*Dados descritos como média ± desvio padrão. 1.C = citoplasma; 2.N = núcleo.

A Figura 2 mostra a distribuição dos tumores odontogênicos estudados segundo a proporção de imunopositividade para calretinina e o resultado das associações entre imunopositividade e tipo tumoral estudado.

Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa para a frequência de imunopositividade entre os tumores malignos e ameloblastoma sólido para o tumor odontogênico adenomatoide. Diferenças na imunomarcação dos tumores agrupados de acordo com o comportamento biológico também foram verificadas, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre tumores benignos e malignos ($p=0,9074$). Investigando a partir da agressividade, percebe-se que há diferença entre os tumores considerados agressivos (carcinomas e o tipo sólido de ameloblastoma) em relação às não agressivas, representadas pelo TOA e ameloblastomas unicístico. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nos testes de correlação entre os dados clinicopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores malignos, considerando a distribuição da imunopositividade entre as lesões metastáticas e não metastática, bem como entre aquelas que evoluíram ou não para o óbito.

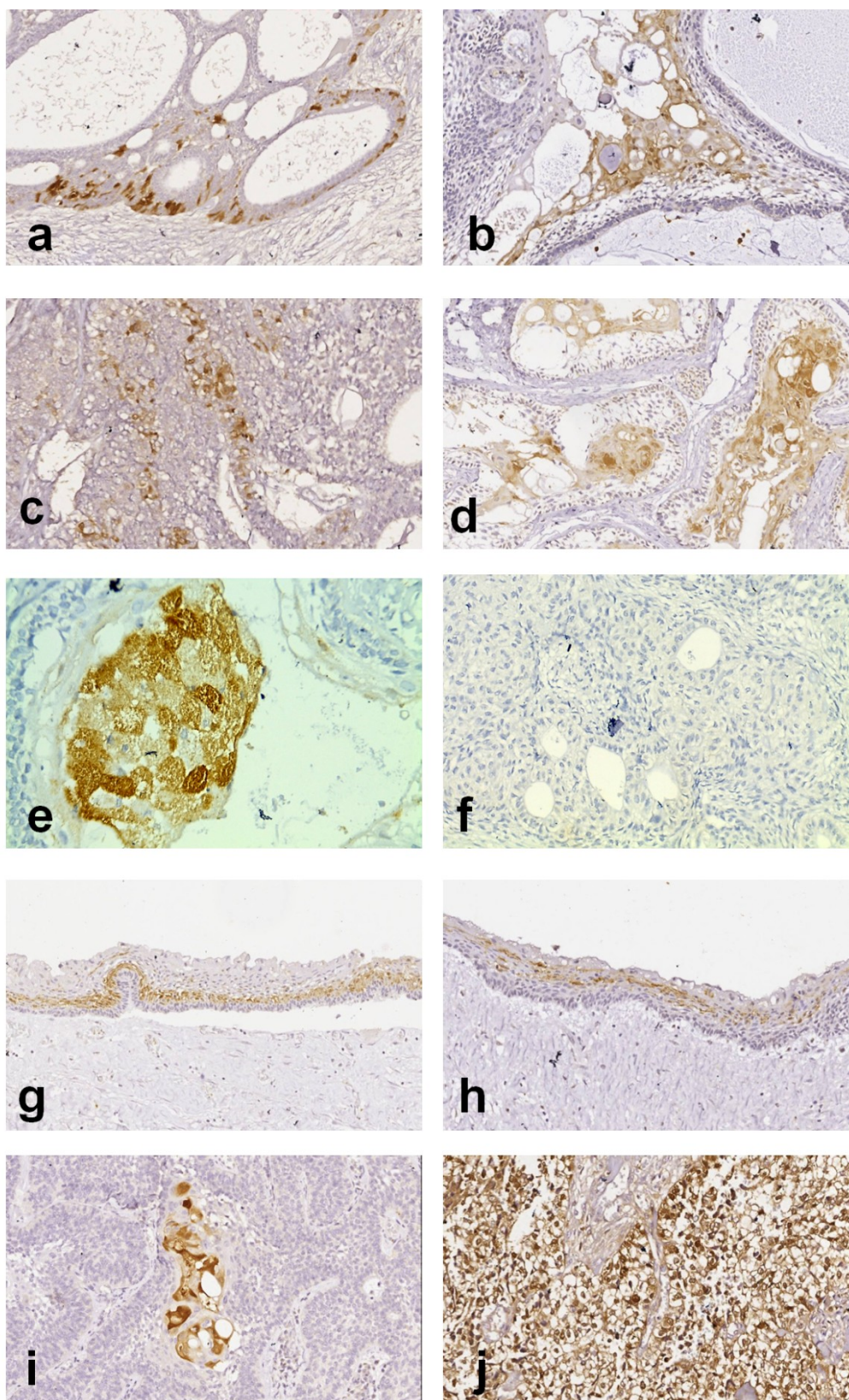


Figura 1 - Expressão de calretinina em tumores odontogênicos. (a até e) ameloblastoma; (f) tumor odontogênico adenomatoide (negativo); (g e h) ameloblastoma unicístico; (i) carcinoma ameloblástico. A Figura j representa um caso de COCC que exibiu a maior intensidade e proporção de marcação entre as amostras estudadas. Aumento original de 20X. Estreptavidina-biotina.

