

EDITE MARIANA ALVES TORGO DINIZ RAMOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE REGULADORES ÓSSEOS
(RANKL) EM NEOPLASIAS ODONTOGÉNICAS CANINAS:
ESTUDO PILOTO**

Orientadores:

Prof. Doutor Daniel Murta

Prof. Doutor João Filipe Requicha

Prof.^a Doutora Inês Veiga

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

EDITE MARIANA ALVES TORGO DINIZ RAMOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE REGULADORES ÓSSEOS (RANKL)
EM NEOPLASIAS ODONTOGÉNICAS CANINAS: ESTUDO PILOTO**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 9 de maio de 2019, com o Despacho Reitoral nº 116/2019 de 23 de abril de 2019 com a seguinte composição:

Presidente: Prof^ª. Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor Pedro Faísca

Orientador: Prof. Doutor Daniel Murta

Vogal: Prof^ª. Doutora Margarida Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2019

Agradecimentos

À faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pela possibilidade da realização desta Dissertação de Mestrado, com um agradecimento inesquecível ao corpo docente em geral.

Ao professor Doutor João Requicha, o meu muito obrigado pela orientação, (enorme) paciência e apoio durante o curso.

Ao professor Doutor Daniel Murta, um grande agradecimento pela disponibilidade imediata e indispensável quanto à orientação desta dissertação.

Um agradecimento à professora Doutora Inês Veiga, pela oportunidade que me proporcionou de estagiar na Universidade de Berna, pelo conhecimento, aprendizagem, apoio e amizade.

A todos os residentes da Universidade de Berna, pelo acolhimento, pela ajuda prestada e pelos conhecimentos transmitidos.

À professora Doutora Monika Welle e ao professor Doutor Pedro Faísca, por terem cedido as amostras para este estudo.

À minha família um agradecimento, aos meus pais e sobrinho, que desde sempre me apoiaram incondicionalmente, não seria possível hoje ser quem sou. A eles o meu muito obrigado, por tornarem este sonho possível.

Às minhas colegas e amigas, pelo vosso apoio e amizade nos bons e maus momentos, Catarina Santana, Carolina Soares, Joana Trincheiras, Natasha Gonçalves, Maria Fuertes e Andreia Ferreira.

Aos meus três pilares, Patrícia Costa, Joana Correia e João Correia. Não há palavras suficientes para vos agradecer.

To Tizian, you appeared in my life in my last year of university and were always there to motivate me and encourage me to do the best I can. You always found a way to motivate me and you celebrated the most when I passed all those classes. Thank you for your patience and my stress-free place. I can't thank you enough for your presence in my life. I owe you a lot of my work and specially strength to follow one of my dreams.

RESUMO

As neoplasias odontogénicas têm origem nos tecidos embrionários associados à formação do dente e do periodonto. O ameloblastoma acantomatoso canino (AAC) e o fibroma odontogénico periférico (FOP) são as duas neoplasias odontogénicas mais comuns da cavidade oral do cão. Ambos têm um carácter biológico benigno e não metastizam. Contudo, o AAC é localmente agressivo, podendo causar lise do osso adjacente.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão do RANKL através da técnica de imunohistoquímica (IHC), um regulador de reabsorção óssea, nestes dois tipos de tumores. As amostras examinadas incluíram 40 FOPs e sete AACs provenientes de diferentes cães. Verificou-se uma possível expressão RANKL positiva em todos os AACs estudados. Somente 27% dos FOP demonstraram marcação.

Estes resultados demonstram a importância da expressão do RANKL no AAC, dado que todas as amostras se terem revelado positivas como esperado. No FOP foram obtidos resultados positivos, contudo, estes não poderão ser considerados, uma vez que se detetaram problemas na avaliação destas lâminas e que inviabilizam a obtenção de possíveis conclusões.

Consideramos que os problemas detetados na realização do ensaio poderiam ter sido corrigidos através da alteração e otimização da técnica de IHC realizada, deixando-se, no entanto, identificados os pontos a alterar por forma a permitir que no futuro o conhecimento sobre a expressão de RANKL em tumores odontogénicos caninos possa ser ampliado.

Palavras-chave: neoplasias odontogénicas, reabsorção óssea, cão, cavidade oral.

ABSTRACT

Odontogenic tumors are neoplasms derived from ectodermal or mesenchymal components of the tooth forming apparatus. Canine acanthomatous ameloblastoma (CAA) and peripheral odontogenic fibroma (POF) are the two most representative odontogenic neoplasms that affect the oral cavity of dogs. Both have a benign biological character and don't metastasize. However, CAA is very aggressive locally and lysis of the adjacent bone might occur.

The aim of this study was to characterize the expression of bone resorption regulators (RANKL) using the immunohistochemistry technique of both types of tumors. Samples of 40 POF and seven CAA tissues from canine patients were examined. RANKL expression was positively expressed in all CAA cases. Only 27% of POF cases demonstrated staining.

These results show the importance of the RANKL expression in the CAA due to all the samples having positive results, as expected. Since POF had positive results, these will not be considered significant, because that problems during the observation of the slide were detected and it made it impossible to draw any conclusions.

The problems detected during the experiment could be corrected by changing and optimizing the IHC protocol, however, all points that need adjustments are identified in order to allow the increased knowledge of RANKL in odontogenic tumors in dogs in the future.

Keywords: Odontogenic tumors, bone resorption, dog, oral cavity.

Índice Geral

Agradecimentos	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos	ix
I – DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR	1
Instituto de Patologia da Universidade de Berna	1
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona	2
II – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	4
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Anatomia dentária	4
1.1.1 Nomenclatura dentária	6
1.2 Histologia dentária e periodontal	6
1.2.1 Esmalte	6
1.2.2 Cimento	7
1.2.3 Dentina	7
1.2.4 Polpa dentária	7
1.2.5 Ligamento periodontal	8
1.2.6 Gengiva	8
1.2.7 Osso alveolar	9
1.2.8. Vestígios de Malassez	9
1.3. Odontogénese	10
1.4 Neoplasias odontogénicas	11
1.4.1. Fibroma Odontogénico Periférico	13
1.4.1.1. Apresentação clínica	14
1.4.1.2. Características histológicas	14
1.4.2 Ameloblastoma Acantomatoso Canino	14

