

Universidade Federal do Rio grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Mestrado em Patologia Bucal

**ANÁLISE QUANTITATIVA DAS AgNORs E EXPRESSÃO DO EPIDERMAL
GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) EM AMELOBLASTOMA**

Márcia Rodrigues Payeras

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos obrigatórios para obtenção do
título de **Mestre em Patologia Bucal**.

Prof. Dr. João Jorge Diniz Barbachan
Orientador

Porto Alegre, agosto de 2005.

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar
Fazer da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim terá valido a pena existir!”*

Fernando Sabino

DEDICATÓRIA

Aos meus maiores incentivadores: meus pais, **Carlos e Margarida**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre me lembrar que “*Debaixo do céu, há um tempo certo para todas as coisas*”. Ecl. 3,1.

Aos meus **pais**, por jamais medirem esforços em detrimento de minha educação e pelo amor incondicional.

Às pessoas que fazem a diferença na minha vida: **Beto, Roberta, Bina, Valéria, Dani, Bibi, Li, Deison, Dadá, Léo, Lázaro, Tere e Fernanda**: Obrigada por tudo!

Ao professor **Marcos Martins Neto**, pela orientação durante a monitoria junto à disciplina de Patologia Bucal durante a graduação na UFSM e à professora **Cristiane Cademartori Danesi**, pelo incentivo desde os tempos da graduação.

Ao meu orientador **João Jorge Diniz Barbachan**, pela experiência, conhecimento, paciência e pela maneira como conduziu os meus primeiros passos no início do mestrado: meu eterno respeito!

Ao professor **Manoel Sant’Ana Filho**: “*Ser mestre é muito mais do que dar informações: é não apenas dar o peixe, mas ensinar a melhor maneira de lançar todas as redes*”. Palavra nenhuma poderia descrever o sentimento que tenho e que guardarei de ti. Obrigada pela idéia e originalidade do estudo, pela paciência e por todas as vezes que instigou o meu conhecimento. Admiro a clareza de tuas idéias e tenha certeza de que para onde quer que eu vá, levarei comigo a lembrança de tuas risadas, gritos e principalmente do primeiro conselho que me deste quando entrei no mestrado!

Aos professores **Pantelis Varvaki Rados**, pelo exemplo de seriedade à docência, **Onofre Francisco de Quadros**, pelo carinho que sempre demonstrou a mim e à professora **Anna Cecília Moraes Chaves**, por todas as vezes que se mostrou acessível e disposta a ajudar.

Às colegas **Ana Luísa, Laura e Luhana**. **Ana**, obrigada por todas as vezes que me mostrou que podemos levar a vida de um jeito mais leve, sem tanto estresse, **Laurinha**, obrigada por sempre estar disposta a ajudar, principalmente com as fotos e **Lu**, obrigada

pelos conselhos e incentivos constantes. Gurias, não importa o que digam: vocês são ótimas! Obrigada por tudo e estejam certas de que jamais esquecerei do carinho com que me receberam em suas vidas!

À **Isabel da Silva Lauxen**, pela paciência, pelos livros emprestados e espírito crítico durante toda a realização desse estudo, desde as realizações das técnicas até a discussão dos resultados.

À **Márcia Gaiger de Oliveira**, pelos artigos e conhecimentos compartilhados.

À **Bianca Prass Barbieri**, pela ajuda durante a realização das técnicas.

Ao **Leandro Nunes**: jamais esquecerei da forma prestativa como atendeu aos meus pedidos.

À **Adriana Aguiar**, pela ajuda nos assuntos burocráticos.

A todos os meus **colegas de mestrado**: *“Cada um que passa na nossa vida, passa só, mas não vai só. Leva consigo um pouco de nós e deixa um pouco de si. Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada”*.

As funcionárias da biblioteca, **Norma, Heloísa, Rejane e Mailing** pela ajuda durante todo o mestrado.

Aos **alunos da graduação, turma ATO 07/02**, pela confiança que depositaram em mim durante o exercício de minha atividade docente junto às aulas práticas da disciplina de Patologia Geral.

À dona **Marina**, pelo sorriso com que sempre me recebeu em todas as manhãs.

Aos bolsistas de iniciação científica **Tiago e Guilherme**, pelo ótimo convívio e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao **CNPq**, por financiar os meus estudos nesses dois anos.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade proliferativa, através da quantificação das AgNORs, e expressão do Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) em células epiteliais de ameloblastomas. Onze casos de ameloblastomas foram submetidos à técnica de hematoxilina e eosina, para análise morfológica; à técnica de impregnação com prata para quantificação das AgNORs e à marcação com anticorpo anti-Epidermal Growth Factor Receptor. Os resultados não revelaram diferenças estatisticamente significativas quanto à quantificação das AgNORs. A expressão do EGFR nas ilhas epiteliais de ameloblastoma não se mostrou uniforme, sendo possível identificar ilhas marcadas e ilhas sem marcação. A localização da marcação também foi variável nas diferentes ilhas epiteliais, sendo a marcação predominante a de citoplasma e raras as de membrana, essas geralmente eram nas ilhas epiteliais de menor tamanho. Concluiu-se que o tumor apresenta um crescimento irregular, com as ilhas de menor tamanho podendo estar associadas a uma maior atividade proliferativa, contribuindo para a infiltração do tumor.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the proliferation activity by means of the quantification of the AgNORs and the patterns of expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in ameloblastomas. Eleven cases of ameloblastoma were submitted to the hematoxylin-eosin stain for the morphologic analysis, to the silver impregnation technique for quantification of the AgNORs and to the immunohistochemical stain with anti-Epidermal Growth Factor Receptor antibody. The results did not show a significant statistical difference as per quantification of the AgNORs. The expression of the EGFR on the epithelial islands of ameloblastoma was not uniform, being possible to identify both marked islands and islands with the absence of labeling. The location of the expression was also variable on the different epithelial islands. The predominant expression was that of cytoplasm and the islands with a expression of only membrane were rare and they were generally smaller in size. It may be concluded that the tumor presents an irregular growth, being that the smaller islands are associated with a higher proliferation activity and therefore could be the ones responsible for the tumor infiltration.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	9
2. OBJETIVO.....	20
REFERÊNCIAS	21
3. ARTIGO CIENTÍFICO*	28
Introdução	28
Metodologia.....	30
Resultados	33
Discussão.....	38
Conclusão	42
Referências	43
ANEXO	47

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O ameloblastoma é o 2º tumor odontogênico benigno mais freqüente (SANTOS et al., 2001; OCHSENIUS et al., 2002). Desenvolve-se a partir de remanescentes epiteliais da embriogênese dentária e do epitélio de cistos odontogênicos, particularmente do cisto dentífero. (EBLING, 1977; SHAFER, HINE, LEVY, 1987; HOLMLUND et al., 1991; REGEZI, SCIUBBA, 2000; NEVILLE et al., 2004).

Caracteriza-se por ser um tumor de idade adulta, sem predileção por sexo e raça, localizado mais freqüentemente na região de corpo e ângulo da mandíbula (REICHART, PHILIPSEN, SONNER, 1995; SANTOS et al., 2001; KIM, JANG, 2001; OCHSENIUS et al., 2002).

Baseado no comportamento clínico e prognóstico pode-se distinguir três tipos de ameloblastomas: unicístico, multicístico ou sólido e periférico. (NEVILLE et al., 2004). O ameloblastoma sólido é o mais freqüente e também uma lesão localmente invasiva (UENO, MUSHIMOTO, SHIRASU, 1989; KRAMER, PINDBORG, SHEAR, 1992) e destrutiva (ROSA, JAEGER, JAEGER, 1997), que apresenta recidiva mesmo em pacientes tratados cirurgicamente com margem de segurança (REICHART, PHILIPSEN, SONNER, 1995). O mecanismo dessa agressividade local ainda é desconhecido (PINHEIRO et al., 2004).

Em 1977, Ebling relatou a tendência do ameloblastoma em apresentar recidivas tardias. Gardner (1999), afirmou a necessidade de um controle dessa lesão por toda a vida do paciente, através de um acompanhamento clínico e radiográfico. Em 2000, Wagner et al., documentaram um caso de recidiva de ameloblastoma 32 anos após a excisão cirúrgica do tumor primário, ratificando dessa forma, a necessidade de um controle da lesão por um longo período de tempo.

Com relação ao aspecto histológico, Kramer, Pindborg e Shear (1992) classificaram o ameloblastoma em: folicular, plexiforme, acantomatoso, de células basais, de células granulosas e unicístico. As características mais comumente encontradas são as proliferações de ilhas ou cordões epiteliais, com as células mais periféricas assemelhando-

se aos pré-ameloblastos e as células do interior das ilhas semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte, no interior de um tecido conjuntivo formado por feixes de fibras colágenas relativamente frouxos ou densos (EBLING, 1977). Dentre esses, os tipos folicular e plexiforme são os mais freqüentemente encontrados (REICHART, PHILIPSEN, SONNER, 1995; KIM, JANG, 2001; JÄÄSKELÄINEN et al., 2002; NEVILLE et al., 2004).

Ueno, Mushimoto e Shirasu (1989) e Reichart, Philipsen e Sonner (1995) afirmaram que o ameloblastoma tipo folicular recorre mais vezes que o tipo plexiforme.

Funaoka et al. (1996) estudando a detecção da PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) em 23 casos de ameloblastoma, encontraram uma média de células positivamente marcadas pela PCNA no tipo histológico folicular superior a média encontrada no tipo plexiforme e unicístico.

Em estudo de Ong'uti et al. (1997), com 54 casos de ameloblastoma para avaliar a atividade proliferativa e correlacionar com as características clínicas e histológicas, os resultados mostraram que o tipo folicular teve uma diferença estatisticamente significativa de células positivamente marcadas pelo marcador imunohistoquímico de proliferação celular Ki-67, quando comparado com o tipo plexiforme. Além disso, pôde-se observar que a presença do Ki-67 foi predominantemente nas células semelhante aos pré-ameloblastos e ocasionalmente nas células semelhantes ao retículo estrelado.