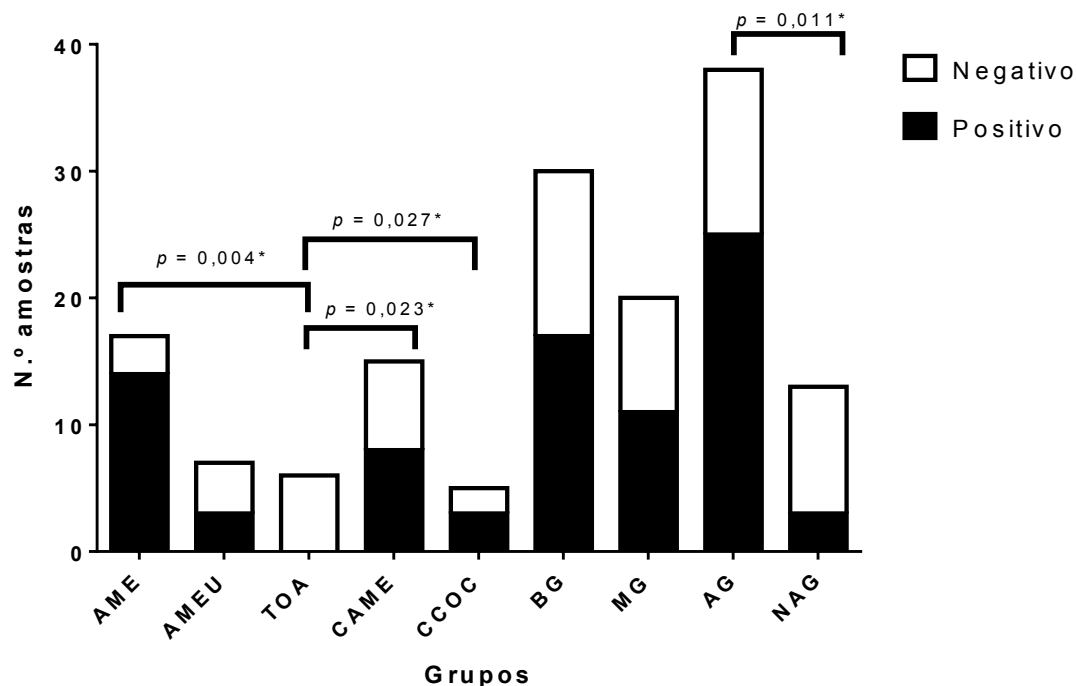


Figura 2 – Gráfico apresentando a distribuição de casos positivos e negativos para a expressão de calretinina nos diferentes grupos amostrais e com os tumores agrupados como lesões benignas x malignas e agressivas x não-agressivas. A análise foi feita com o teste chi-quadrado. AME=ameloblastoma; AME U=ameloblastoma unicístico; TOA=tumor odontogênico adenomatoide; CAME=carcinoma ameloblástico; CCOC=carcinoma odontogênico de células claras; BG=benignos; MG=malignos; AG=agressivos; NAG=não agressivos.

Visto que o citoplasma da célula central foi o compartimento mais consistentemente marcado no epitélio neoplásico das amostras positivas, diferenças na análise semiquantitativa foram testadas apenas com os quickscores referentes a estas estruturas. Diferenças entre as medianas foram estatisticamente significativas ($p=0,0092$) com o teste Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. Os grupos amostrais também foram comparados aos pares com o teste U de Mann-Whitney, apresentando diferenças estatisticamente significativas entre ameloblastoma sólido e tumor odontogênico adenomatoide e entre carcinoma ameloblástico e tumor odontogênico adenomatoide (Figura 3). Não houve diferenças significativas entre tumores benignos e malignos ($p=0,5911$), em contraste com o observado ao comparar as lesões agressivas e não-agressivas.

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nos testes de correlação entre os dados clinicopatológicos e imuno-histoquímicos dos carcinomas odontogênicos, comparando a intensidade e proporção (teste U de Mann-Whitney) de marcação nas lesões metastáticas e não metastática ($p=0,2571$), e nos tumores que evoluíram ou não para o óbito do paciente ($p=0,8019$). O mesmo foi observado ao comparar estes grupos em relação à distribuição de casos positivos e negativos (teste chi-quadrado), apresentando valores de $p=0,0954$ e $p=0,7686$, respectivamente.

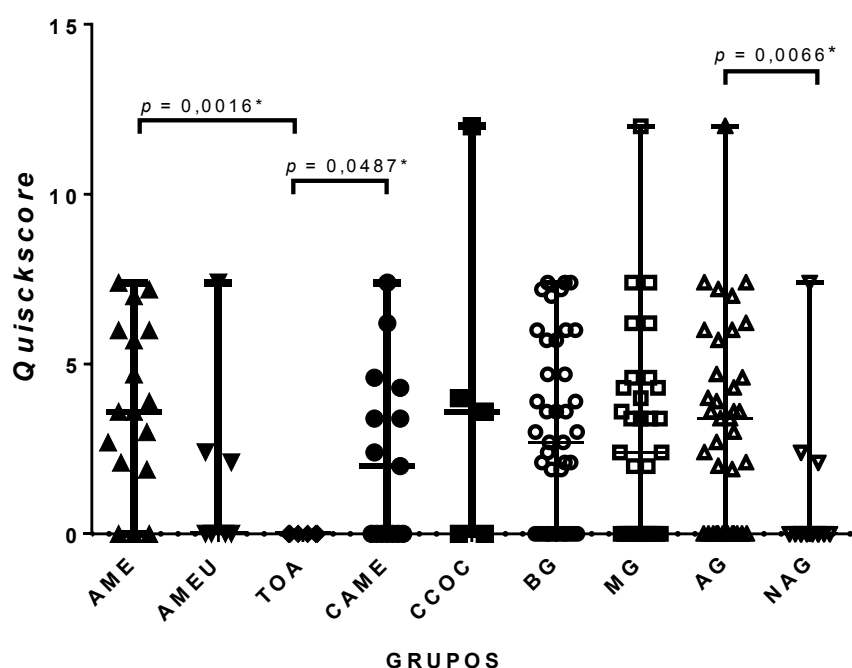


Figura 3 - Gráfico apresentando as comparações dos valores de Quickscore entre os diferentes tumores odontogênicos, individualmente e agrupados como lesões benignas x malignas e agressivas x não-agressivas. A análise foi realizada com o teste U de Mann-Whitney. AME=ameloblastoma; AME U=ameloblastoma unicístico; TOA=tumor odontogênico adenomatoide; CAME=carcinoma ameloblástico; CCOC=carcinoma odontogênico de células claras; BG=benignos; MG=malignos; AG=agressivos; NAG=não agressivos.