1.4.2.1. Apresentação clínica	15
1.4.2.2. Características histológicas	15
1.4.3. Ameloblastoma Central.....	15
1.4.3.1 Apresentação clínica	16
1.4.3.2 Características histológicas	16
1.4.4. Tumor odontogénico produtor de amiloide.....	16
1.4.5. Fibroma ameloblástico	17
1.4.6. Odontoma.....	17
1.4.7. Cementoma	17
1.4.8. Quistos odontogénicos	18
1.5. Reabsorção óssea.....	19
1.5.1. Osteoclastos.....	19
1.5.2. Osteoblastos	19
1.5.3. Imunologia do tecido ósseo.....	19
1.5.3. RANK	20
1.5.4. RANKL	21
1.5.5 Osteoprotegerina	21
2. PROJECTO	23
2.1. Contributo previsto deste trabalho	23
2.2. Objetivos	23
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.3.1. Caracterização da amostra em estudo	23
2.3.2. Critérios de inclusão.....	24
2.3.3. Critérios de exclusão	24
2.3.4. Processamento das amostras	24
2.3.5. Protocolo da técnica imunohistoquímica	24
2.3.6. Observação ao microscópio	25
2.4. RESULTADOS.....	27
2.5. DISCUSSÃO	32
2.5.1. Resultados esperados.....	33
2.5.2. Limitações do estudo.....	35
2.6. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ANEXO I – Protocolo de imunohistoquímica de cortes de parafina.....	I
--	----------

Índice de Figuras

Figura 1. Número de necropsias realizadas no Instituto de Patologia Veterinária da Universidade de Berna, de acordo com a espécie animal.....	2
Figura 2. Representação da dentição permanente em crânio canino.....	5
Figura 3. Sistema de Triadan modificado do cão.....	6
Figura 4. Detecção de RANKL no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	27
Figura 5. Detecção de RANKL no FOP com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	28
Figura 6. Detecção de RANKL no fígado de cão com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	28
Figura 7. Controlo negativo da deteção de marcação no fígado de cão com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	29
Figura 8. Controlo negativo da deteção de marcação no FOP com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	29
Figura 9. Controlo negativo da deteção de marcação no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.....	30
Figura 10. Controlo negativo da deteção de marcação no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 100x.....	30
Figura 11. A-Marcação de RANKL num Ameloblastoma. Marcação no citoplasma e membrana periférica das células colunares. B-Marcação de RANKL num Ameloblastoma. Marcação nas células centrais poliedras.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fórmula dentária do cão.....	6
Tabela 2. Classificação histológica das neoplasias odontogénicas, baseados na classificação de Medicina Humana.....	13

Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

µm:	Micrómetro
%:	Porcentagem
AAC:	Ameloblastoma acantomatoso canino
Ac:	Anticorpo
ADN:	Ácido desoxirribonucleico (do Inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
BSA:	Albumina sérica bovina (do Inglês, <i>Bovine serum albumin</i>)
°C:	Graus celsius
Et. al:	E outros, da locução latina et alli
FOP:	Fibroma odontogénico periférico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogénio
IgG:	Imunoglobulina G
IHC:	Imunohistoquímica
IHC-P:	Imunohistoquímica em cortes de parafina
Kg:	Quilograma
LPD:	Ligamento periodontal
M:	Concentração molar
Mm:	Milímetro
M-CSF:	Fator estimulante de colónias de macrófagos (do Inglês, <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
mL:	Mililitro

Na ⁺	Ião de sódio
Nº	Número
NF-κB:	Fator nuclear kappa B (do Inglês, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
OPG:	Osteoprotegerina
PBS:	Tampão fosfato (do Inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RANK:	Recetor do ativador do fator nuclear kappa-B (do Inglês, <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL:	Ligante recetor do ativador do fator nuclear kappa-B (do Inglês, <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
TNF:	Fator de necrose tumoral (do Inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFRSF:	Superfamília dos recetores do fator de necrose tumoral (do Inglês, <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>)
W:	Watts

I – DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, teve lugar no Instituto de Patologia da Universidade de Berna, na Suíça, e na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. O primeiro estágio decorreu entre 19 de novembro de 2017 e 3 de fevereiro de 2018, sob a orientação da Doutora Inês Veiga e o segundo entre 1 de maio e 1 de agosto de 2018, sob a orientação do Prof. Doutor Daniel Murta. Estes estágios contribuíram para a consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, particularmente na área da histopatologia.

Instituto de Patologia da Universidade de Berna

O acompanhamento e a participação nas atividades de rotina realizadas pelos residentes em Anatomia Patológica do Instituto de Patologia Veterinária da U. Berna, foram o ponto de partida para a fase inicial do estágio. Semanalmente, um dos residentes era responsável pelas biopsias e outro pela realização das necropsias.

As biopsias eram realizadas de manhã, acondicionadas em frascos adequados e organizadas por números. Cada amostra vinha associada a uma folha de biopsias, na qual o residente ou o estagiário descrevia o que visualizava macroscopicamente, bem como os cortes efetuados e o número de cassetes utilizadas. De seguida, as amostras eram processadas pelos auxiliares de laboratório e, posteriormente, enviadas para o residente para observação microscópica e possível diagnóstico.

As necropsias também eram realizadas durante a manhã. O número de animais era variável, bem como a espécie (Figura 1). As necropsias eram efetuadas na presença do residente, após remoção e abertura de todos os órgãos. O residente observava as alterações e recolhia amostras para histopatologia. Após a recolha, as amostras eram colocadas em formol e cortadas no dia seguinte com o auxílio dos estudantes. A parte da tarde encontrava-se reservada para a elaboração do relatório de necropsia.

As amostras cortadas eram então processadas pelas técnicas de laboratório e enviadas para o residente para observação microscópica e elaboração do respetivo

relatório. Ainda durante o período da tarde, todos os dias eram realizadas palestras sobre diversos temas relevantes na área de Medicina Veterinária.

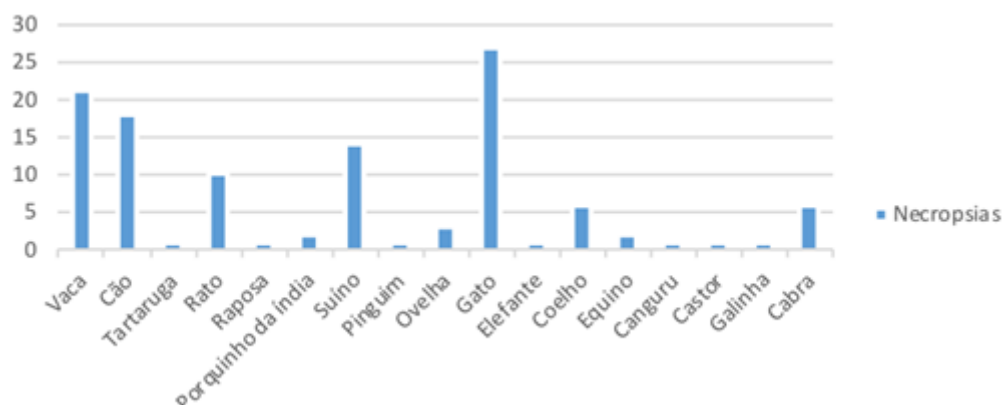


Figura 1. Número de necropsias realizadas no Instituto de Patologia Veterinária da Universidade de Berna, de acordo com a espécie animal.