Apesar disso, destaca-se que mais de um padrão histológico pode estar presente em uma mesma lesão e que os diferentes tipos histológicos não podem predizer o comportamento clínico do tumor (BARBACHAN et al., 1985; KRAMER, PINDBORG, SHEAR, 1992; JÄÄSKELÄINEN et al., 2002).

Para uma melhor compreensão do comportamento agressivo do ameloblastoma, ele tem sido avaliado quanto à expressão de citoqueratinas, metaloproteinases, da p53, de receptores de fatores de crescimento, assim como da atividade proliferativa, através de métodos histoquímicos e imunohistoquímicos (RADOS et al., 1991; PIATTELLI et al., 1998; SILVEIRA, 1999; MUNERATO, 1999; SANDRA et al., 2001; MEER et al., 2003; VERED, SHOHAT, BUCHNER, 2003; PINHEIRO et al., 2004).

Entre os métodos de avaliação da atividade proliferativa destaca-se o método histoquímico de AgNORs, o qual é utilizado por ser simples, de baixo custo (TEIXEIRA et al., 1996) e pela possibilidade de ser realizado em material rotineiramente fixado em formalina e embebido em parafina. Essa técnica detecta proteínas associadas com as NORs (regiões organizadoras nucleolares), segmentos de DNA, localizados nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, que transcrevem o RNA ribossomal (TEIXEIRA et al., 1996; MELLO, ALVES, 1999; SCHLIEPHAKE, 2003). As NORs ativas estão associadas às proteínas não-histônicas e argirófilas, que apresentam afinidade com prata e são conhecidas como AgNORs. (SCHLIEPHAKE, 2003).

O número e o tamanho das AgNORs são variáveis, de acordo com a transcrição de RNA ribossomal. Em tumores malignos, as AgNORs são mais numerosas e menores quando comparadas com neoplasmas benignos (CROCKER, BOLDY, EGAN, 1989). Núcleo de células com uma baixa produção ribossomal apresentam uma AgNOR grande e única, enquanto que núcleo de células com alta produção ribossomal exibem um grande número de pequenas AgNORs (DERENZINI, 2000).

Além disso, esse método reflete a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular, assim a marcação das AgNORs pode ser associada aos demais métodos que avaliam a fração de crescimento, para termos uma visão mais precisa da atividade proliferativa do tumor (MELLO, ALVES, 1999).

Essa técnica tem sido considerada como um parâmetro confiável para definir o curso clínico e prognóstico de muitos tumores (DERENZINI, 2000; SCHLIEPHAKE, 2003).

As proteínas associadas com às NORs, detectadas pela técnica de AgNORs, apresentam-se como pontos pretos bem definidos dentro do núcleo amarelo-acastanhado (TRERÈ, 2000).

A quantificação das AgNORs pode ser realizada através da contagem, percentual do número de AgNORs por núcleo e mensuração da área dos pontos. O método de contagem de pontos por núcleo foi a primeira forma de quantificação a ser realizada, e mesmo sendo a mais amplamente utilizada, observa-se uma limitação na standardização da contagem

(ALLISON; SPENCER, 1993; TRERÈ, 2000), apesar de Crocker, Boldy e Egan (1989), na tentativa padronizar a contagem, terem publicado algumas recomendações para realização da enumeração das AgNORs, principalmente nos casos de pontos associados.

Com a introdução do método de mensuração da área de AgNORs (DERENZINE et al., 1989; RÜSCHOFF et al., 1990) a quantificação tornou-se mais precisa e reproduzível (TRERÈ, 2000). Em 1992, Mourad et al. introduziu o percentual de células com um, dois, três e quatro ou mais pontos de AgNOR por núcleo.

Em estudo de Xie et al. (1997), o percentual de núcleos com mais de uma AgNOR se mostrou um indicador importante com respeito ao prognóstico de pacientes com carcinomas espinocelulares de boca.

Em 2000, Pich, Chiusa e Margaria discutiram os resultados obtidos por eles em vários trabalhos realizados na avaliação das AgNORs em diferentes neoplasias humanas. Os autores concluíram que a quantificação das AgNORs é um importante fator prognóstico em várias neoplasias, podendo contribuir para a estratificação de pacientes em diferentes grupos de risco.

Em carcinomas espinocelulares de boca, a relação entre a quantificação de AgNORs e prognóstico foi estudada por Sano et al. (1991) e Teixeira et al. (1996). Os resultados dos dois estudos sugeriram que carcinomas de boca com mais de 3 AgNORs por núcleo podem apresentar um comportamento mais agressivo e, portanto um pior prognóstico, apresentando um maior risco de recorrência e indicação de uma terapêutica mais agressiva.

Allison e Spencer (1993), realizaram a contagem de AgNORs em cistos odontogênicos, ameloblastomas e carcinoma de células basais. Os resultados revelaram uma média entre 2,02 e 2,65 para os cistos odontogênicos, 2,24 para o ameloblastoma e 2,81 para os carcinomas de células basais, indicando que esse método não apresenta um valor diagnóstico e prognóstico nessas lesões. No entanto, em estudo para distinção entre ameloblastomas e carcinomas de células basais realizado por Rosa, Jaeger e Jaeger (1997), 90% das células do ameloblastoma apresentaram uma ou duas AgNORS por núcleo, enquanto que 70% das células do carcinoma de células basais apresentaram duas

ou três AgNORs por núcleo. Os autores, concluíram que, apesar dos dois tumores apresentarem padrão de crescimento similar, eles apresentam uma média de AgNORs significativamente diferente.

Coleman, Altini e Groeneveld (1996), estudaram o valor da quantificação das AgNORs na distinção entre cistos odontogênicos (residual, dentígero e ceratocisto) e o ameloblastoma unicístico, contando as AgNORs de 100 consecutivos núcleos basais. Os resultados mostraram que o ameloblastoma unicístico teve uma contagem de AgNORs inferior quando comparada com os outros grupos de cistos, e o cisto dentígero apresentou uma contagem significativamente maior de AgNORs quando comparada com o cisto residual e o ameloblastoma unicístico. Os autores concluíram que a contagem de AgNORs não pode ser usada como meio diagnóstico entre diferentes cistos odontogênicos e o ameloblastoma unicístico. No entanto, Eslami et al. (2003) avaliando a contagem das AgNORs como critério quantitativo no diagnóstico de cistos e tumores odontogênicos, revelaram que tanto o ameloblastoma unicístico como o sólido apresentaram uma contagem de AgNORs significativamente maior que o cisto dentígero e o ceratocisto.

A atividade proliferativa exibida pelos diferentes tipos histológicos do ameloblastoma e do tumor odontogênico adenomatóide foi estudada, através da análise quantitativa de AgNORs de 150 núcleos de células tumorais, com o objetivo de correlacionar os resultados com o comportamento clínico desses tumores. Os resultados não revelaram diferenças no número médio de AgNORs entre os diferentes tipos de ameloblastoma e entre esse e o tumor adenomatóide, permitindo aos autores sugerir que o comportamento clínico invasivo do ameloblastoma não está relacionado com a proliferação celular (MEDEIROS, FREITAS, SOUZA, 1997). Esse mesmo resultado foi observado por Do Carmo e Silva (1998), que em análise do número médio de AgNORs nos diferentes tipos histológicos do ameloblastoma e do tumor odontogênico adenomatóide, observaram que a única diferença estatisticamente significativa foi entre os tipos folicular e plexiforme do ameloblastoma.

Com o objetivo de avaliar o comportamento proliferativo do epitélio de ameloblastomas, Munerato (1999), utilizou as técnicas de marcação AgNORs e PCNA. Os

resultados revelaram que as células semelhantes aos pré-ameloblastos apresentaram resultados estatisticamente superiores quando comparadas com as células assemelhadas ao retículo estrelado do órgão do esmalte, fazendo o autor concluir que essas células são as detentoras da atividade proliferativa desse tumor.

Em estudo de Pinheiro et al. (2004), 12 casos de ameloblastomas foram submetidos à detecção imunohistoquímica de diferentes metaloproteinases, à técnica que avalia a quantidade de proteínas ativas e à técnica de impregnação pela prata para quantificação das AgNORs. Os resultados mostraram uma atividade funcional das metaloproteinases 1, 2 e 9, além de uma atividade celular proliferativa significativamente maior junto às proximidades ósseas quando comparada às áreas do interior da lesão. Dessa forma, os autores concluíram que as metaloproteinases presentes no ameloblastoma poderiam digerir a matriz óssea e liberar fatores mitogênicos, que poderiam aumentar a atividade proliferativa do tumor, sugerindo um mecanismo interdependente envolvendo as metaloproteinases detectadas no estudo e a proliferação celular em ameloblastomas, o que contribuiria para a agressividade local do tumor.

Sabendo-se que, a atividade proliferativa, assim como a capacidade de resposta celular a inúmeros sinais extracelulares depende da ativação de receptores de fatores de crescimento (CARPENTER, 1987), muitos estudos têm dedicado atenção a eles, buscando encontrar mecanismos de controle dos níveis desses receptores e dessa forma, da proliferação celular (WOODBURN et al., 1999; BASELGA, 2001; BASELGA, 2002; CIARDIELLO, TORTORA, 2003; HERBST, 2004).

Dentre os receptores de fator de crescimento, a família de receptores c-erb B ou HER, tem sido estudada, visto que eles estão presentes em células normais e altamente expressos em uma ampla variedade de tumores. (CARPENTER, 1987; BASELGA, 2002).

Essa família de receptores é composta por quatro receptores transmembrana tirosinaquinase, o HER-1 (c-erb B 1), HER-2 (c-erb-B 2), HER-3 (c-erb B 3) e HER-4 (c-erb-B 4) (BASELGA, 2002; CASALINI et al., 2004), que compartilham similaridades na estrutura e função (HERBST, 2004).

O HER-1, mais conhecido como EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), é codificado a partir da expressão do gene localizado no braço curto do cromossomo 7, sendo uma glicoproteína de 170-kd, que consiste de três regiões: um domínio externo (local de ligação com o fator de crescimento específico), uma região transmembrana e um domínio intracelular com função tirosinaquinase (CARPENTER, 1987; CARPENTER, COHEN, 1990; BOULOUGOURIS, ELDER, 2002; JORISSEN et al., 2003; HERBST, 2004).