4. DISCUSSÃO

Pelo presente trabalho, demonstrou-se que a calretinina se expressa preferencialmente como proteína citoplasmática, mas de forma variável, com maior frequência nos tumores com diferenciação ameloblástica, malignos e benignos. Nestes últimos, chama a atenção sua maior expressão nas lesões agressivas (ameloblastoma), em comparação com as menos agressivas, como sua variante unicística. Corrobora esta tendência, a ausência de marcação no tumor odontogênico adenomatoide. A célula central, representando a contraparte neoplásica do retículo estrelado, foi o tipo celular com maior intensidade e proporção de imunomarcação.

Os tumores odontogênicos são conhecidos por reproduzir morfologicamente as diferentes etapas da odontogênese (SHEAR, 1962). Demonstrada a presença da calretinina de forma variável, tanto em termos de distribuição espacial quanto temporal ao longo da odontogênese em modelos animais (MISTRY et al., 2001), hipotetizou-se o estabelecimento de uma analogia entre o padrão de expressão nestes tecidos com aquele observado em tumores humanos. Por outro lado, foi possível observar uma tendência de associação entre sua expressão e o comportamento biológico mais agressivo para as neoplasias ameloblásticas.

Estudos anteriores descrevendo os padrões de expressão imuno-histoquímica da calretinina em tumores odontogênicos trazem dados similares àqueles aqui obtidos. A imunomarcção para calretinina foi detectada em 82,35% dos casos de ameloblastoma sólido, percentual próximo ao descrito por outros que variou entre 90% e 100% (ALTINI et al., 2001; ALAEDDINI et al., 2008; DEVILLIERS et al., 2008; D'SILVA et al., 2013; KONERU et al., 2014). Por outro lado, nossos resultados mostraram uma baixa frequência de expressão nos ameloblastomas unicísticos (42,9%), comparativamente aos estudos de ALTINI et al. (2010) e ANANDANI et al. (2014), os quais relataram uma marcação positiva em 81,5% e 50% dos casos, respectivamente. A explicação para este fato pode residir na subjetividade de interpretação dos parâmetros definidores da diferenciação ameloblastomatosa nestas lesões. Além disto, efeitos do processo de fixação ou mesmo de resgate antigênico poderiam interferir nestes resultados.

O tumor odontogênico adenomatoide foi o único grupo cujas amostras, em sua totalidade, foram negativas para calretinina, reforçando aqueles dados já obtidos em outros trabalhos (ALAEDDINI et al., 2008; KONERU et al. (2014). Vários autores descreveram as células deste tumor como sendo ultraestruturalmente similares aos ameloblastos durante a formação da pré-dentina (HATAKEYAMA e SUZUKI, 1978) ou que sua aparência à microscopia eletrônica de varredura é semelhante ao estágio de desenvolvimento pré-ameloblástico do epitélio interno do órgão do esmalte (SMITH et al., 1979). Por outro lado, foi sugerido que este tumor se origina dos ameloblastos pós-secretórios ao fim da amelogênese (ALAEDDINI et al, 2008), o que explica a ausência de expressão de calretinina nas amostas avaliadas, uma vez que a sua expressão reduz subsequentemente à produção do esmalte.

Vários autores consideram a calretinina como um marcador específico para o ameloblastoma (ALTINI et al., 2000; COLEMAN et al., 2001), especialmente ao diferenciá-lo do queratocisto e outros cistos odontogênicos e não-odontogênicos (DEVILLIERS et al., 2008; ANANDANI et al., 2014). No presente estudo, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ao comparar tanto os dados da distribuição de casos positivos e negativos quanto os quickscores do ameloblastoma sólido, carcinoma ameloblástico, carcinoma odontogênico de células claras com o tumor odontogênico adenomatoide. Assim, a calretinina poderia ser utilizada como marcador para o diagnóstico diferencial destas lesões.

Nossos resultados mostraram positividade para calretinina entre 53% e 60% nos carcinomas ameloblásticos e COCC, respectivamente. Lei et al. (2014) observaram frequência similar para os carcinomas ameloblásticos. Este padrão de expressão foi o segundo mais

elevado em nossa série, aproximando-se daquele encontrado para os ameloblastomas sólidos. Provavelmente, a redução na expressão quando comparada aos ameloblastomas pode refletir variações na diferenciação celular e fenômenos de apoptose das células neoplásicas malignas. Nestes tumores, a presença reduzida de áreas de células granulares e de metaplasia escamosa pode ter influenciado o resultado. Até o momento, não há trabalhos na literatura avaliando a expressão de calretinina em carcinomas odontogênicos de células claras.

Quando analisamos em conjunto as diferenças de distribuição de positividade entre as lesões, ficou claro que os tumores mais agressivos, carcinomas e ameloblastomas, mostraram maior número de positividade e de intensidade de marcação que as células dos tumores menos agressivos. É provável que estas diferenças residam tanto nos padrões de diferenciação celular, na maior ou menor heterogeneidade de diferenciação celular e na maior ou menor participação dos processos de apoptose nestas doenças (SHAIKH e NIRANJAN, 2015; SHUKLA et al., 2017). Neste sentido, nossos resultados indicam um potencial papel da calretinina como marcador de comportamento biológico para as neoplasias odontogênicas ameloblásticas. Mais estudos seriam necessários para confirmar esta possibilidade.