De entre os 21 casos de grandes ruminantes, observaram-se lesões semelhantes a pneumonia em cinco casos, 5 casos de peritonite traumática e os restantes incluíam arterites, ruminites e outras doenças. Relativamente aos suínos, observou-se a presença de Síndrome hemorrágico intestinal em 90% dos casos.

Nos 17 cães sujeitos a necropsia, registaram-se seis casos de neoplasia, com destaque para o hemangiossarcoma, três casos de parvovirose e ainda casos relacionados com intoxicações e salmonelose.

Nos 27 gatos examinados, detetaram-se oito casos de cardiomiopatia hipertrófica e sete casos de neoplasias, tendo sido o linfoma a mais predominante. Foram também observadas hérnias diafragmáticas e lesões causadas por calicivírus e por coronavírus felinos.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona

No estágio realizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades, tive a oportunidade de aprofundar conhecimentos na técnica de imunohistoquímica e integrar-me na sua rotina laboratorial.

Durante o estágio neste local, realizei dez imunohistoquímicas de lâminas de neoplasias odontogénicas, sendo a sua análise pertinente para a execução deste trabalho.

Em suma, as atividades realizadas durante estes meses focaram-se na aprendizagem da técnica de cortes com micrótomo para histologia, na realização de protocolos de imunohistoquímica, na montagem de lâminas em Etellan® e na análise e descrição das lâminas obtidas.

II – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia dentária

Os dentes são estruturas altamente especializadas usadas para a preensão, corte e mastigação dos alimentos (Evans & de Lahunta, 2013). Os mamíferos apresentam dentes difiodontes, isto é, com duas dentições, de leite ou decídua e adulta ou permanente (Mills, 2013).

Os cães e gatos são considerados heterodontes quanto à estrutura do dente, uma vez que os seus dentes apresentam tamanho e morfologia diferentes e, por conseguinte, possuem funções variadas. Anatomicamente, cada dente pode ser dividido em três partes: a coroa, região exposta do dente acima do colo e revestida por esmalte; o colo, região de transição entre a coroa e raiz e a raiz, região abaixo da gengiva inserida e rodeada e suportada pelo ligamento periodontal e pelo osso alveolar. Os dentes podem ainda ser uni, bi ou trirradiculares, conforme o número de raízes que possuem (Evans & de Lahunta, 2013).

Os dentes do cão são braquiodontes, uma vez que possuem uma coroa curta comparativamente com a raiz e são anelodontes, isto é, cessam o seu crescimento após a concluída a erupção dentária. A erupção da dentição decídua inicia-se por volta do 20.º de vida, surgindo em primeiro lugar os dentes incisivos, de seguida os caninos e, por último, os dentes pré-molares. Entre os 3 e os 6 meses de idade, esta dentição é progressivamente substituída da mesma forma, erupcionando em último lugar os dentes molares, que não existem na dentição decídua (Getty *et al.*, 1986). Anatomicamente, os dentes definitivos são mais largos e robustos que os dentes decíduos, permanecendo para o resto da vida do animal (Evans & de Lahunta, 2013).

Os dentes incisivos (I) são pequenos e encontram-se inseridos na região rostral da maxila e no osso incisivo. Na arcada maxilar, os incisivos são trilobados, enquanto que na arcada mandibular são bilobados. Os dentes incisivos maxilares encontram-se ligeiramente mais rostrais comparativamente aos mandibulares. As coroas são trilobadas,

sendo a sua face labial convexa e a face lingual ligeiramente côncava. Os dentes da arcada mandibular são ligeiramente mais pequenos que os da arcada maxilar (Leon-Roman & Gioso, 2004). A função deste tipo de dentes é a prensão de alimentos (Evans & de Lahunta, 2013).

Os dentes caninos (C) são longos e curvos, sendo que os caninos maxilares estão separados dos incisivos por um espaço, no qual ocluem os mandibulares (Leon-Roman & Gioso, 2004). Este tipo de dente tem como principal função o corte do alimento (Evans & de Lahunta, 2013).

Os dentes pré-molares (PM) e molares (M) do cão possuem uma forma irregular. O pré-molares têm capacidade de corte pelas suas cúspides alinhadas uma atrás da outra, designando-se por secodontes. Encontram-se comprimidos lateralmente e separados por pequenos intervalos entre si (Leon-Roman & Gioso, 2004). Os molares mais caudais têm como função principal esmagar o alimento e diferenciam-se dos dentes pré-molares através das cúspides arredondadas e pouco desenvolvidas, designando-se assim por bunodontes (Dyce *et al.*, 2002).

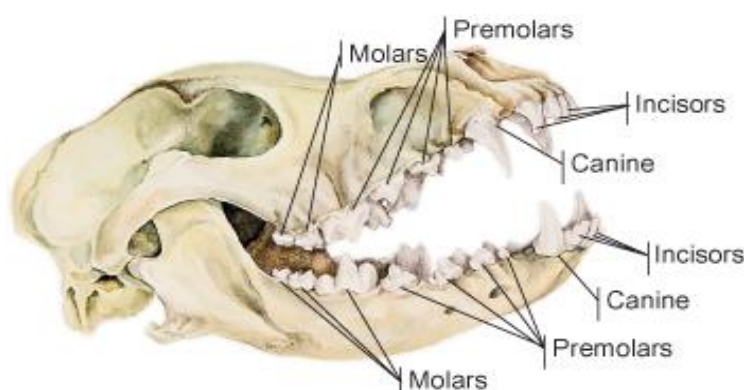


Figura 2 – Representação da dentição permanente em crânio canino (adaptado de Brenda Gregory).

Na Tabela 1, está descrita a fórmula dentária do cão, isto é, o número e tipo de dentes observáveis em cada uma das duas dentições (Evans & Lahunta, 2013).

Tabela 1 – Fórmula dentária do cão (adaptado de Evans & de Lahunta, 2013).