Vários fatores de crescimento podem se ligar e ativar o EGFR, sendo que os mais importantes são o EGF (Epidermal Growth Factor) e o TGF- α (Transforming Growth Factor) (HERBST, 2004). Esses fatores de crescimento são estruturalmente semelhantes e apresentam uma afinidade de ligação pelo EGFR, induzindo a produção de respostas mitogênicas (CARPENTER, COHEN, 1990).

A ligação desses fatores de crescimento com o EGFR resulta na homo ou heterodimerização do receptor, seguida pela internalização do complexo ligante-receptor e autofosforilação da região intracelular do receptor. Assim resíduos de tirosinaquinase fosforilados servem como sítios ligantes para o recrutamento de transdutores de sinal (CARPENTER, COHEN, 1979; BOONSTRA et al., 1995; BASELGA, 2001; JORISSEN; 2003). Dentre eles, destaca-se o sinal transmitido pela via de sinalização regulada pelas proteínas da família Ras, principal via ativada pelo EGFR (BOONSTRA et al., 1995), o qual pode levar a proliferação celular, assim como processos associados à progressão tumoral, como angiogênese, inibição da apoptose, motilidade, adesão e invasão. (WOODBURN, 1999).

Com a ativação e posterior internalização do complexo ligante-receptor, este pode ser degradado nos lisossomos (CARPENTER, COHEN, 1976), ser reciclado e retornar à membrana plasmática (WILEY, 2003), ou ser transportado para o interior do núcleo (HOPKINS, 1994; BOONSTRA et al., 1995; LIN et al., 2001; LO et al., 2005).

Estudos que têm demonstrado a presença de receptores tirosinaquinase, incluindo o EGFR, no interior do núcleo, observaram-no principalmente em tecidos com alta atividade proliferativa (HOPKINS, 1994; LIN et al. 2001). Nesse caso, a presença do receptor pode

estar associada com o seu ligante específico ou pode apresentar-se de forma isolada e fragmentada, somente com o domínio intracelular, com atividade tirosinaquinase (CARPENTER, 2003). Acredita-se que a função desse receptor, quando localizado no núcleo, esteja associada com a atividade regulatória da transcrição, resultando na ativação do gene da ciclina D1 e aumentando a síntese de DNA e a atividade proliferativa. No entanto, o significado da presença do EGFR no núcleo ainda não está completamente esclarecido (LO et al., 2005).

Todos os receptores, incluindo os da família Erb-B, são sintetizados e encaminhados para a sua localização celular específica, mesmo na ausência do ligante (WILEY, 2003). No entanto, diferentes localizações do EGFR podem ser observadas, de acordo com o tipo celular específico e o anticorpo utilizado. Em carcinomas, a distribuição restringe-se a membrana plasmática (PARTRIDGE et al., 1988) e ao núcleo (LIN et al., 2001; LO et al., 2005), enquanto que em células epiteliais normais, como as da mucosa bucal normal, Nordlund et al. (1991) observaram uma presença do receptor na membrana plasmática, enquanto Baumgart (2003) verificou uma presença na membrana plasmática e no interior do citoplasma. Esses dois estudos detectaram a marcação principalmente nas camadas basal e parabasal, assim como Partridge et al. (1988) e Putti et al. (2002).

Damjanov, Mildner e Knowles (1986), em estudo para determinar a localização imunohistoquímica do EGFR em diferentes tecidos humanos normais, encontraram variados padrões de expressão desse receptor. Os autores concluíram que a localização do receptor pode estar relacionada com a sua capacidade de resposta, no entanto o significado fisiológico dessa diferença de distribuição ainda é desconhecido (WILEY, 2003).

Em estudo de Nagatsuka et al. (2001), a presença e o grau de amplificação gênica do EGFR foi avaliada através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em 17 lesões cancerizáveis e 24 carcinomas espinocelulares, sendo 4 in situ. Todas as lesões mostraram amplificação gênica do EGFR, no entanto o grau de amplificação mostrou-se baixo em displasia epitelial e em carcinoma in situ, enquanto que foi alto em carcinoma espinocelular. Os autores sugeriram que a amplificação gênica do EGFR ocorre em estágios

relativamente precoces do desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca, assim como elevados graus de amplificação provavelmente apresentam importante papel na progressão tumoral.

O método mais apropriado para avaliar os níveis de EGFR para uso clínico é o imunohistoquímico (NICHOLSON, GEE, HARPER, 2001), o qual mostra a localização celular da expressão da proteína. No entanto, ainda não há uma standardização dos protocolos utilizados na preparação dos anticorpos, nos métodos de detecção, assim como no critério de marcação e sua interpretação, dificultando, dessa forma, uma avaliação consistente e de comparação de resultados (NICHOLSON, GEE, HARPER, 2001; CIARDIELLO, TORTORA, 2003).

Elevados níveis de EGFR têm sido identificados como um componente comum de numerosos tipos de cânceres (NICHOLSON, GEE, HARPER, 2001). Nesse caso, com uma maior expressão, haverá uma intensa geração do sinal e ativação de uma cascata de fosforilação de proteínas, resultando em células com crescimento mais agressivo e com características de invasibilidade (ETHIER, 2002). O aumento da expressão de EGFR é, provavelmente, um forte fator prognóstico em muitos tumores, e a inibição dessas ações celulares podem produzir substancial benefício terapêutico (NICHOLSON, GEE, HARPER, 2001).

Sabe-se ainda que, em tumores malignos, além do aumento da expressão do receptor, um número de EGFR mutantes tem sido observado em casos onde a amplificação gênica tem ocorrido. Essas mutações no receptor podem ser deleções, regiões de sequência duplicada ou defeito na regulação do sinal pela quinase (JORISSEN et al., 2003).

Além de estudos que avaliam a expressão do EGFR em tumores malignos, autores têm direcionado suas pesquisas na avaliação da expressão do EGFR em lesões odontogênicas, visto que esse receptor tem sido observado em epitélio da mucosa normal, de gengiva saudável e inflamada, de lesões inflamatórias periapicais, em tecidos envolvidos com o desenvolvimento dentário e em remanescentes do epitélio odontogênico em folículos

pericoronários (WANG et al., 1990; NORDLUND et al., 1991; COBO et al., 1992; LIN et al., 1996; BAUMGART, 2003).

Em epitélio gengival humano, a localização imunohistoquímica do EGFR foi avaliada por Nordlund et al. (1991). Nesse estudo, foi realizado o exame de tecido gengival periodontalmente saudável, com periodontite juvenil e de adulto. Em todas as amostras foi observada a expressão do EGFR na superfície das células basais do epitélio gengival, enquanto que em epitélio juncional, pouca ou nenhuma marcação pode ser observada, indicando uma baixa ou ausente expressão desse receptor nessas células. Uma marcação mais intensa na superfície celular na região inflamada das amostras de periodontite de adulto foi evidente, o que permitiu aos autores concluir que o processo inflamatório induz alterações na expressão do EGFR, e que ele está envolvido no crescimento e diferenciação epitelial em tecidos periodontais.

Araújo et al. (2003), estudaram a expressão imunohistoquímica do EGF, EGFR e o potencial proliferativo das células epiteliais, através da expressão proteína PCNA, de 10 amostras de tecido gengival normal (saudável) e de 10 amostras de fibromatose gengival hereditária. Os autores encontraram um alto nível de EGF e EGFR significativamente associados com o aumento da expressão da PCNA, assim como um maior nível de EGFR e células positivas para a PCNA na camada basal, indicando uma possível associação do EGFR com a proliferação e migração apical da papila gengival na fibromatose gengival hereditária.

Em 2003, Baumgart avaliou a expressão do EGFR em remanescentes do epitélio odontogênico de 20 folículos pericoronários. Os resultados mostraram que todas as células epiteliais remanescentes expressaram o receptor, no entanto com variações quanto a sua localização. A autora sugeriu que essas diferenças quanto à localização poderiam estar associadas ao desenvolvimento de cistos e tumores odontogênicos.

Shrestha et al. (1992), avaliaram a expressão de EGFR em 67 casos de cistos odontogênicos e 35 casos de tumores odontogênicos, dentre eles 21 ameloblastomas. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que os cistos e tumores odontogênicos

apresentam um mecanismo de proliferação diferente, visto que a avaliação de EGFR nesses diferentes tipos de lesões determinou uma expressão desse receptor nos diferentes tipos de cistos odontogênicos, e uma ausência de expressão nos tumores odontogênicos avaliados. No entanto, em estudo de Li, Browne e Mathews (1993), a avaliação da expressão de EGFR em cistos odontogênicos, ameloblastomas e granulomas periapicais contendo proliferação epitelial foi realizada, através da utilização de três anticorpos com conhecida reação em material fixado em formalina e embebido em parafina. Os resultados evidenciaram uma maior expressão de EGFR nos cistos odontogênicos de desenvolvimento (ceratocisto e dentígero) e no ameloblastoma quando comparada à expressão observada nos cistos inflamatórios e nos granulomas periapicais contendo restos epiteliais. A avaliação dos resultados permitiu aos autores concluir que a expressão de EGFR é influenciada pela presença de processo inflamatório no tecido conjuntivo adjacente.

Em estudo com casos de ameloblastoma, o EGFR foi observado mais freqüentemente nas células semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte de tipos histológicos foliculares, quando comparados com tipos plexiformes, principalmente nas áreas correspondentes à metaplasia escamosa. Essa localização do EGFR correspondeu à marcação do EGF, mas não à marcação positiva para o PCNA, o que permitiu aos autores concluir que a interação EGF-EGFR pode não estar se comportando como agente mitógeno e sim como um promotor da diferenciação escamosa nos casos de ameloblastoma estudados (UENO et al., 1994). No entanto, em estudo de Vered, Shohat e Buchner (2003), 100% das células foram positivamente marcadas. Nos tumores sólidos, tanto as células centrais como as periféricas foram marcadas, enquanto que nos ameloblastomas unicísticos as células basais foram mais intensamente marcadas que as da camada suprabasal. Esse estudo demonstrou que pacientes com ameloblastoma poderiam beneficiar-se com as novas modalidades terapêuticas anti-EGFR, principalmente nos casos em que há limitação cirúrgica ou nos casos de recidiva.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL:

Avaliar a atividade proliferativa, através da quantificação das AgNORs, e a expressão do Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) em ameloblastomas.