Não foi possível identificar estudos que discutissem o padrão de expressão da calretinina em odontogênese humana. Esta ausência de informação limita, a princípio, qualquer tentativa de elaborar uma discussão da relação dos tumores com a odontogênese baseada em sua expressão. Estudos em animais, mostram resultados diferentes, conforme a espécie estudada. Por exemplo, em *Canis familiaris* (cão doméstico), a expressão de calretinina foi identificada apenas no epitélio da mucosa alveolar, na lâmina dentária e nos restos de Serres (NEL et al., 2010), sugerindo, possivelmente, uma participação em fases extremas de processo de diferenciação. Seria possível pensar na sua participação em mecanismos controladores de fases polares de desenvolvimento embrionário (tipo liga-desliga). Em tecidos neoplásicos do mesmo animal, a calretinina foi identificada em 100% das amostras de carcinoma de células escamosas bucais (CCEB), enquanto em ameloblastomas a expressão da proteína ocorreu somente em duas de 15 amostras, estando situada no epitélio odontogênico neoplásico e nas células centrais semelhantes ao retículo estrelado (FULTON, et al., 2012). Pode-se levantar a possibilidade, por estes resultados, de que sua participação na tumorigênese odontogênica seja limitada, sem vinculação primária ao fenômeno. Fica, todavia em tese, a possibilidade de que sua expressão também nestes tumores fale a favor de um comportamento mais agressivo da lesão, em função da maior expressão relatada para os CCEB.

Por outro lado, para o *Rattus norvegicus* (MISTRY et al., 2001), a expressão de calretinina na odontogênese foi detectada na lâmina dentária, no epitélio externo e interno do órgão do esmalte, na papila dentária, no estrato intermediário, no retículo estrelado e nos ameloblastos. Com exceção da papila dentária e do estrato intermediário, nas demais estruturas a intensidade da marcação aumentou nos estágios finais da odontogênese, apresentando pico de expressão nas fases iniciais e terminais da campânula. No epitélio interno do órgão dentário, a expressão da proteína esteve presente a partir do estágio de capuz, distribuindo-se, a princípio, focalmente, tornando-se difusa com a maturação dos pré-ameloblastos. A reatividade exibiu-se mais intensa nos ameloblastos pré-secretórios (pré-ameloblastos), reduzindo em intensidade e restringindo-se apenas ao citoplasma após a formação do esmalte.

Admitindo-se a existência de uma relação morfofuncional entre a odontogênese humana e murina, os achados da expressão da calretinina nos tumores ameloblásticos reforça que, nestas lesões, as células periféricas não se diferenciam funcionalmente, embora morfológicamente sejam semelhantes aos ameloblastos. Estudos ultraestruturais das células tumorais do ameloblastoma revelaram que as células periféricas colunares são morfológicamente semelhantes ao epitélio interno do órgão do esmalte, e que as células centrais compartilham características com o retículo estrelado, o que indica uma possível origem deste tumor a partir do órgão do esmalte antes da fase de campânula (KIM et al., 1979; DONG, 1990). Ainda nesta linha de pensamento, a mais constante expressão de calretinina nas células estrelárias do parênquima neoplásico também pode reforçar uma analogia com as células estrelárias murinas, corroborando a hipótese de que o tumor expresse uma caricatura da odontogênese (SHEAR, 1962). Embora a diferenciação escamosa não seja um fenômeno presente na odontogênese, sabe-se que representa uma maturação morfofuncional do tecido epitelial (OHBU et al., 1995). Neste sentido, a presença de células com metaplasia escamosas intensamente marcadas no tumor reforça a sua associação com o processo de diferenciação celular. As diferenças na expressão da calretinina entre as células periféricas tumorais e os pré-ameloblastos na odontogênese também sugerem um papel desta proteína na transição do epitélio ameloblástico normal para o neoplásico (ALAEDDINI et al., 2008).

Por outro lado, algumas evidências também poderiam suportar que sua expressão estaria associada ao seu papel na mediação da apoptose, tanto na odontogênese, quanto na progressão neoplásica. As células granulares, por exemplo, começam a produzir grânulos lisossomais e sofrem, subsequentemente, degeneração cística (GUPTA, et al., 2012). Os

núcleos pequenos e picnóticos, bem como o citoplasma preenchido por grânulos eosinofílicos, indicam um processo de apoptose em andamento (GUPTA, et al., 2012). Similarmente, chama a atenção sua marcante expressão tanto nas células tumorais com metaplasia escamosa, considerada um fenômeno apoptótico presente na diferenciação de alguns epitélios de revestimento (OHBU et al., 1995). A propósito, vários marcadores de morte celular foram associados à metaplasia escamosa e granular em ameloblastomas (LUO et al., 2006), indicando, inclusive, que o tumor microscopicamente pode exibir dois padrões distintos, sendo a camada de células periféricas um sítio de proliferação anti-apoptótico e as células centrais nas ilhas tumorais, por sua vez, exibindo um padrão pró-apoptótico (SANDRA et al., 2001). Estes achados reforçam o padrão de marcação encontrado para as células periféricas tumorais.