Dentição decídua	Dentição permanente
2x (I3/I3, C1/1, PM3/PM3) = 28 dentes	2x (I3/3, C1/1C, PM 4/4, M2/3) = 42 dentes

1.1.1 Nomenclatura dentária

Em Medicina Veterinária, o sistema de nomenclatura dentária mais utilizado é o Sistema de Triadan modificado. Neste sistema, cada dente é identificado por três algarismos. O primeiro algarismo indica o tipo dente (decíduo ou permanente) e o quadrante correspondente: “1” corresponde à maxila direita, o “2” à maxila esquerda, o “3” à mandíbula esquerda e o “4” à mandíbula direita. Na dentição decídua, os quadrantes são classificados pela mesma ordem, mas com os algarismos “5” a “8” (Evans & de Lahunta, 2013). O segundo e terceiro algarismos identificam a localização do dente no quadrante, começando na linha média interincisiva avançando, distalmente, até ao último dente do mesmo quadrante (Figura 3).

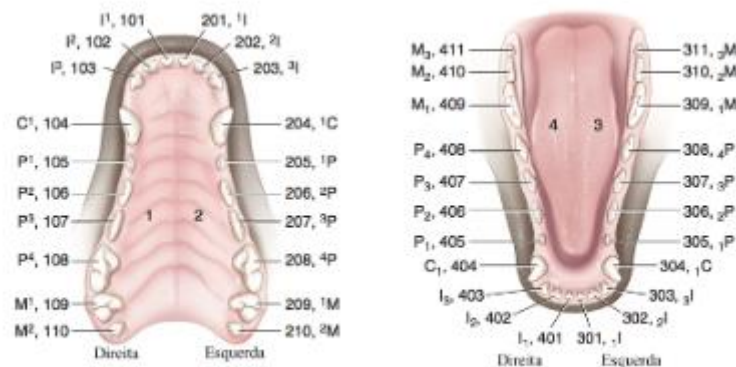


Figura 3 – Sistema de Triadan modificado do cão (Evans & de Lahunta, 2013).

1.2 Histologia dentária e periodontal

1.2.1 Esmalte

O esmalte é um dos componentes mais duros e mais mineralizado do organismo, devido à sua composição em 95% de sais de cálcio, 0,5% de matéria orgânica e o restante em água. Este é produzido por células de origem ectodérmica (Junqueira *et al*, 1995). A matriz orgânica do esmalte é composta por proteínas, amelogeninas e enamelinas, as quais têm como função organizar os componentes minerais do esmalte (Junqueira *et al*, 1995).

Este tecido não apresenta sensibilidade e é incapaz de se regenerar. Nos carnívoros é ligeiramente fino, devido ao tipo de alimentação menos abrasiva e ao fato de mastigarem pouco (Leon-Roman & Gioso, 2004).

1.2.2 Cimento

O cimento é o menos duro dos tecidos mineralizados do dente e assemelha-se histologicamente ao osso (Junqueira *et. al*, 1995). É um tecido avascular, não innervado e composto por, aproximadamente, 45-50% de matéria inorgânica. O composto inorgânico mais abundante é a hidroxiapatita e a componente orgânica inclui, principalmente, colagénio tipo I (90%) e tipo III (5%). Histologicamente, encontra-se diferenciado em acélular primário e acélular secundário. O cimento primário é mais mineralizado e tem um papel fundamental na fixação do dente, sendo o cimento secundário responsável pela capacidade de adaptação na movimentação dos dentes e reparação do tecido periodontal (Niemec, 2013).

1.2.3 Dentina

A dentina constitui uma grande proporção do volume duro do dente, encontra-se sob o esmalte na porção coronal e sob o cimento na porção radiculada. Esta é formada por 18% de material orgânico, 70% de material inorgânico e 12% de água (Gorrel, 2008). A componente orgânica inclui fibras de colagénio, fosfoproteínas, proteoglicanos, glicoproteínas ácidas, fatores de crescimento e diferenciação, lípidos e glicosaminoglicanos. A inorgânica, por sua vez, é composta maioritariamente por cristais de hidroxiapatita (Leon-Roman & Gioso, 2004).

Ao contrário do osso, a dentina mantém-se mineralizada mesmo após a destruição dos odontoblastos (Junqueira *et al*. 1995). Existem três tipos de dentina: a primária que se deposita durante a erupção dentária; a secundária, adicionada através dos odontoblastos ao longo da vida, e a terciária que é formada em resposta a lesões de desgaste ou traumatismo lento sobre polpa dentária (Tutt, 2008).

1.2.4 Polpa dentária

No interior de cada peça dentária, existe uma cavidade designada cavidade pulpar, na qual se encontra alojada a polpa dentária. Esta cavidade, também designado por sistema endodôntico, é constituída pela câmara pulpar, na porção coronária do dente; pelo canal pulpar, na sua porção radicular e pelos cornos pulpares, projetados dorsalmente ao nível das cúspides da coroa. No final deste canal, localiza-se o delta apical por onde penetram os nervos e os vasos sanguíneos (Leon-Roman & Gioso, 2004).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo ricamente innervado e vascularizado. Os seus componentes celulares principais são células mesenquimatosas, nomeadamente odontoblastos e fibroblastos, que estão envolvidas numa matriz rica em fibras de colagénio e glicosaminoglicanos. Estas fibras são sensíveis a dor, sendo desta forma as únicas recetoras de dor reconhecidas pelo dente (Junqueira *et al.*, 1995).

1.2.5 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal (LPD) é um tecido conjuntivo fibroso composto por fibras de colagénio que penetram no cimento do dente e que se unem à *lâmina dura* do osso alveolar e por células, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Gorrel *et al.*, 2013). O LPD, juntamente com o cimento, a gengiva e o osso alveolar compõem o órgão que rodeia e suporta o dente, denominado por periodonto (Niemiec, 2013).

As suas fibras estão organizadas de modo a suportar as pressões exercidas durante a mastigação, evitando assim a transmissão de pressão diretamente sobre o osso, o que poderia conduzir a um processo de reabsorção óssea localizada (Junqueira, Carneiro & Kelly, 1995). As fibras de colagénio principais denominam-se por fibras de Sharpey, sendo constituídas, maioritariamente, por colagénio tipo I e estendem-se desde o osso alveolar até ao cimento (Holmstrom *et al.*, 2005; Niemiec, 2013). Os constituintes celulares do LPD são as células epiteliais de Malassez, fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, células do sistema imunitário (Niemiec, 2013) e células mesenquimatosas indiferenciadas, as células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) (Wang *et al.*, 2012).