2.2. ESPECÍFICOS:

Realizar a contagem de pontos de AgNORs por núcleo, a mensuração da área dos pontos de AgNOR e o percentual de AgNORs por núcleo (pAgNOR=1, pAgNOR=2, pAgNOR=3 e pAgNOR=4 ou + por núcleo), nas células semelhantes aos pré-ameloblastos e células semelhantes ao retículo estrelado em ameloblastomas.

Analisar a expressão do EGFR de ameloblastomas, nas células semelhantes aos pré-ameloblastos e células semelhantes ao retículo estrelado.

REFERÊNCIAS

ALLISON, R.T.; SPENCER, S. Nucleolar Organiser Regions in Odontogenic Cysts and Ameloblastomas. **Br. J. Biomed. Sci.**, London, v. 50, no. 4, p. 309-312, Dec.1993.

ARAÚJO, C.S.A. et al. Histomorphometric Characteristics and Expression Growth Factor and Its Receptor by Epithelial Cells of Normal Gingiva and Hereditary Gingival Fibromatosis. **J.Periodont. Res.** Copenhagen, v. 38, no.3, p. 237-241, June 2003.

BARBACHAN, J.J.D. et al. Considerações sobre o Estudo dos Ameloblastomas. **Rev. Fac. Odont.**, Porto Alegre, v. 27, p. 13-25, 1985.

BASELGA, J. The EGFR as a Target for Anticancer Therapy - Focus on Cetuximab. **Eur. J. Cancer.**, Oxford, v. 37, Suppl 4, p. S16-S22, Sept. 2001.

BASELGA, J. Why the Epidermal Growth Factor Receptor? The Rationale for Cancer Therapy. **Oncologist**, Dayton, v. 7, Suppl 4, p. 2-8, Aug. 2002.

BAUMGART, C.S. **Análise da Expressão de Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em Folículos Pericoronários**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BOONSTRA, J. et al. The Epidermal Growth Factor. **Cell. Biol. Int.**, London, v. 19, no. 5, p. 413-430, May 1995.

BOULOUGOURIS, P.; ELDER, J.B. Epidermal Growth Factor Receptor and Transformation. **Surg. Today**, Tokyo, v. 32, no. 8, p. 667-671, Aug. 2002.

CARPENTER, G. Receptors for Epidermal Growth Factor and Other Polypeptide Mitogens. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 56, no. 1, p. 881-914, July 1987.

CARPENTER, G. Nuclear Localization and Possible Functions of Receptor Tyrosine Kinases. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, Philadelphia, v. 15, no. 2, p. 143-148, Apr. 2003

CARPENTER, G.; COHEN, S. 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 71, no. 1, p. 159-171, Oct.1976.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal Growth Factor. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 48, no. 1, p. 193-216, July 1979.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal Growth Factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, no.14, p. 7709-7712, May 1990.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as a Target in Cancer Therapy: Understanding the Role of Receptor Expression and Other Molecular Determinants that Could Influence the Response to Anti-EGFR Drugs. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 39, no.10, p. 1348-1354, July 2003.

COBO, J. et al. Immunohistochemical Localization of Epidermal Growth Factor Receptor and Its Receptor During Odontogenesis in The Rat. **Eur. J. Orthod.**, Oxford, v. 14, no. 5, p. 333-338, Oct. 1992.

COLEMAN, H.G.; ALTINI, M.; GROENEVELD, H.T. Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Odontogenic Cysts and Ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, no. 8, p. 436-440, Sept. 1996.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How Should we Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 158, no. 3, p. 185-188, July 1989.

DAMJANOV, I.; MILDNER, B.; KNOWLES, B.B. Immunohistochemical Localization of the Epidermal Growth Factor Receptor in Normal Human Tissues. **Lab. Invest.**, Hagerstown, v. 55, no. 5, p. 588-592, Nov. 1986.

DERENZINI M. et al. Distribution of Silver-Stained Interphase Nucleolar Organizer Regions as a Parameter to Distinguish Neoplastic from Nonneoplastic Reactive Cells in Human Effusions. **Acta. Citol.**, St. Louis, v. 33, no. 4, p. 491-498, July/Aug. 1989.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, Oxford, v.31, no. 2, p. 117-120, Apr. 2000.

DO CARMO, M.A.V.; SILVA, E.C. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Ameloblastomas and Adenomatoid Odontogenic Tumours. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 27, no. 4, p. 153-156, Apr. 1998.

EBLING, H. Ameloblastoma (Adamantinoma). In: _____. **Cistos e Tumores Odontogênicos**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1977. Cap. 4, p. 39-82.

ETHIER, S.P. Signal Transduction Pathways: The Molecular Basis for Targeted Therapies. **Semin. Radiat. Oncol.**, Philadelphia, v. 12, no. 3, Suppl 2, p. 3-10, July 2002.

ESLAMINI, B. et al. Nucleolar Organizer Regions in Selected Odontogenic Lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 95, no. 2, p. 187-192, Feb. 2003.

FUNAOKA, K. et al. Immunohistochemical Detection of Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) in 23 Cases of Ameloblastoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 32, no. 5, p. 328-332, Sept. 1996.

GARDNER, D.G. Critique of the 1995 Review by Reichart et al. of the Biological Profile of 3677 Ameloblastomas. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, no. 4, p. 443-449, July 1999.

HERBST, R.S. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Tarrytown, v. 59, no.2 Suppl , p. 21-26, Feb. 2004.

HOLMLUND, A. et al. Ameloblastomas Originating from Odontogenic Cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, no. 7, p. 318-321, Aug. 1991.

HOPKINS, C.R. Internalization of Polypeptide Growth Factor Receptors and the Regulation of Transcription. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 47, no. 1, p. 151-154, Jan. 1994.

JÄÄSKELÄINEN, K. et al. Cell Proliferation and Chromosomal Changes in Human Ameloblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, New York, v. 136, no. 1, p. 31-37, July 2002.

JORISSEN, R.N. et al. Epidermal Growth Factor Receptor: Mechanisms of Activation and Signalling. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 284, no. 1, p. 31-53, Mar. 10 2003.

KIM, S; JANG, H. Ameloblastoma: a Clinical, Radiographic, and Histopathologic Analysis of 71 Cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 91, no. 6, p. 649-653, June 2001.

KRAMER, I.R.H.; PINDBORG, J.J.; SHEAR, M. Neoplasms and Other Tumours Related to the Odontogenic Apparatus. In: _____. **World Health Organization. International histological classification of tumours. Histological typing of odontogenic tumours.** 2nd ed. Berlin: Heidelberg, Springer-Verlag, 1992. P. 11-14.

LI, T.J.; BROWNE, R.M.; MATHEWS, J.B. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors by Odontogenic Jaw Cysts. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, Berlin Springer Verlag, v. 423, no. 2, p.137-44, June 1993.

LIN, L.M. et al. Detection of Epidermal Growth Factor Receptor in Inflammatory Periapical Lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 29, no. 3, p. 179-184, Mar. 1996.

LIN, S. et al. Nuclear Localization of EGF Receptor and Its Potencial New Role as a Transcription Factor. **Nat. Cell. Biol.**, London, v. 3, no. 9, p. 802-808, Sept. 2001.

LO, H. et al. Novel Prognostic Value of Nuclear Epidermal Growth factor Receptor in Breast Cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 65, no. 1, p. 338-348, Jan. 2005.

MEDEIROS, M.C.S.; FREITAS R.A ; SOUZA L.B. Análise Quantitativa das AgNORs nos Tipos Histológicos do Ameloblastoma e no Tumor Odontogênico Adenomatóide. **RGO**, Porto Alegre, v. 45, n. 2, p. 67-70, Mar./Abr.1997.

MEER, S. et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen and Ki-67 Immunoreactivity in Ameloblastomas. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 95, no. 2, p. 213-221, Feb. 2003.

MELLO, E.S., ALVES, V.A.F. Marcadores de Proliferação Celular In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 182-194.

MOURAD, W.A. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Breast Carcinoma: Correlation with DNA Flow Cytometry, Histopathology, and Lymph Node status. **Cancer**, Hoboken, v. 69, no. 7, p. 1739-1744, Apr. 1992.

MUNERATO, J.C. **Avaliação Quantitativa da Expressão da Proteína PCNA e das AgNORs em Ameloblastoma**. 1999. 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAGATSUKA, H. et al. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification by Competitive Polymerase Chain Reaction in Pre-Malignant and Malignant Oral Epithelial Lesions. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 7, p. 599-604, Oct. 2001.

NEVILLE, B. et al. Tumores Odontogênicos. In: _____. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 15, p. 586-595.

NICHOLSON, R.I.; GEE, J.M.W.; HARPER, M.E. EGFR and Cancer Prognosis. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 37, Suppl 4, p. S9-15, Sept. 2001.

NORDLUND, L. et al. Immunohistochemical Localization of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Gingival Epithelia. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 26, no. 4, p. 333-338, July/Aug. 1991.

OCHSENIUS, G. et al. Odontogenic Tumors in Chile: A Study of 362 Cases. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 31, no. 7, p. 415-420, Aug. 2002.

ONG'UTI, M.N. et al. Ki-67 Antigen in Ameloblastoma: Correlation with Clinical and Histological Parameters in 54 Cases from Kenya. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 26, no. 5, p. 376-379, Oct. 1997.

PARTRIDGE et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor on Oral Squamous Cell Carcinoma. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 26, no. 5, p. 381-389, Oct. 1988.

PIATTELI, A. et al. Expression of Proliferation Cell Nuclear Antigen in Ameloblastoma and Odontogenic Cysts. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, no. 5, p. 408-412, Sept. 1998.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNOR in Tumor Pathology. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 133-141, Apr. 2000.

PINHEIRO, J.J.V. et al. Local Invasiveness of Ameloblastoma. Role Played by Matrix Metalloproteinases and Proliferative Activity. **Histopathology**, Oxford, v. 45, no. 1, p. 65-72, July 2004.

PLOTON, D. et al. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organiser Region at the Optical Level. **Histochem. J.**, London, v. 18, no. 1, p. 5-14, Jan. 1986.