O papel pró-apoptótico da calretinina tem sido documentado por HE et al. (2013) investigando o envolvimento da calretinina no processo de apoptose no tumor de células pequenas do pulmão. A redução de sua transcrição a partir de RNA de interferência associada à exposição celular à cisplatina mostrou que a calretinina tem papel relevante na prevenção da apoptose, independentemente da ação do quimioterápico. Stevenson et al. (2011) estudaram o papel da calretinina na regulação da resposta das células do câncer colorretal expostas ao 5-fluoruracil. Os autores relataram que a calretinina regula positivamente os sinais apoptóticos após o tratamento com oxaplatina e 5-FU por meio da via intrínseca mitocondrial, e que o *down-regulation* da calretinina, em resposta ao 5-FU, pode representar um mecanismo de resistência a esta droga. Todavia, a associação da calretinina a este fenômeno não parece ser linear. Outras evidências tem mostrado seu papel anti-apoptótico para células mesoteliais epitelioides e mistas e em células de câncer de cólon (GANDER et al., 1996; BLUM e SCHWALLER, 2013).

Nossos achados têm mostrado que a positividade da calretinina e sua intensidade de expressão têm sido associadas a tumores de maior agressividade, tanto para os carcinomas odontogênicos quanto para AME, em relação ao AMEU e TOA. Isto tem sugerido que sua presença pode ser um marcador de maior agressividade tumoral. Resultados nesta linha têm sido obtidos em carcinoma ductal de mama, quando sua expressão aumentada tem sido associada ao pior prognóstico (TALIANO et al., 2013; FARRAG et al., 2017). Estes resultados não parecem se reproduzir uniformemente, desde que, para mesoteliomas malignos, o pior prognóstico tem sido identificado com sua baixa expressão (KAO et al., 2011; THAPA et al., 2016). Um exemplo disto é que, em nossa análise, não encontramos

associação entre sua positividade e intensidade de marcação diferencial entre tumores metastático e não metastáticos, bem como com a sobrevida dos pacientes.

É importante ressaltar, todavia, que outros fenômenos intervenientes devem ser investigados na tentativa de explicar a diversidade de expressão relatada para tipos tumorais e teciduais diferentes. Variações funcionais da calretinina podem estar associadas ao *splicing* alternativo de seu RNA mensageiro, cuja transcrição resulta em diferentes formas da proteína, como a calretinina-20k e calretinina-22k, detectadas em células do carcinoma de cólon humano. Tais formas alternativas podem ser responsáveis, em parte, pelo fenótipo transformado, pois as células epiteliais do cólon normalmente são negativas para a calretinina (SCHWALLER et al., 1995).

5. CONCLUSÃO

A expressão de calretinina foi identificada predominantemente no citoplasma das células centrais em tumores odontogênicos com diferenciação ameloblástica, de forma mais intensa nas áreas de metaplasia escamosa e granular. O TOA não apresentou imunorreatividade para esta proteína. Com base nos achados deste estudo imuno-histoquímico, conclui-se que a calretinina pode ser utilizada como um marcador específico no diagnóstico diferencial entre o tumor odontogênico adenomatoide e os demais tumores com diferenciação ameloblástica. A expressão tumoral da calretinina não possibilitou o estabelecimento de uma analogia direta entre a diferenciação celular morfológicamente identificável na odontogênese em modelos animais e aquela observada em tumores humanos. A avaliação semiquantitativa da intensidade e proporção das células marcadas, assim como a distribuição dos casos positivos e negativos nas amostras analisadas, possibilitou uma diferenciação entre as lesões consideradas agressivas e não agressivas.

6. REFERÊNCIAS *

ABUTAILY, A. S.; ADDIS, B. J.; ROCHE, W. R. Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 662-668, 2002.

ALAEDDINI, M.; ETEMA-MOGHADAM, S.; BAGHAI, F. Comparative expression of calretinin in selected odontogenic tumours: a possible relationship to histogenesis. **Histopathology**, v. 52, n. 3, p. 299-304, 2008.

ALTINI, M.; COLEMAN, H.; DOGLIONI, C.; et al. Calretinin expression in ameloblastomas. **Histopathology**, v. 37, p. 27-32, 2000.

ANANDANI, C.; METGUD, R.; SINGH, K. Calretinin as a Diagnostic Adjunct for Ameloblastoma. **Pathology Research International**, 2014.

*Referências estruturadas de acordo com as normas da ABNT (NBR-6023/89)