O LPD tem a função de absorver os impactos mecânicos sobre o dente quando os animais se alimentam, de modo a não permitir a sua avulsão do osso alveolar nem traumatismos dentoalveolares (Soukup & Snyder, 2014).

1.2.6 Gengiva

A gengiva é um dos tecidos moles do periodonto e é composta por um epitélio estratificado queratinizado (Leon-Roman & Gioso, 2004). Esta divide-se em dois tipos: gengiva aderida e gengiva livre. O tecido da gengiva aderida protege o osso e o dente de infeções, traumatismos e da doença periodontal. No espaço entre a gengiva livre e o dente, encontra-se o sulco gengival, cuja profundidade normal no cão é de até 3 mm (Mills, 2013).

1.2.7 Osso alveolar

O osso alveolar é composto por 67% de matéria inorgânica, maioritariamente hidroxiapatita, e 33% de matéria orgânica, principalmente colagénio tipo I (Niemec, 2013). O osso alveolar consiste em quatro camadas: o perióstio, o osso compacto e o osso esponjoso, encontradas em todos os ossos, e uma quarta camada designada de lâmina crivosa (Gorrel, 2008). A lâmina crivosa, também conhecida como lâmina dura, é perfurada por diversas aberturas de tamanho pequeno que permitem aos vasos sanguíneos e às fibras nervosas do interior do osso comunicar com as restantes estruturas do LPD. (Doni & Bird, 2012)

Os vasos sanguíneos e os nervos, atravessam o osso alveolar através do delta apical da raiz, de modo a entrar na polpa dentária (Junqueira *et.al*, 1995). O osso alveolar encontra-se em constante remodelação através da ação dos osteoclastos e dos osteoblastos (Mills, 2013).

1.2.8. Vestígios de Malassez

Os vestígios de Malassez podem ser identificados histologicamente com relativa facilidade, pois apresentam-se como pequenos grupos de células epiteliais dentro do LPD. O investigador Louis-Charles Malassez, em 1885, descreveu estas células e a sua distribuição, através de cortes transversais e longitudinais do dente humano, concluindo que os vestígios formavam uma rede em redor da raiz dentária (Ge *et al.* 2012).

Durante muito tempo, acreditou-se que os vestígios de Malassez eram células latentes ou quiescentes, uma estrutura sem função e frequentemente associada à formação de quistos e neoplasias. Esse componente periodontal epitelial é, pelo contrário, ativo e produz mediadores com importantes funções na manutenção da função periodontal e radicular, inclusivamente, durante o movimento ortodôntico (McGavin & Zachary, 2009).

A envolvimento dos vestígios de Malassez na formação de quistos odontogénicos ou de neoplasias odontogénicas é amplamente conhecido também em Medicina Veterinária (Ge *et al.*, 2012).

1.3. Odontogénese

A odontogénese é definida como o processo embrionário da formação do dente. Os primeiros sinais de desenvolvimento dentário surgem por volta do 25.º dia de gestação, com o espessamento do epitélio oral embrionário conhecido como lâmina dentária. A invaginação deste epitélio, por volta do 30.º dia de gestação, resulta na formação da estrutura primordial do dente e, a partir da qual, ocorrem as várias fases da odontogénese.

A primeira fase, denominada por fase de botão, consiste na aglutinação inicial da lâmina dentária nas futuras localizações dos dentes decíduos quer na mandíbula quer na maxila. Segue-se a segunda fase, a fase de capuz, com a formação do órgão do esmalte (composto por dois epitélios, o interno e o externo, e o retículo estrelado) e a papila dentária (precursora da dentina e da polpa dentária), ambos separados pela membrana basal. O órgão do esmalte conferirá a forma da coroa, depositando o esmalte que irá recobrir a mesma e o tecido mesenquimatoso que o rodeia irá dar origem aos tecidos periodontais (gengiva, alvéolos dentários, LPD e cemento). A terceira fase da odontogénese, a fase de campânula, inicia-se com o aparecimento de uma quarta camada no órgão do esmalte denominada estrato intermédio. Durante esta fase, o epitélio interno do órgão do esmalte diferencia-se em pré-ameloblastos que incentivam as células exteriores da papila dentária a diferenciarem-se em odontoblastos. A membrana basal desintegra-se e o contacto com a pré-dentina (dentina não mineralizada e que secreta os odontoblastos) induz os pré-ameloblastos a desenvolverem-se em ameloblastos, iniciando-se assim a produção do esmalte. Os ameloblastos desintegram-se após a erupção dentária, ao contrário dos odontoblastos que irão permanecer ativos na polpa dentária (Reiter *et al*, 2012).

Após a erupção e formação da coroa concluídas, o desenvolvimento e mineralização da raiz dentária ainda não estão completos. A raiz é formada a partir da porção apical do órgão do esmalte, denominada ansa cervical. Esta vai crescendo e vai envolvendo a papila dentária, formando a bainha epitelial de Hertwig. Esta bainha vai definir a morfologia da raiz, bem como iniciar a produção de pré-dentina de forma semelhante à que ocorreu na coroa, com a indução das células da camada exterior da papila dentária a transformarem-se em odontoblastos. Após a formação da dentina da raiz, a bainha de Hertwig e a membrana basal desintegram-se. A raiz continua a desenvolver-se até que o ápice esteja formado. As células indiferenciadas são expostas à dentina da raiz, aquando a desintegração da bainha de Hertwig e da membrana basal, transformando-

se em cementoblastos. Os cementoblastos produzem matriz cementoide e vão dar origem aos cementócitos. O cementoide irá sofrer, posteriormente, um processo de mineralização, dando origem ao cimento na superfície da raiz dentária (Reiter *et al.*, 2012).

Os botões que vão dar origem à dentição decídua vão desenvolver lâminas sucessivas, que após a passagem pelas fases de desenvolvimento, irão dar origem aos dentes definitivos. O crescimento progressivo das raízes estimula a erupção dentária, que ocorre em diferentes períodos de tempo para cada dente (Reiter *et al.*, 2012).

1.4 Neoplasias odontogénicas

A cavidade oral é a quinta localização mais comum para o aparecimento de neoplasias no cão (Smith, 2005). Quanto à sua origem, as neoplasias orais podem classificar-se em não odontogénicas e em odontogénicas. As primeiras surgem a partir das estruturas da cavidade oral, com a exceção dos tecidos dentários. As segundas têm origem nos componentes embrionários do dente e do periodonto. As neoplasias odontogénicas são as neoplasias benignas mais comuns na cavidade oral do cão (Mayer & Anthony, 2007).