PUTTI, T.C. et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Head and Neck Cancers Correlates with Clinical Progression: a Multicentre Immunohistochemical Study in the Asi-Pacific Region. **Histopathology**, Oxford, v. 41, no. 2, p. 144-151, Aug. 2002.

RADOS, P.V. et al. Evidenciação de Citoqueratinas de alto e Baixo Peso Molecular em Ameloblastomas. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p.3-8, Dez. 1991.

REICHART, P.A; PHILIPSEN, H.P.; SONNER, S. P.A. Ameloblastoma: Biological Profile of 3677 Cases. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, v. 31B, no. 2, p. 86-99, Mar. 1995.

REGEZI J.A., SCIUBBA J.J. Tumores odontogênicos. In: _____. **Patologia Bucal, Correlações Clinicopatológicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 11, p. 292-302.

ROSA, L.E.B.; JAEGER, M.M.M.; JAEGER, R.G. Morphometric Study of Nucleolar Organiser Regions in Ameloblastoma and Basal Cell Carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, no. 3, p. 209-214, May 1997.

RÜSCHOFF, J. et al. Evaluation of Nucleolus Organizer (NORs) by Automatic Image Analysis: A Contribution to Standardization. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 161, no. 2, p. 113-118, June 1990.

SANDRA, F. et al. Immunohistochemical Evaluation of PCNA and ki-67 in Ameloblastoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 37, no. 2, p. 193-198, Feb. 2001.

SANO, K et al. Prognostic Implication of Silver – Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, no. 2, p. 53-56, Feb. 1991.

SANTOS, et al. Odontogenic Tumors: Analysis of 127 Cases. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 308-313, Out./Dez. 2001.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic Relevance of Molecular Markers of Oral Cancer – A Review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 32, no. 3, p. 233-245, Apr. 2003.

SILVEIRA, H.E.D. **Avaliação da Expressão p53 em Ameloblastomas**. 1999. 92f. Dissertação (Doutorado em Odontologia na área de concentração de Estomatologia Clínica) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. Cistos e Tumores de Origem Odontogênica. In: _____. **Tratado de Patologia Bucal**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. Cap. 4, p. 239-264.

SHRESTHA, P. et al. Epidermal Growth Factor Receptor in Odontogenic Cysts and Tumors. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 7, p. 314-317, Aug. 1992.

TEIXEIRA, G. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions Staining is Useful in Predicting Recurrence-Free Interval in Oral Tongue and Floor of Mouth Squamous Cell Carcinoma. **Am. J. Surg.**, New York, v. 172, no. 6, p. 684-688, Dec. 1996.

TRERÉ, D. AgNOR Staining and Quantification. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 127-131, Apr. 2000.

UENO, S.; MUSHIMOTO, K.; SHIRASU, R. Prognostic Evaluation of Ameloblastoma Based on Histologic and Radiographic Typing. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 47, no. 1, p. 11-15, Jan. 1989.

UENO S. et al. Immunohistochemical Investigation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Ameloblastomas. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 173, no.1 , p. 33-38, May 1994.

VERED, M.; SHOHAT, I.; BUCHNER, A. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Ameloblastoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, no. 2, p. 138-143, Feb. 2003.

WAGNER, J.C.B. et al. Ameloblastoma: Relato de Caso com Recidiva Extra-Óssea após 32 anos. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, v. 41, n. 1, p. 29-32, Jul. 2000.

WANG, S.L. et al. Identification of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Buccal Mucosa. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 35, no. 10, p. 823-828, Oct. 1990.

WILEY, H.S. Trafficking of the ErbB Receptors and Its Influence on Signaling, **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 284, no.1, p. 78-88, Mar. 2003.

WOODBURN, J.R. The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Inhibition in Cancer Therapy. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 82, no. 2-3, p. 241-250, May/Jun. 1999.

XIE, X et al. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia, and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer**, Hoboken, v. 79, no. 11, p. 2200-2208, June 1997.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

ANÁLISE QUANTITATIVA DAS AgNORs E EXPRESSÃO DO EGFR EM AMELOBLASTOMAS

M.R. Payeras¹, M. Sant'Ana Filho¹, I.S. Lauxen¹, J.J.D. Barbachan¹

¹ *Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

Palavras-Chave: Ameloblastoma, AgNORs, EGFR

INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico benigno que mostra um comportamento clínico localmente invasivo (1) e destrutivo (2), apresentando alta taxa de recidiva (3, 4) mesmo em pacientes tratados cirurgicamente com margem de segurança (5). O mecanismo dessa agressividade local ainda é desconhecido (6).

Para uma melhor compreensão do comportamento agressivo do ameloblastoma, ele tem sido avaliado quanto à expressão de metaloproteinases, receptores de fatores de crescimento, assim como quanto à atividade proliferativa, através de métodos histoquímicos e imunohistoquímicos (7-15).

Entre os métodos de avaliação da atividade proliferativa está a técnica de AgNORs, que impregna pela prata as proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs) ativas. NORs são segmentos de DNA, que na espécie humana localizam-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, e transcrevem o RNA ribossomal (16-18). As NORs ativas estão associadas às proteínas não-histônicas e argirófilas, que quando impregnadas pela prata são conhecidas como AgNORs (18). O número e o tamanho das AgNORs são variáveis, de acordo com o ritmo de transcrição de RNA ribossomal. Em tumores malignos, as AgNORs são mais numerosas e menores quando comparadas com neoplasmas benignos (19). Núcleo de células com uma baixa

produção ribossomal apresentam uma AgNOR grande e única, enquanto que núcleo de células com alta produção ribossomal exibem um grande número de pequenas AgNORs (20). Esse método reflete a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular, assim a marcação das AgNORs, pode ser associada aos demais métodos que avaliam a fração de crescimento, permitindo uma visão da velocidade da atividade proliferativa do tumor (17).

Acredita-se que a atividade proliferativa, assim como a capacidade de resposta celular a inúmeros sinais extracelulares está relacionada com a ativação de receptores de fatores de crescimento (21). Estudos têm dedicado atenção a eles buscando entender os mecanismos de controle dos níveis desses receptores e da proliferação celular (22-26). Dentre os receptores de fator de crescimento, destaca-se o Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), visto que esse receptor apesar de estar presente em células epiteliais normais, está altamente expresso em uma ampla variedade de tumores (21, 24). O EGFR é uma glicoproteína transmembrana de 170-kd, que consiste de três regiões: um domínio externo, uma região transmembrana e um domínio intracelular com função tirosinaquinase (21, 26-29). A ligação de fatores de crescimento específicos (EGF e TGF- α) com o EGFR resulta no recrutamento de transdutores de sinal (23, 29-31), que podem levar à proliferação celular, assim como a processos associados à progressão tumoral, como angiogênese, inibição da apoptose, motilidade, adesão e invasão. (22).

Inúmeros estudos avaliaram a atividade proliferativa em ameloblastomas (2, 14-17), no entanto poucos distinguiram a análise entre os tipos celulares epiteliais do tumor (7, 8, 14). Os estudos presentes na literatura avaliando a expressão do EGFR em ameloblastomas apresentaram resultados diversos e até mesmo contraditórios (15, 32, 33). A proposta desse estudo foi investigar a atividade proliferativa, através da quantificação das AgNORs, e a expressão do EGFR em 11 casos de ameloblastomas.

METODOLOGIA

SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Onze casos de ameloblastomas foram selecionados do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os critérios de inclusão no estudo foram: diagnóstico histopatológico de ameloblastoma, ausência de tecido calcificado na amostra e material suficiente para a realização de pelo menos três cortes sucessivos.

Foram feitos três cortes de cada bloco, com espessura de três micrometros, um foi corado com Hematoxilina e Eosina, para análise morfológica; outro foi impregnado com prata para verificação das proteínas associadas às NORs ativas, segundo o protocolo de Ploton et al. (34), e o último foi submetido à marcação com o anticorpo anti-Epidermal Growth Factor Receptor (Monoclonal Mouse Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR, clone H11-DAKO Cytomation, Carpinteria, CA), diluição 1:25, recuperação antigênica com tripsina 0,2%, utilizando o sistema de detecção Envision+®, System DAKO Cytomation, Carpinteria, CA. Para o controle positivo e negativo da técnica imunohistoquímica foi empregado carcinoma espinocelular de boca com omissão do anticorpo primário, no controle negativo.

Esse estudo teve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS (ANEXO).

ANÁLISE QUANTITATIVA E DESCRITIVA

A quantificação das AgNORs foi realizada através da análise de imagem digitalizada. As ilhas epiteliais selecionadas foram observadas em microscópio binocular, marca Zeiss®, (Modelo Standart 20), em um aumento de 400x. A captura das imagens foi realizada por câmera de vídeo (JVC®, com 1CCD, modelo TK-C620U, colorida) acoplada a um computador, marca UNISYS® (Modelo Aquanta DX), através do programa Microsoft VidCap Windows 95 (Microsoft Corp.-USA)® e transportados para o programa de imagem

Imagelab®, versão 2.3 (Sistema de Processamento e Análise de Imagens, Softium-Sistemas de Informática, São Paulo, Brasil) em uma resolução de 440x330 pixels, para a realização da contagem, com o auxílio da ferramenta contador manual.

Os campos de células epiteliais com histopatologia típica do tumor foram randomicamente capturados, até a quantidade que permitisse a contagem de 200 células epiteliais, 100 células semelhantes aos pré-ameloblastos e 100 células semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte.

Para a quantificação das AgNORs, foram realizadas a contagem dos pontos por núcleo, a mensuração da área dos pontos de AgNOR e percentual de AgNORs por núcleo (pAgNOR=1, pAgNOR=2, pAgNOR=3 e pAgNOR=4 ou + por núcleo). O critério de positividade foi a visualização de pontos pretos únicos ou múltiplos no interior de núcleos de coloração amarelada (Figura 1). Os pontos associados foram contados como único, seguindo método padronizado por Crocker, Boldy e Egan (19).