- ANURADHA, A.; URMILA, U.; SRINIVAS, G. V.; et al. Botryoid Odontogenic Cyst: A Diagnostic Chaos. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 12, n. 8, 2014.
- BARBERIS, M. C.; FALERI, M.; et al. Calretinin. A selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. **Acta Cytologica**, v. 41, n. 6, p. 1757-1766, 1997.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; et al. World Health Organization Classification of Tumours: **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon, France: IARC Press, 2005.
- BLUM, W.; SCHWALLER, B. Calretinin is essential for mesothelioma cell growth/survival in vitro: A potential new target for malignant mesothelioma therapy? **International Journal of Cancer**, 2013.
- BOLOGNA-MOLINA, R.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; LOPEZ-CORELLA, E.; et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. **Oral Oncology**, v. 44, p. 805-811, 2008.
- CAO, Q. J.; JONES, J. G.; LI, M. Expression of calretinin in human ovary, testis, and ovarian sex cord- stromal tumors. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 20, p. 346-352, 2001.
- CARELLA, R.; et al. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 25, p. 43-50, 2001.
- CHHIEN, D. C.; YEE, H.; et al. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. **Cancer**, v. 90, n. 3, p. 194-200, 2000.
- COLEMAN, H.; ALTINI, M.; DOGLIONI, C.; et al. Use of calretinin in the differential diagnosis of unicystic ameloblastomas. **Histopathology**, v. 38, p. 312-317, 2001.
- D'SILVA, S.; SUMATHI, M. K.; BALAJI, N.; et al. Evaluation of Calretinin expression in Ameloblastoma and Non-Neoplastic Odontogenic Cysts – An immunohistochemical study. **Journal of International Oral Health**, v. 5, ed. 6, p.42-48, 2013.
- DETRE, S.; SACLANI JOTTI, G.; DOWSETT, M. A. 'quickscore' method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48; 876–878, 1995.
- DEVILLIERS, P.; LIU, H.; SUGGS, C.; et al. Calretinin expression in the differential diagnosis of human ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, n. 2, p. 256–260, 2008.
- DOGLIONI, C.; DEI TOS, A. P.; LAURINO, L.; et al. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 20, n. 9, p. 1037–1046, 1996.
- DONG, W. J. The ultrastructure of ameloblastoma. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 25, n. 2, p. 99-101, 1990.
- FAAS, G. C.; SCHWALLER, B.; BERGARA, J. L.; et al. Resolving the fast kinetics of cooperative binding: Ca^{2+} buffering by calretinin. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, 2007.
- FARRAG, M. S.; EL-KAREF, A. A.; AMIN, M. M.; et al. Calretinin expression as a reliable prognostic marker in different molecular subtypes of breast carcinoma. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 60, n. 1, p.8-14, 2017.
- FISHER, C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1001-1012, 2011.
- FULTON, A.; ARZI, B.; MURPHY, B.; et al. The expression of calretinin and cytokeratins in canine acanthomatous ameloblastoma and oral squamous cell carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2012.
- GANDER, J. C.; GOTZOS, V.; FELLAY, B.; et al. Inhibition of the proliferative cycle and apoptotic events in WiDr cells after down-regulation of the calcium-binding protein calretinin using antisense oligodeoxynucleotides. **Experimental Cell Research**, v. 225, p. 399–410, 1996.
- GUPTA, S.; GREWAL, H.; SAH, K. Granular cell ameloblastoma showing desmoplasia. **Annals of Saudi medicine**, v.32, n. 5, 2012.
- HATAKEYAMA, S; SUZUKI, A. Ultrastructural study of adenomatoid odontogenic tumor. **Journal of Oral Pathology**, v. 7, n. 5, p. 295-300, 1978.
- HE, P.; KUHARA, H.; TACHIBANA, I.; et al. Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer expressing tetrasoanin CD9. **FEBS Open Bio**, v. 3, p.225-230, 2013.

- HEIZMANN, C. W. Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. **General Physiology Biophysics**, v. 11, p. 411–425, 1992.
- HUBBARD, M. J.; MCHUGH, N. J.; MANGUN, J. E. Exclusion of all three calbindins from a calcium-ferry role in rat enamel cells. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 1, p. 112–119, 2011.
- HUNTER, K. D.; SPEIGHT, P. M.; The diagnostic usefulness of immunohistochemistry for odontogenic lesions. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 4, p. 392–399, 2014.
- ICHIKAWA, H.; DEGUCHI, T.; MITANI, S.; et al. Neural parvalbumin and calretinin in the tooth pulp. **Brain Research**, v. 647, p. 124–130, 1994.
- ICHIKAWA, H.; JACOBOWITZ, D. M.; SUGIMOTO, T. Calretinin-immunoreactivity in the oro-facial and pharyngeal regions of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 146, p. 155–158, 1992.
- ICHIKAWA, H.; JACOBOWITZ, D. M.; SUGIMOTO, T. Coexpression of calretinin and parvalbumin in Ruffini-like endings in the rat incisor periodontal ligament. **Brain Research**, v. 770, p. 294–297, 1997.
- JOSHI, J.; MANJUNATHA, B. S.; KUMAR, H.; et al. Tumor of the maxilla-odontogenic or glandular? A diagnostic challenge and the role of immunohistochemical markers. **Journal of Cancer Research and Therapy**, v. 11, p. 1031, 2015.
- KAO, S. C.; KLEBE, S.; HENDERSON, D. W.; et al. Low calretinin expression and high neutrophil-to-lymphocyte ration are poor prognostic factors in patients with malignant mesothelioma undergoes extrapleural pneumonectomy. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, n. 11, 2011.
- KIM, S. K.; NASJLETI, C. E.; WEATHERBEE, L. Fine structure of cell types in an ameloblastoma. **Journal of Oral Pathology**, v. 8, n. 6, p. 319–332, 1979.
- KRETSINGER R. H.; NOCKOLDS, C. E. Carp muscle Calcium-binding protein: Structure determination and general description. **The journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 9, p. 3313–3326, 1973.
- LEI, Y.; JARADAT, J.; OWOSHO, A.; et al. Evaluation of SOX2 as a potential marker for ameloblastic carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 117, n. 5, 2014.
- lesions. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 4, p. 392–399, 2014.
- LUGLI, A.; FOSTER, Y.; HAAS, P.; et al. Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples. **Human Pathology**, v. 34, n. 10, 2003.
- LUO, H. Y.; YU, S. F.; LI, T. J. Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2006.
- MCCLUGGAGE, W. G.; MAXWELL, P. Immunohistochemical staining for calretinin is useful in the diagnosis of ovarian sex cord-stromal tumours. **Histopathology**, v. 38, p. 403–408, 2001.
- MISTRY, D.; ALTINI, M.; COLEMAN, H. G.; et al. The spatial and temporal expression of calretinin in developing rat molars (*Rattus norvegicus*). **Archives of Oral Biology**, v. 46, p. 973–981, 2001.
- MOURTZOUKOU, D.; FISHER, C.; THWAY, K. Evaluation of Molecular and Immunohistochemical Adjunct Modalities in the Diagnosis of Soft Tissue Neoplasms. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 23, n. 8, p. 601–608, 2015.
- MOVAHEDI-LANKARANI, S.; KURMAN, R. J. Calretinin, a more sensitive but less specific marker than alpha-inhibin for ovarian sex cord-stromal neoplasms: an immunohistochemical study of 215 cases. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 26, p. 1477–1483, 2002.
- MUSA, Z. A.; QASIM, B. J.; GHAZI, H. F.; et al. Diagnostic roles of calretinin in hirschsprung disease: A comparison to neuron-specific enolase. **Saudi journal of gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60–66, 2017.
- OHBU, M.; SAEGUSA, M.; OKAYASU, I. Apoptosis and cellular proliferation in oesophageal squamous cell carcinomas: differences between keratinizing and nonkeratinizing types. **Virchows Archiv**, v. 427, n. 3, p. 271–276, 1995.
- ORDOÑEZ, N. G. Value of Calretinin Immunostaining in Diagnostic Pathology: A Review and Update. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology** v. 22, n. 6, 2014.
- PIATTELI, A.; FIORONI, M.; IEZZI, G.; et al. Calretinin Expression in Odontogenic Cysts. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 394–396, 2003.