Os tumores da cavidade oral são, geralmente, assintomáticos e, em diversas situações quando identificados, já se encontram num estágio avançado. Os sinais clínicos incluem a dificuldade na mastigação, halitose, esfoliação dentária, hemorragia oral persistente ou periódica, sialorreia, assimetria facial e desenvolvimento rápido ou gradual de má-oclusão dentária (Bruijin *et al.*, 2007).

As neoplasias odontogénicas foram descritas, pela primeira vez, há mais de 250 anos. Desde então, a sua nomenclatura e classificação têm evoluído, sendo a classificação de Medicina Humana publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2003, a base da nomenclatura destas doenças em carnívoros de companhia (Tabela 2).

Os tumores odontogénicos são um grupo heterogéneo de lesões de diversos comportamentos clínicos e tipos histológicos, variando desde lesões hamartomatosas a lesões neoplásicas benignas ou malignas (Seyedmajidi *et al.*, 2013). Estes são derivados de tecido ectomesenquimatoso e/ou epitelial e a sua classificação é essencialmente

baseada na interação entre o epitélio odontogénico e os tecidos de origem ectomesenquimatosa (Soluk-Tekkeşin & Wright, 2017).

Tabela 2 - Classificação histológica das neoplasias odontogénicas, baseados na classificação de Medicina Humana (adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2003).

Neoplasias odontogénicas epiteliais sem tecido mesenquimatoso odontogénico	Neoplasias derivadas do tecido do ligamento periodontal
• Ameloblastoma • Neoplasia odontogénica produtor de amilóide • Ameloblastoma acantomatoso canino	• Epúlide fibromatosa de origem do ligamento periodontal
Neoplasias odontogénicas epiteliais com tecido mesenquimatoso odontogénico	Quistos da mandíbula
• Fibroma ameloblástico • Tumor indutivo odontogénico felino • Odontoma complexo • Odontoma composto	• Quisto dentígeros • Quisto radicular • Quisto ovino odontogénico • Teratoma temporal em cavalos
Neoplasias compostas primariamente por ectomesenquimais odontogénicos	Lesões semelhantes a tumores
• Cementoma • Fibroma cementificado	• Displasia odontogénica em roedores • Inflamação das estruturas odontogénicas e tecido periodontal • Granuloma periférico • Hiperplasia gengival

Microscopicamente, podem ser compostas por tecido mole remanescente do esmalte ou polpa dentária, ou podem conter tecido duro proveniente do esmalte, dentina ou até mesmo do cimento (Seyedmajidi *et. al*, 2013). As neoplasias odontogénicas apresentam diversos desafios na obtenção de um diagnóstico definitivo. A sua identificação depende do reconhecimento da diferenciação do tecido dentário no epitélio odontogénico, tecido da dentina, cimento ou tecido do LPD (Meuten, 2017).

O epitélio odontogénico é caracterizado por uma camada periférica em paliçada de células epiteliais, a localização do núcleo no polo apical das células em paliçadas com uma região não-nucleada ao longo da membrana basal, citoplasma claro, longas pontes intercelulares, as células podem apresentar diversos tamanhos e assemelhar-se a

acantócitos ou retículo estrelado. O deslocamento do núcleo nas células epiteliais odontogénicas é causado pela acumulação de tonofilamentos e de grânulos de secreção (Meuten, 2017).

Os elementos decisivos para o diagnóstico definitivo da neoplasia odontogénica são: a quantidade e localização de epitélio odontogénico e a presença ou ausência de ectomesênquima (matriz de dentina, cemento ou esmalte e LPD) (Meuten, 2017). A observação de tecido do LPD é de grande importância em carnívoros domésticos, uma vez que o estroma periodontal prolifera em neoplasias como o ameloblastoma acantomatoso e no fibroma odontogénico periférico (Meuten, 2017).

1.4.1. Fibroma Odontogénico Periférico

O fibroma odontogénico periférico (FOP) era conhecido por epúlida fibromatosa ou por epúlida ossificante. É considerado um tumor controverso, uma vez que não se sabe se as lesões neoplásicas fibromatosas na gengiva dos animais domésticos são equivalentes às descritas nos humanos (Meuten, 2017).

Os principais componentes da epúlida ossificante são os fibroblastos e matriz osteoide, sendo que, na epúlida fibromatosa, os fibroblastos são os únicos componentes da mesma (Reiter *et al.*, 2012). O termo epúlida advém do seu aspeto expansivo ao nível da gengiva (Verstraete, 1992). Este tipo de tumor pode surgir quer na mandíbula quer na maxila, embora os casos diagnosticados na mandíbula sejam mais frequentes (Heithersay *et al.*, 2017).

Em 1985, Barker e Van Dreumel referiram que as epúlides fibromatosas e as ossificantes constituíam variações do mesmo tipo de lesão. Para perceber melhor a epúlida fibromatosa, esta foi comparada ao fibroma periférico odontogénico humano, sendo que foi revelada uma similaridade entre as duas lesões e, deste modo, a epúlida foi reclassificada como Fibroma Periférico Odontogénico (FOP) (Gardner & Baker, 1991).

O FOP é uma das neoplasias odontogénicas mais comuns no cão e no gato, representando 37-67% dos tumores do dento canino (Meuten, 2017). Nos cães, verificou-se maior predisposição em machos castrados, animais de meia idade a geriátricos e nas raças Golden Retriever, Akita, Cocker Spaniels e Pastor de Shetland (Bruijin *et al.*, 2007).

Os principais diagnósticos diferenciais são o odontoma, o tumor odontogénico produtor de amiloide e o ameloblastoma acantomatoso canino, mas também tumores não

odontogénicos como o papiloma, o fibroma, o condroma, o osteoma e o hemangioma (Gardner & Baker, 1991).

1.4.1.1. Apresentação clínica

O FOP aparece com maior frequência na face rostral da maxila e a sua recorrência, após remoção cirúrgica, é rara e não invadem nem metastizam a distância (Verstraete, 1992; Meuten, 2017). Não apresenta sinais de invasão de tecidos adjacentes e, radiograficamente, observam-se diversos graus de mineralização (Bruijin *et. al*, 2007).

Clinicamente, o FOP apresenta-se como uma massa firme que pode ser rosada, encontrar-se inflamada ou até mesmo ulcerada. É difícil distingui-lo macroscopicamente da hiperplasia gengival ou até mesmo de outros tumores orais (Heithersa *et al.*, 2017).