A análise da expressão do EGFR foi realizada através da descrição de marcação em cada lâmina, pela visualização direta ao microscópio marca Nikon® (modelo Eclipse-E200), em um aumento de 400x. As células epiteliais das ilhas tumorais escolhidas para análise foram as células periféricas, semelhantes aos pré-ameloblastos e as células do interior das ilhas, semelhantes ao retículo estrelado. Os critérios de positividade estabelecidos foram presença da coloração marrom (DAB), exclusivamente em membrana plasmática (marcação de membrana) (Figura 2), distribuída de forma granular e restrita ao citoplasma (marcação de citoplasma) (Figura 3) e presença de ambas as marcações anteriores (marcação de membrana e citoplasma) (Figura 4). Quando presente na lâmina, a mucosa bucal normal também foi avaliada.

CALIBRAGEM

Em uma etapa pré-experimental, foi realizado um treinamento com o professor orientador, a fim de padronizar os critérios de positividade e contagem. Durante o estudo, a

calibragem intra-examinador de quantificação das AgNORs foi realizada através da recontagem de um campo a cada dez campos estudados, aplicando-se o teste "t" ($\alpha=0,05$). No caso da análise descritiva, após o término da descrição de positividade do EGFR, cinco lâminas foram aleatoriamente selecionadas para uma nova descrição, e dessa forma observar o grau de concordância do observador. Os resultados revelaram que não houve diferença estatística entre as duas leituras.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através de tabelas, gráficos e estatísticas descritivas (médias e desvio-padrões). O teste estatístico utilizado foi o teste de comparações de médias t-student para amostras pareadas. Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0.

RESULTADOS

ANÁLISE QUANTITATIVA DAS AgNORs

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a média (Tabela 1), mensuração da área (Tabela 2) e percentual de AgNORs por núcleo (pAgNOR=1, pAgNOR=2, pAgNOR=3 e pAgNOR=4 ou + por núcleo) entre os diferentes tipos celulares estudados (Tabela 3, 4, 5 e 6). No entanto, apesar de os testes estatísticos aplicados não indicarem uma diferença significativa entre as diferentes células, foi observado que, descritivamente, existe uma tendência de valores maiores de média de número de AgNORs por núcleo, percentual de 2 e 3 AgNORs por núcleo e uma média da mensuração da área de AgNORs por núcleo para as células semelhantes aos pré-ameloblastos. As células semelhantes ao retículo estrelado apresentaram média superior somente quando o percentual de 1AgNOR por núcleo foi avaliado (Tabela 3).

Tabela 1. Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células semelhantes aos pré-ameloblastos e das células semelhante ao retículo estrelado, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	P
Semelhante ao pré-ameloblasto	11	1,51	0,19	0,08
Semelhante ao retículo estrelado	11	1,39	0,16	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS

Tabela 2. Distribuição das médias e desvios-padrão da mensuração da área de AgNORs por núcleo (μm^2) das células semelhantes aos pré-ameloblastos e das células semelhante ao retículo estrelado, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	p
Semelhante ao pré-ameloblasto	11	0,64	0,19	0,29
Semelhante ao retículo estrelado	11	0,59	0,17	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS

Tabela 3. Distribuição das médias e desvios-padrão da porcentagem de uma AgNORs por núcleo das células semelhantes aos pré-ameloblastos e das células semelhante ao retículo estrelado: **% 1 AgNOR**, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	p
Semelhante ao pré-ameloblasto	11	63,91	12,34	0,11
Semelhante ao retículo estrelado	11	69,91	10,84	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS

Tabela 4. Distribuição das médias e desvios-padrão da porcentagem de duas AgNORs por núcleo das células semelhantes aos pré-ameloblastos e das células semelhante ao retículo estrelado: **% 2 AgNOR**, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	p
Semelhante ao pré-ameloblasto	11	28,27	8,25	0,19
Semelhante ao retículo estrelado	11	23,36	9,05	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS

Tabela 5. Distribuição das médias e desvios-padrão da porcentagem de três AgNORs por núcleo das células pré-ameloblásticas e das células semelhante ao retículo estrelado: **% 3 AgNOR**, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	p
Pré-ameloblástica	11	6,55	4,68	0,61
Semelhante ao retículo estrelado	11	5,91	4,93	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia - UFRGS

Tabela 6. Distribuição das médias e desvios-padrão da porcentagem de quatro AgNORs por núcleo das células pré-ameloblásticas e das células semelhante ao retículo estrelado: **% 4 AgNOR**, Porto Alegre, 2005.

Tipo de Célula	n	Média	Desvio-padrão	p
Pré-ameloblástica	11	1,27	1,62	0,30
Semelhante ao retículo estrelado	11	0,82	1,08	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia - UFRGS

ANÁLISE DESCRITIVA DA EXPRESSÃO DO EGFR

A marcação da expressão do EGFR nas ilhas epiteliais do ameloblastoma não se mostrou uniforme, sendo possível identificar ilhas marcadas e ilhas sem marcação, em todas as lâminas analisadas. A localização da marcação também foi variável nas diferentes ilhas epiteliais. Observaram-se ilhas com marcação de membrana (Figura 2), de citoplasma (Figura 3) e de membrana e citoplasma (Figura 4). A marcação predominante foi a de citoplasma. Poucas ilhas apresentaram a marcação da expressão de membrana e essas geralmente eram as de menor tamanho. A maioria das ilhas não apresentou variação na marcação da expressão do EGFR nos diferentes tipos celulares analisados, no entanto no interior de algumas ilhas foi observada uma variação na marcação da expressão do receptor (EGFR), independentemente do tipo celular. Uma diferença na intensidade da marcação foi verificada não somente nas diferentes lâminas, mas nas diferentes ilhas dentro de uma mesma lâmina.

Quando presente, a mucosa bucal apresentou uma marcação de membrana e citoplasma, principalmente nas células epiteliais das camadas proliferativas (basal e

parabasal), e essa marcação diminuía à medida que se afastava dessas camadas e se aproximava das camadas intermediária e superficial.

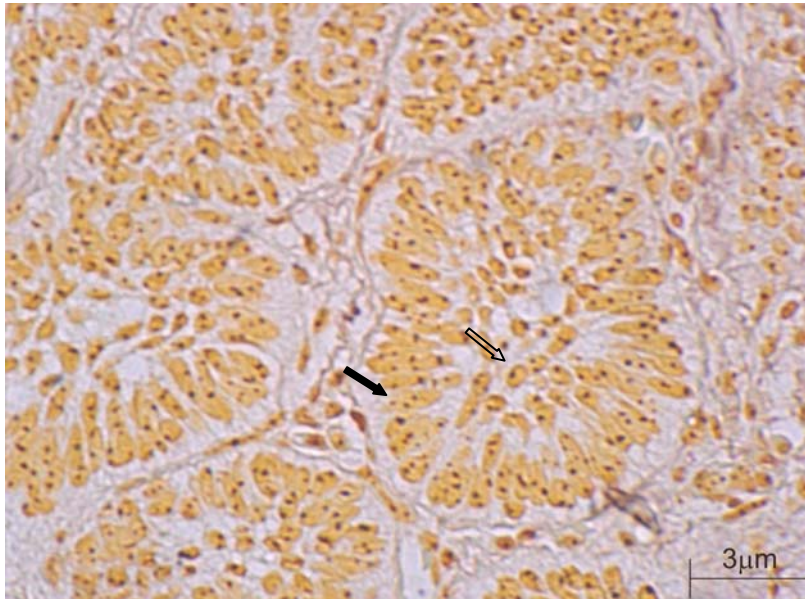


Figura 1: Fotomicrografia de ilhas foliculares de ameloblastoma, impregnadas pela prata, para observação das AgNORs. Observa-se célula semelhante ao pré-ameloblasto com 3 AgNORs (seta cheia) e célula semelhante ao retículo estrelado com 1 AgNOR (seta vazada). Técnica de impregnação pela prata – Aumento original 400x.

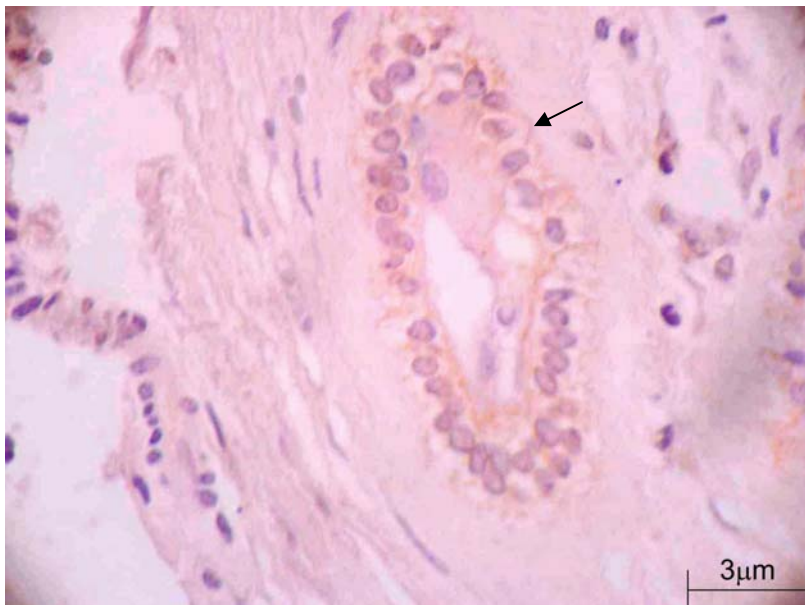


Figura 2: Fotomicrografia de uma ilha de menor tamanho com células semelhantes aos pré-ameloblastos com marcação da expressão de membrana do anticorpo anti-EGFR (→) – Aumento original 400x.