- REGEZI, J. A. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. **Modern Pathology**, v. 15, n. 3, p. 331-41, 2002.
- REVETT, S. P.; KING, G.; SHABANOWITZ, J.; et al. Characterization of a helix-loop-helix (EF hand) motif of silver hake parvalbumin isoform B. **Protein Science**, 1997.
- SANDRA, F.; NAKAMURA, N.; MITSUYASU, T.; et al. Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre). **Histopathology**, v. 39, p.93-98, 2000.
- SCHWALLER, B. Calretinin: from a “simple” Ca^{2+} buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. **Frontier in neuroanatomy**, v.8, 2014.
- SCHWALLER, B. Cytosolic Ca^{2+} buffers. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2010.
- SCHWALLER, B. The continuing disappearance of “pure” Ca^{2+} buffers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 275-300, 2009.
- SCHWALLER, B.; HERRMANN, B. Regulated redistribution of calretinins in WiDr cells. **Cell Death Differ**, v. 4, p. 325–333, 1997.
- SHAIKH, Z.; NURANJAN, K. C. Cell cycle aberration in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor: As evidenced by the expression of p53 and survivin. **Indian Journal of Dental Research**, v. 26, n. 6, p.556-570, 2015.
- SHEAR, M. The unity of tumours of odontogenic epithelium. **British Journal of Oral Surgery**, 1962.
- SHERBET, G. V. Calcium Signalling in Cancer. **Boca Raton, Fla, USA: Taylor & Francis**. 2010.
- SHUKLA, P.; PRABHU, S.; JOSE, M.; et al. Comparative immunohistochemical study of Bcl-X in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor and adenomatoid odontogenic tumor. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 21, n. 2, p.51-57, 2017.
- SIMSIR, A.; FETSCH, P.; et al. Calretinin immunostaining in benign and malignant pleural effusions. **Diagnostic Cytopathology**, v. 24, n. 2, p. 149-152, 2001.
- SMITH, R. R.; OLSON, J. L.; HUTCHINS, G. M.; et al. Adenomatoid odontogenic tumor: ultrastructural demonstration of two cell types and amyloid. **American Cancer Society**, 1979.
- STEVENSON, L.; ALLEN, W. L.; PROUTSKI, I.; et al. Calbindin 2 (CALB2) regulates 5-fluoruracil sensitivity in colorectal cancer by modulating the intrinsic apoptotic pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- SUNDARAGIRI, S. K.; CHAWDA, J.; GILL, S.; et al. Calretinin expression in unicystic ameloblastoma: an aid in differential diagnosis. **Journal of Oral Biosciences**, v. 52, n. 2, p. 164–169, 2010.
- TALIANO, R. J.; LU, S.; KAMALJEET, S.; et al. Calretinin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast is associated with basal-like subtype and unfavorable prognosis. **Human Pathology**, v. 44, n. 12, 2013.
- TERRACCIANO, L. M.; et al. Calretinin as a marker for cardiac myxoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, p. 754-759, 2000.
- THAPA, B.; WALKIEWICZ, M.; MURONE, C.; et al. Calretinin but not caveolin-1 correlates with tumour histology and survival in malignant mesothelioma. **Pathology**, v. 48, n. 7, 2016.
- WOOFF, J. C.; WEINREB, I.; PEREZ-ORDONEZ, B.; et al. Calretinin staining facilitates differentiation of olfactory neuroblastoma from other small round blue cell tumors in the sinonasal tract. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 35, ed. 12, p. 1786-1793, 2011.
- WRIGHT, J. M.; VERED, M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head and Neck Pathology**, v.11, n.1, 2017, p.68-77.

ANEXO A - Diretrizes para Autores da Revista Horizonte Científico

A revista Horizonte Científica é uma publicação eletrônica, semestral, da Diretoria de Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, que publica em português os artigos científicos resultantes de pesquisas iniciação científica como dos apoiados pelo CNPq, FAPEMIG e UFU - e do Programa Institucional de Apoio à Iniciação Científica - PIAIC.

1. FORMATAÇÃO DO TEXTO:

1.1. Margens de 2,5 cm, espaçamento 1,5 cm, fonte Times New Roman 12. espaçamento 1,5
Cada página deverá ser numerada consecutivamente com algarismos arábicos no canto superior direito;

1.2. O artigo deverá conter no máximo 30 páginas e deve estar em formato DOC. (versão 97-2003 do WORD) OBS: A formatação deve ser em uma coluna.

1.3. Os nomes dos autores devem constar somente na Submissão de Metadados, devendo ser excluídos do corpo do texto.

OBS: os nomes dos autores serão incluídos no processo de Editoração de Texto, logo após a avaliação dos pareceristas.