1.4.1.2. Características histológicas

Histologicamente, o FOP apresenta o estroma de ligamento periodontal, epitélio odontogénico com matriz de fibrilhas de colagénio. É possível observar células em forma de estrela e vasos sanguíneos (Verstraete, 1992).

Relativamente ao tecido ósseo, quando presente, possui células ricas em matriz com aparência fibromatosa e, por vezes, áreas com colagénio espesso. Poder-se-ão observar células gigantes do tipo osteoclastos (Verstraete, 1992).

1.4.2 Ameloblastoma Acanomatoso Canino

O ameloblastoma acanomatoso canino (AAC) é a segunda neoplasia odontogénicas mais comum em cães (Goldschmid *et al.*, 2017). Originalmente referido como epúlida acanomatosa, o seu nome foi alterado dado ter origem semelhante ao ameloblastoma acanomaso (sólido/multiquístico) que ocorre em humanos. O comportamento biológico, nos cães, é diferente de nos humanos, uma vez que pode surgir tanto numa localização periapical como intraóssea nos cães, enquanto que nos humanos ocorre apenas a nível intraósseo. Devido a essa importante diferença, convencionou-se denominar por AAC (Bell & Soukup, 2014).

O termo “ameloblastoma” está relacionado com o esmalte produzido por células epiteliais odontogénicas e termo “acanomatoso” refere-se à morfologia espinhosa das células que o compõem (Das *et al.*, 2013). O ameloblastoma acanomatoso surge dos vestígios de Malassez ou do epitélio germinativo dentário (McGavin & Zachary, 2009).

Este tumor é mais comum em cães geriátricos e nas raças Golden Retriever, Akita Inu, Cocker Spaniel e Pastor de Shetland (Bruijin *et al.*, 2007).

1.4.2.1. Apresentação clínica

O AAC ocorre com maior frequência na face rostral da mandíbula, em especial, em redor do dente canino. Os dentes molares e pré-molares são menos afetados (Meuten, 2017), todavia mais frequente nas peças maxilares (Holmstrom *et al.*, 2005) . O ameloblastoma é frequentemente agressivo, invadindo o osso alveolar e causando esfoliação dentária. Macroscopicamente, observa-se uma massa gengival irregular ao nível da arcada dentária. A infiltração dos linfonodos regionais e metastização à distância não são reportadas (Meuten, 2017).

1.4.2.2. Características histológicas

O ACC deriva do epitélio do esmalte ou do epitélio de Malassez na base da raiz do dente (Gardner & Baker, 1991). Histologicamente, o tumor compreende o epitélio odontogénico, após a compressão o epitélio é substituído por um estroma denso fibroso com uma aparência basófila e solta. As células epiteliais da periferia são cuboides e contêm o núcleo orientado do lado oposto à membrana. As células não basilares epiteliais proliferam centralmente em cada ilha. Estas células são separadas por espaços intercelulares com pontes intercelulares típicas de acantócitos (Junqueira *et al.*, 1995).

Alguns ameloblastomas podem apresentar características do carcinoma das células escamosas, contudo não possuem capacidade de metastização (Gardner & Baker, 1991).

1.4.3. Ameloblastoma Central

Ao longo dos anos, a nomenclatura deste tumor em animais de companhia sofreu diversas alterações. O ameloblastoma continua a ser descrito como um tumor quístico distinto do ameloblastoma acantomatoso canino (Dvm & Bell, 2014) e compreende cerca de 1% de todos os tumores e quistos da mandíbula (Iakovou *et al.*, 2015).

Este tem origem nas capas vestigiais da lâmina dentária da mandíbula, geralmente na região incisiva (Leon-Roman & Gioso, 2004). O ameloblastoma é raro em animais companhia e consiste de remanescentes epiteliais com características de tecido embrionário do órgão. Existem vários padrões histológicos, mas nenhum foi reconhecido em Medicina Veterinária (Slatter, 2002).

1.4.3.1 Apresentação clínica

Geralmente, não se verificam sinais clínicos até ao aparecimento de uma tumefação local, a qual pode comprometer a função mastigatória dos animais. O ameloblastoma é um tumor benigno de crescimento lento. As lesões podem ser infiltrativas nos tecidos adjacentes, resultando numa osteólise periférica mal definida e em recorrência após a sua remoção, principalmente, nos localizados na arcada maxilar (Slatter, 2002).

Radiograficamente, apresentam-se como lesões radiotransparentes multilobadas no osso e com reabsorção da raiz dentária adjacente associada (Leon-Roman & Gioso, 2004).

1.4.3.2 Características histológicas

Histologicamente, consiste na proliferação do epitélio odontogénico no estroma fibroso, sendo variáveis as proporções entre o epitélio e o estroma (Leon-Roman & Gioso, 2004).

O ameloblastoma diferencia-se do AAC, através da presença de queratinização, da ausência de estroma similar ao do LPD e pela presença de depósitos de hialina intracelulares (Junqueira *et al.*, 1995).

A diferenciação entre o ameloblastoma e o carcinoma espinocelular é, portanto, de vital importância, uma vez que ambos apresentam queratina e presença de matrizes de colagénio induzido, semelhante a um osteoide, dentina e cimento, bem como inclusões hialinas intracelulares (Leon-Roman & Gioso, 2004).

1.4.4. Tumor odontogénico produtor de amiloide

Nos pacientes humanos, o tumor odontogénico epitelial calcificado é semelhante ao dos cães e dos gatos, nos quais a sua nomenclatura se alterou para tumor odontogénico produtor de amiloide. Esta neoplasia é incomum e a sua fisiopatogenia pouco clara (Delaney *et al.*, 2012).

Estas duas neoplasias salientam-se pelo fato de produzirem amiloide de origem desconhecida. A maioria são expansivas, sólidas ou massas quísticas na gengiva. O tumor é benigno, podendo invadir localmente, incorporando dentes e, ainda, causando a destruição do maxilar e dos ossos da face (Delaney *et al.*, 2012).

Histologicamente, apresenta origem odontogénica, contudo ainda não é conhecida a célula específica que lhe dá origem e a fonte da amiloide (Delaney *et al.*, 2012). Distingue-se do ameloblastoma, através da quantidade superior de amiloide presente e que tende a calcificar e pela menor frequência de identificação do retículo estrelado (Bock, *et al.*, 2011).