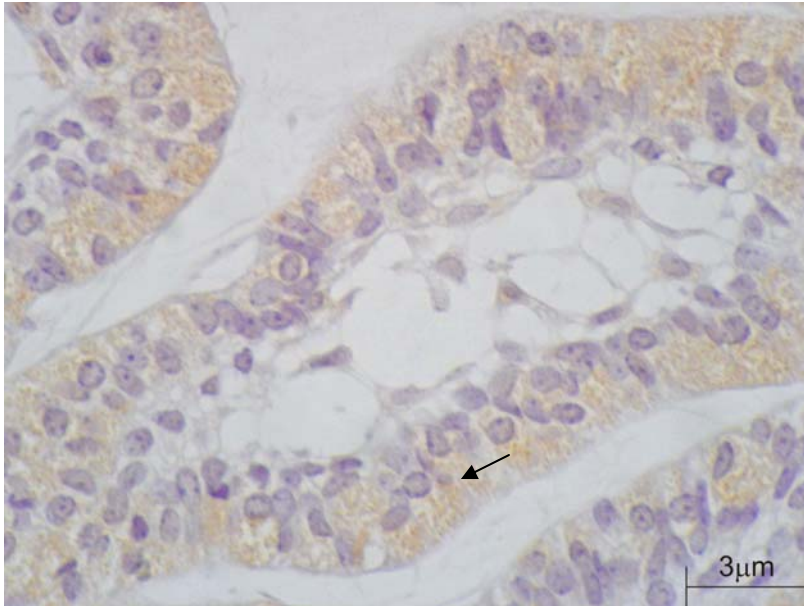


Figura 3: Fotomicrografia de uma ilha com células semelhantes aos pré-ameloblastos com marcação da expressão de citoplasma do anticorpo anti-EGFR (→) – Aumento original 400x.

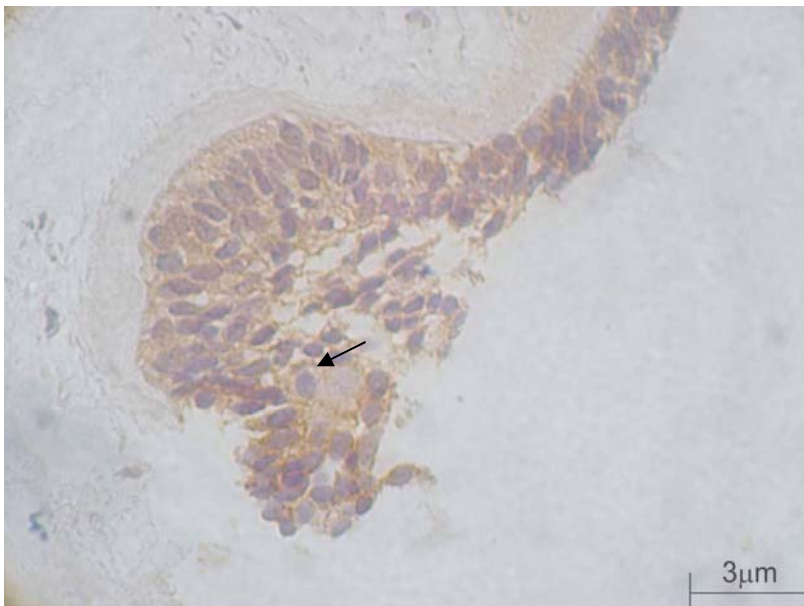


Figura 4: Fotomicrografia de células epiteliais com marcação da expressão de membrana e citoplasma do anticorpo anti-EGFR (→) – Aumento original 400x.

DISCUSSÃO

Foram avaliadas as células tumorais separadamente, para distinguir a atividade proliferativa nos diferentes tipos celulares, visto que Sandra et al. (8) e Ong'uti et al. (14) encontraram um predomínio de células semelhantes aos pré-ameloblastos marcadas pelo Ki-67 e PCNA e Ki-67 respectivamente, comparada à escassa marcação observada nas células semelhantes ao retículo estrelado, e Piattelli et al. (7) avaliando a expressão da PCNA em ameloblastoma, observaram um padrão variável de predomínio de marcação, dependendo do tipo histológico avaliado.

Os resultados da média de pontos de AgNORs por núcleo em ambos os tipos celulares avaliados foi compatível aos valores encontrados em lesões benignas, ou seja, média inferior a 3 pontos de AgNORs por núcleo (19, 20), confirmando os achados de Rosa, Jaeger e Jaeger (2) e Eslamini et al. (13). Esse valor encontrado é compatível com o crescimento lento do ameloblastoma e nos permite interpretar que o aumento de atividade proliferativa das células tumorais pode não ser o único responsável pelo comportamento infiltrativo da lesão, conforme sugeriu estudo de Do Carmo e Silva (12).

Foram analisadas também a média da área de AgNORs por núcleo e o percentual de núcleos com 1, 2, 3 e 4 ou mais AgNORs. Com relação à área, o resultado encontrado foi de média superior para as células semelhantes aos pré-ameloblastos, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Esse resultado difere de Rosa, Jaeger e Jaeger (2) que em estudo avaliando as AgNORs em ameloblastoma e carcinoma de células basais mostraram uma média de área superior para o ameloblastoma, que por sua vez apresentou média de contagem dos pontos de AgNORs inferior ao carcinoma de células basais, mas confirma estudo de Pinheiro et al. (6) que, em ameloblastomas, encontrou uma média de área superior em células com uma média do número de pontos de AgNORs maiores. Esses achados divergentes podem ser explicados pelo uso de programas ou equipamentos diferentes, que podem influenciar na acurácia da mensuração da área dos pontos.

Quanto ao percentual de AgNORs por núcleo a maioria das células apresentaram 1 AgNOR por núcleo, indicando uma proliferação em velocidade semelhante ao ritmo fisiológico, conforme estudo de Xie et al. (35), que encontraram 70% dos núcleos de células epiteliais normais com 1 ou 2 AgNORs. No entanto, as células que apresentaram o maior percentual de núcleos com uma única AgNOR foram as células semelhantes ao retículo estrelado, as mesmas que apresentaram uma média de pontos e área de AgNORs inferior as células semelhantes aos pré-ameloblastos, e apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, pode-se sugerir que essas células estão em uma velocidade proliferativa mais lenta que as células semelhantes aos pré-ameloblastos.

Os baixos percentuais encontrados de núcleos com 3 e com 4 ou mais AgNORs, indicam a baixa velocidade proliferativa do tumor. Rosa, Jaeger e Jaeger (2), analisando a distribuição dos pontos de AgNORs em ameloblastomas, observaram que 90% dos núcleos apresentavam 1 ou 2 pontos de AgNORs, já a distribuição em carcinoma de células basais mostrou que 70% das células apresentavam 2 ou 3 pontos de AgNORs (2), reafirmando uma velocidade proliferativa maior em neoplasias malignas quando comparada com neoplasias benignas, já que esse método reflete a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular.

Em análise dos resultados obtidos nesse estudo pela média da contagem dos pontos, mensuração da área e percentual de 1, 2, 3 e 4 ou mais AgNORs por núcleo, pôde-se perceber que esses diferentes métodos de quantificação confirmam os achados de Pinheiro et al. (6), assim como apresentam relação entre si. Sugerindo que, não é necessária a realização de mais de um método de quantificação de AgNORs em ameloblastoma, visto que todos os métodos mostraram de forma semelhante a atividade proliferativa do tumor. No entanto, sugere-se a realização do percentual de AgNORs por núcleo, uma vez que esse método reflete a porção exata de células que estão com uma velocidade de proliferação maior que o fisiológico.

Com relação aos resultados obtidos pela análise da expressão do EGFR, todas as 11 amostras de ameloblastoma, independente da classificação histológica, obtiveram

marcação positiva. Na literatura, há poucos estudos que avaliaram a expressão do EGFR em ameloblastoma (10, 15, 32, 33), e eles apresentaram resultados contraditórios, variando desde uma presença de todas as células marcadas (10) até a uma ausência total de marcação (33). Esses resultados divergentes podem ser explicados pelos diferentes critérios de positividade utilizados, como somente membrana (32), membrana e/ou citoplasma (15) e membrana ou membrana e citoplasma associados à intensidade de marcação (10, 33), assim como pelos diferentes tipos de clones de anticorpos utilizados, os quais podem ligar-se a diferentes domínios dos receptores, influenciando na localização da marcação.

Li, Browne e Mathews (33), em estudo da expressão do EGFR em 6 casos de ameloblastomas, utilizaram 3 tipos de clones de anticorpos (E30, C11 e F4). Os cortes marcados com E30 apresentaram uma forte expressão na membrana celular, (e) quando marcados com C11 e F4 a expressão foi em membrana e citoplasma, comprovando a alteração na localização da expressão de acordo com o anticorpo. Dessa forma, ratifica-se a necessidade de os estudos apresentarem uma minuciosa descrição dos anticorpos utilizados, dos sistemas de detecção empregados e do critério para consideração de marcação e sua interpretação possibilitando uma avaliação consistente e comparação de resultados, como sugerido por Ciardiello e Tortora (25).

Apesar de a marcação positiva estar presente em todas as lâminas, ela não foi uniforme, pôde-se perceber ilhas com e sem marcação. Esses achados também foram encontrados por Ueno et al. (15) que encontrou 88% de ilhas marcadas. Isso pode ser explicado pela falta de homogeneidade na fixação, ou por ter ilhas com células que realmente não estejam expressando o receptor visto que, nesse estudo foi observado que uma mesma ilha apresentou metade com presença e a outra metade com ausência de marcação. Esse tipo de expressão pode estar envolvido com o crescimento não uniforme da lesão, e dessa forma justificar a infiltração irregular do tumor.

Foi possível identificar a marcação de EGFR em membrana, no citoplasma e em membrana e citoplasma, sendo a mais freqüente a de citoplasma, predominando em 7 dos 11 casos. Essa marcação sugere a internalização do receptor (37, 38) e, portanto imagina-

se que essas células respondam de forma mais lenta frente ao estímulo (36), o que refletiria na atividade proliferativa da lesão.

Raras foram as ilhas com marcação somente de membrana e, geralmente essas ilhas eram as de menor tamanho dentro das existentes em cada lâmina analisada. Esse tipo de marcação é a freqüentemente encontrada em células com alta atividade proliferativa, como em carcinomas (39) e, portanto sugere-se que essas ilhas estejam respondendo mais rapidamente frente ao estímulo proliferativo. Por outro lado, as ilhas de maior tamanho podem já estar em um estágio mais “maduro”, sugerindo um estágio menos proliferativo, com uma resposta mais lenta a estímulos. Essa capacidade mitótica diminuída está de acordo com as células benignas, que apresentam um limite proliferativo, ao contrário das células malignas que apresentam imortalidade e conseqüentemente capacidade proliferativa ilimitada (40).