1.4. As ilustrações (mapas, fotos (colorido ou preto e branco), etc.) devem fazer parte do corpo do texto em formato digital GIF ou JPEG. Os gráficos também devem fazer parte do corpo do texto;

1.5. Notas de rodapé: serão aceitas quando forem absolutamente necessárias para explanações que não possam ser incluídas no texto ou nas tabelas, tais como: a) nome da instituição onde foi realizado o trabalho; b) consignação de bolsas e outros auxílios financeiros; c) comunicação pessoal. As notas de rodapé deverão ser anunciadas no texto mediante número sobrescrito e devem figurar na página em que o número aparece;

1.6. Os nomes científicos devem ser escritos, no texto, na íntegra (Ex.: *Vellozia caruncularis* e não *V. caruncularis*;

1.7. Quando o texto contiver fórmulas editadas no módulo de Equações do Word, o tamanho deve ser o seguinte: Interno – 12 pts; Subscrito/Subrescrito – 10pts; Sub-Subscrito/Sobrescrito – 8 pts; Símbolo – 12 pts e Sub-Símbolo – 10 pts;

1.8. O texto é de inteira responsabilidade dos autores. A redação deve ser clara, concisa e objetiva e a linguagem correta, precisa, coerente e simples. Adjetivos supérfluos devem ser evitados, assim como, a forma excessivamente compacta, que pode prejudicar a compreensão do texto. O texto deve passar por uma criteriosa correção de português antes de ser enviado

para a publicação; A REvista Horizonte Científico se resguarda o direito a pequenas adequações textuais para melhor compreensão do texto.

1.9. Os autores concedem os direitos autorais para futuras publicações desde que a fonte seja referenciada.

2. FORMATO DO ARTIGO:

2.1. TÍTULO: em letra maiúscula e negrito. Deve ser conciso e informativo.

2.2. NOME DOS AUTORES: os nomes completos dos autores (em letra maiúscula) deverão estar posicionados entre o título em português e o Resumo, alinhados a esquerda, colocados em sequência horizontal, identificados com número sobrescrito e caracterizado no rodapé da primeira página, conforme a seguinte sequência: unidade acadêmica, instituição, endereço, cidade, CEP e endereço eletrônico do autor para correspondência.

OBS: Lembrando que os nomes serão inseridos no corpo do texto somente após a avaliação dos pareceristas, no processo de Editoração de Texto.

O Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

2.3. ABSTRACT, RÉSUMÉ ou RESUMEN: O artigo deverá ser encaminhado com o resumo em português e em uma segunda língua, que poderá ser o inglês, francês ou Espanhol. OBS: O resumo e o abstract devem constar em página exclusiva do texto. Exceção: nos casos em que o resumo e o abstract couberem na mesma página.

2.4. PALAVRAS CHAVE: até 5, em espanhol, inglês, francês e português. O abstract, résumé, resumen e o Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

2.5. TEXTO: O texto deverá iniciar logo a seguir, colocando sequencialmente: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS; DISCUSSÃO; CONCLUSÃO; AGRADECIMENTOS (se necessário) e REFERÊNCIAS.

OBS.: A critério dos autores os itens Resultados, Discussão e Conclusão, poderão aparecer em separado ou Resultados e Discussão juntos e ainda as Conclusões poderão aparecer junto com a Discussão. Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Todas as citações, no decorrer do texto, devem ser incluídas na lista de Referências Bibliográficas, em ordem alfabética, de acordo com as normas ABNT (NBR-6023/89), Citações Longas (mais de três linhas) Devem constituir um parágrafo independente, recuado 4 cm da margem esquerda, com linhas separadas por espaço simples, letra menor que a do texto utilizado e sem aspas.

ANEXO B – Comprovante de Iniciação Científica*



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DIRETORIA DE PESQUISA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o(a) discente **ANAÍRA RIBEIRO GUEDES FONSECA COSTA**, do curso de Graduação em Odontologia desta Universidade, participou como bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFU, no projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS, EPIGENÉTICAS E DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADAS A CARCINOGENESE HUMANA NA REGIÃO BUCOMAXILOFACIAL". A orientação foi efetuada pelo(a) Prof(a). ADRIANO MOTA LOYOLA, do(a) Faculdade de Odontologia - FOUFU, sendo o período de vigência da bolsa de Agosto/2016 a Julho/2017. O projeto está cadastrado nesta Diretoria sob o nº CNPQ2016-SAU001.

Certificado emitido às 20:15:00 de terça-feira, 1 de agosto de 2017.

ESTE CERTIFICADO FOI GERADO ELETRONICAMENTE PELO SEG/PROPP. SUA AUTENTICIDADE PODERÁ SER CONFIRMADA NO SEG/PROPP (<http://www.propp.ufu.br/link/SEG/PROPP>), POR MEIO DO CÓDIGO **1CD61ECB-421E-49B7-AAC4-A8B2B5C011E9**

*O título presente no certificado se refere ao Projeto do Orientador, dentro do qual se insere o Plano de Trabalho do Aluno, que recebe o mesmo título deste trabalho.

ANEXO C – Comprovante de Aprovação no CEP**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise das alterações genéticas, epigenéticas e de expressão gênica associadas a carcinogênese humana na região bucomaxilofacial

Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA

Versão: 2

CAAE: 52906815.7.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 006149/2016

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Análise das alterações genéticas, epigenéticas e de expressão gênica associadas a carcinogênese humana na região bucomaxilofacial que tem como pesquisador responsável ADRIANO MOTA LOYOLA, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal de Uberlândia/MG em 02/02/2016 às 14:48.