Estudos anteriores mostraram um maior índice de recidiva (1, 5), assim como uma maior atividade proliferativa do tipo histológico folicular (14, 41). A partir dos resultados desse estudo sugere-se que a maior atividade proliferativa do tipo folicular pode estar relacionada a sua constituição, que na maioria das vezes é predominantemente formado por ilhas menores do que aquelas apresentadas pelos tipos plexiformes, e não associada ao tipo histológico.

Na maioria dos casos, não houve diferença no padrão de marcação do EGFR nos diferentes tipos celulares, no entanto foi observado que no interior de algumas ilhas houve uma variação na expressão da localização do receptor independente do tipo celular, indicando que as células, mesmo dentro de uma mesma ilha, estariam em um padrão de crescimento diferente. Esse resultado discorda de estudo de Li, Browne e Mathews (33), que mostraram que os ameloblastomas foliculares apresentaram intensa marcação nas células periféricas com diminuição para o centro das ilhas tumorais e de Ueno et al. (15), que observaram, em ameloblastomas foliculares, uma marcação geralmente no citoplasma das células semelhantes ao retículo, e raramente nas células semelhantes aos pré-ameloblastos.

Uma marcação citoplasmática nas áreas de metaplasia escamosa foi observada, contrariando Shrestha et al. (32) e confirmando os achados de Ueno et al. (15), que por sua vez, não encontrou relação entre a expressão de EGFR e a proliferação celular, avaliada pela expressão da proteína PCNA, mas sim com a diferenciação celular, já que as áreas marcadas corresponderam principalmente às áreas de metaplasia escamosa. Essa marcação sugere uma possível relação entre a expressão deste receptor com a diferenciação celular.

CONCLUSÕES

A partir desses resultados, concluiu-se que o ameloblastoma apresenta uma atividade proliferativa compatível com lesão benigna, de crescimento lento.

Foi observado um padrão variado da expressão do receptor EGFR nos diferentes grupos celulares, sugerindo um padrão irregular de crescimento tumoral. No entanto, como a maioria dos casos apresentou um predomínio da expressão do EGFR em citoplasma, e essa marcação sugere uma resposta mais lenta frente ao estímulo, isso justificaria o crescimento lento do tumor. Salienta-se que, como a expressão de membrana do EGFR ocorreu nas ilhas de menor tamanho, e esse tipo de expressão é compatível com uma resposta mais rápida ao estímulo proliferativo, sugere-se que essas ilhas são as que apresentam maior velocidade de proliferação, sendo as que contribuiriam para a infiltração do tumor.

Assim, uma análise no predomínio de ilhas menores na lâmina de diagnóstico histopatológico poderia ajudar a definir o comportamento proliferativo de cada lesão. Sugere-se, que seja investigado o prognóstico de ameloblastomas a partir da presença de um predomínio de ilhas menores em relação as maiores.

REFERÊNCIAS

1. UENO S, MUSHIMOTO K, SHIRASU, R. Prognostic evaluation of ameloblastoma based on histologic and radiographic typing. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; **47**: 11-15.
2. ROSA LEB, JAEGER MMM, JAEGER RG. Morphometric Study of Nucleolar Organiser Regions in Ameloblastoma and Basal Cell Carcinoma. *Oral Oncol* 1997; **33**: 209-214.
3. KRAMER IRH, PINDBORG JJ, SHEAR M. Neoplasms and Other Tumours Related to the Odontogenic Apparatus. In:_____. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Odontogenic Tumours. Berlin: Heidelberg, Spring-Verlag,1992: 11-14.
4. REGEZI JA, SCIUBBA JJ. Patologia Bucal Correlações Clinicopatológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000: 292-302.
5. REICHART PA, PHILIPSEN HP, SONNER S. Ameloblastoma: Biological Profile of 3677 Cases. *Oral Oncol* 1995 **31B**: 86-99.
6. PINHEIRO JJV, FREITAS VM, MORETTI AIS, JORGE AG, JAEGER RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathol* 2004; **45**: 65-72.
7. PIATTELI A, FIORONI M, SANTINELLI A, RUBINI C. Expression of Proliferation Cell Nuclear Antigen in Ameloblastoma and Odontogenic Cysts. *Oral Oncol* 1998; **34**: 408-412.
8. SANDRA F, MITSUYASU T, NAKAMURA N, SHIRATSUCHI Y, OHISHI M. Immunohistochemical Evaluation of PCNA and ki-67 in Ameloblastoma. *Oral Oncol* 2001; **37**: 193-198.
9. MEER S, GALPIN JS, ALTINI M, COLEMAN H, ALI H. Proliferating Cell Nuclear Antigen and Ki-67 Immunoreactivity in Ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **95**: 213-221.
10. VERED M, SHOHAT I, BUCHNER A. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Ameloblastoma. *Oral Oncol* 2003; **39**: 138-143.
11. COLEMAN HG, ALTINI M, GROENEVELD HT. Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Odontogenic Cysts and Ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**: 436-440.
12. DO CARMO MAV, SILVA EC. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Ameloblastomas and Adenomatoid Odontogenic Tumours. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**: 153-156.
13. ESLAMINI B, YAGHMAEI M, FIROOZI M, SAFFAR AS. Nucleolar Organizer Regions in Selected Odontogenic Lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **95**: 187-192.

14. ONG'UTI MN, CRUCHLEY AT, HOWELLS GL, WILLIAMS DM. Ki-67 Antigen in Ameloblastoma: Correlation with Clinical and Histological Parameters in 54 Cases from Kenya. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; **26**: 376-379.
15. UENO S, MIYAGAWA T, KAJI R, MUSHIMOTO K, SHIRASU R. Immunohistochemical Investigation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Ameloblastomas. *J Pathol* 1994; **173**: 33-38.
16. TEIXEIRA G, ANTONANGELO L, KOWALSKI L, SALDIVA P, FERRAZ A, SILVA FILHO G. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions Staining is Useful in Predicting Recurrence-Free Interval in Oral Tongue and Floor of Mouth Squamous Cell Carcinoma. *Am J Surg* 1996; **172**: 684-688.
17. MELLO ES, ALVES VAF. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, VAF; BACCHI, CE; VASSALO J Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999;182-194.
18. SCHLIEPHAKE H. Prognostic Relevance of Molecular Markers of Oral Cancer – A Review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; **32**: 233-245.
19. CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How Should we Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. *J Pathol* 1989; **158**: 185-188.
20. DERENZINI M. The AgNORs. *Micron* 2000; **31**: 117-120.
21. CARPENTER G. Receptors for Epidermal Growth Factor and Other Polypeptide Mitogens. *Ann Rev Biochem* 1987; **56**: 881-914.
22. WOODBURN JR. The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Inhibition in Cancer Therapy. *Pharmacol Ther* 1999; **82**: 241-250.
23. BASELGA J. The EGFR as a Target for Anticancer Therapy- Focus on Cetuximab. *Eur J Cancer* 2001; **37**: suppl. (4): 16-22.
24. BASELGA J. Why the Epidermal growth Factor Receptor? The rationale for Cancer Therapy. *Oncologist* 2002; **7**:suppl (4): 2-8.
25. CIARDIELLO F, TORTORA G. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as a Target in cancer Therapy: Understanding the Role of Receptor Expression and Other Molecular Determinants that Could Influence the Response to Anti-EGFR Drugs. *Eur J Cancer* 2003; **39**:1348-1354.
26. HERBST RS. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: suppl (2): 21-26.
27. CARPENTER G, COHEN S. Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7709-7712.
28. BOULOUGOURIS P, ELDER JB. Epidermal Growth Factor Receptor and Transformation. *Surg Today* 2002; **32**: 667-671.

29. JORISSEN RN, WALKER F, POULIOT N, GARRETT TPJ, WARD CW, BURGESS AW. Epidermal Growth Factor Receptor: Mechanisms of Activation and Signalling. *Exp Cell Res* 2003; **284**: 31-53.
30. CARPENTER G, COHEN S. Epidermal Growth Factor. *Ann Rev Biochem* 1979; **26**: 193-216.
31. BOONSTRA J, RIJKEN P, HUMBEL B, CREMERS F, VERKLEIJ A, HENEGOUWEN P. The Epidermal Growth Factor. *Cell Biol Int* 1995; **19**: 413-430.
32. SHRESTHA P, YAMADA K, HIGASHIYAMA H, TAKAGI H, MORI M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors *J Oral Pathol Med* 1992; **21**: 314-317.
33. LI T, BROWNE RM, MATTHEWS JB. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors by Odontogenic Jaw Cysts. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993; **423**: 137-144.
34. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON S, ADNET JJ. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organiser Region at the Optical Level. *Histochem J* 1986; **18**: 5-14.
35. XIE X, CLAUSEN OPF, SUDBÖ J, BOYSEN M. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia, and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer* 1997; **79**: 2200-2208.
36. DAMJANOV I, MILDNER B, KNOWLES BB. Immunohistochemical Localization of the Epidermal Growth Factor Receptor in Normal Human Tissues. *Lab Invest* 1986; **55**: 588-592.
37. HOPKINS, CR. Internalization of Polypeptide Growth Factor Receptors and the Regulation of Transcription. *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 151-154.
38. WILEY, HS. Trafficking of the ErbB Receptors and Its Influence on Signaling, *Exp Cell Res* 2003; **284**: 78-88.
39. PARTRIDGE M, GULLICK WJ, LANGDON JD, SHERRIFF M. Expression of Epidermal Growth factor Receptor on Oral Squamous Cell Carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; **26**: 381-389.
40. COOPER, GM. The cell. In: _____. The Cell a Molecular Approach. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=Growth+of+animal+cell+in+culture+AND+cooper%5Bbook%5D+AND+165073%5Buid%5D&rid=cooper.section.128#148>. Acesso em: 1º de fev. 2003.
41. FUNAOKA K, ARISUE M, KOBAYASHI I, IIZUKA T, KOHGO T, AMEMIYA A, TOTSUKA Y. Immunohistochemical Detection of Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) in 23 Cases of Ameloblastoma. *Oral Oncol* 1996; **32**: 328-332.

ANEXO