1.4.5. Fibroma ameloblástico

O fibroma ameloblástico é mais comum em ruminantes, mas extremamente rara em animais de companhia. O seu diagnóstico é controverso no gato e não há relatos na espécie canina (Gardner, 1996; Cohen, Bhattacharyya, 2004).

Este tumor é localmente invasivo, não possui a capacidade de metastização e observam-se diversos graus de destruição óssea local. É possível confundir-se com o ameloblastoma. O fibroma ameloblástico afeta também o tecido conectivo (Leon-Roman & Gioso, 2004). Histologicamente, apresenta proliferação do epitélio odontogénico e de células mesenquimatosas pulpa mesenquimal (Ueki *et al.*, 2004).

1.4.6. Odontoma

O odontoma é uma neoplasia odontogénica de origem ectomesenquimal, cuja etiologia é ainda desconhecida. É composto por vários tecidos dentários, tais como o esmalte, o cemento, a dentina e a pulpa dentária. O odontoma composto é formado pela divisão normal do esmalte, dando origem a uma grande quantidade de pequenos dentes (denticulos) unidos por tecido conjuntivo, cemento ou substância óssea. O odontoma complexo, por sua vez, é caracterizado pela formação de tecidos odontogénicos desorganizados e sem morfologia dentária (Mendonça *et al.*, 2009).

Esta neoplasia é muito rara em cães (Ueki *et al.*, 2004). Observa-se mais em animais jovens e, normalmente, localiza-se na mandíbula ou na maxila. A massa pode formar-se nas proximidades da coroa ou da raiz de um dente normal. Clinicamente, apresenta uma aparência de dentes supranumerários (Leon-Roman & Gioso, 2004).

1.4.7. Cementoma

O cementoma foi descrito em humanos, pela primeira vez, em 1930. Esta neoplasia é rara em animais domésticos, tendo-se verificado alguns casos em ruminantes e roedores. É considerado uma neoplasia benigna, que emerge da raiz do dente de origem

mesenquimatosa. O crescimento lento e expansivo desta massa é acompanhado por sinais de disfagia e de desconforto oral (Martinez *et al.*, 2016).

Este tumor caracteriza-se pela formação expansiva de uma massa com tecido semelhante ao cimento, intimamente associada à raiz do dente, bem como pela proliferação de cementoblastos e pela destruição da lamina dura do osso alveolar (Kreutzer *et al.*, 2007; Regezi *et al.*, 2008).

Radiograficamente, observa-se uma massa bem definida, radiopaca, que se encontra rodeada por um halo uniforme radiotransparente correspondente ao espaço do LPD (Martinez *et al.*, 2016).

Histologicamente, apresenta material semelhante a cimento com fibras abundantes de colagénio e formação de lacunas anormais que rodeiam as estruturas dentárias normais, incluindo a polpa dentária, dentina e o cimento (Kreutzer *et al.*, 2007).

1.4.8. Quistos odontogénicos

Os quistos odontogénicos, radiculares ou dentígeros, são lesões semelhantes a neoplasias raras em animais domésticos. Clinicamente, apresentam-se como uma tumefação na região da maxila e são indolores (Thatcher, 2017).

De entre eles, os quistos dentígeros são considerados os mais comuns. Surgem como dilatações do espaço folicular que rodeia a coroa de um dente ainda não erupcionado, lesão esta mais comum no primeiro pré-molar mandibular (MacGee, 2014). Estes podem expandir-se para os dentes adjacentes, levando a uma reabsorção radicular do dente afetado ou a pulpíte (MacGee, 2014). Os quistos dentígeros desenvolvem-se através da proliferação anormal dos vestígios de Malassez (McGavin & Zachary, 2009).

O quisto radicular, também designado por quisto periapical, forma-se a partir dos restos epiteliais de um granuloma periapical, propensos a formar cavidades quísticas. Poderá ter também origem nas cavidades de um abscesso crónico por epiteliação das suas paredes (Leon-Roman & Gioso, 2004).

1.5. Reabsorção óssea

1.5.1. Osteoclastos

Originalmente descritos em 1873 por Albert Koliker, são células multinucleadas derivadas dos precursores hematopoiéticos da linha monocíta-macrofágica e especializadas na remodelação do tecido ósseo (Nagy & Penninger, 2015).

Os organelos dos osteoclastos possuem uma distribuição peculiar, sendo que o núcleo é rodeado pelo retículo endoplasmático. As mitocôndrias são numerosas, longas e encontram-se maioritariamente localizadas do lado da célula que está mais próximo do osso e adjacente aos lisossomas e vacúolos (Cappariello *et al.*, 2014).

A reabsorção óssea é mediada, principalmente, pelos osteoclastos, envolvendo a remoção dos constituintes minerais e orgânicos da matriz óssea (Osdoby *et al.*, 1995). Os osteoclastos são estimulados a reabsorver osso através da paratormona, da vitamina D e da prostaglandina-E2 e são inibidos pela calcitocina (Niemec, 2013).

1.5.2. Osteoblastos

Os osteoblastos têm a capacidade de sintetizar proteoglicanos e proteínas extracelulares que servem de base para a matriz óssea. Estes também respondem a hormonas que se encontram em circulação e produzem fatores de crescimento e de diferenciação que mobilizam as células precursoras de osteoclastos. Quando os osteoblastos se encontram na superfície óssea tornam-se osteócitos, uma vez que se encontram rodeados de matriz óssea (Evans & Lahunta, 2013)

1.5.3. Imunologia do tecido ósseo

No final dos anos 90, descobriu-se uma citocina secretada pelos linfócitos responsável pela diferenciação e ativação dos osteoclastos, ou seja, que favorecia a reabsorção óssea. Essa citocina ativadora de osteoclastos é conhecida como ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) que, por sua vez, se liga ao recetor do RANK. Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG) é um importante mediador que inibe a ligação entre o RANKL e o RANK inibindo, assim, a ativação dos osteoclastos (Osdoby *et al.*, 1995).

Os osteoclastos progenitores são capazes de se diferenciarem em osteoclastos através da estimulação de fator estimulante de colónias de macrófagos, expresso pelos

osteoblastos, no entanto, esse fator por si só não possui a capacidade de gerar osteoclastos maduros através dos progenitores, indicando assim que existem outros fatores que contribuem para esse processo.

Tendo em conta que os osteoblastos conferem suporte às células tronco da medula óssea, a sua possível destruição poderá comprometer gravemente o processo de hematopoiese (Calvi *et al.*, 2003). Os osteoclastos exercem uma influência na mobilização das células tronco da medula óssea e esta, por sua vez, funciona como reservatório para os linfócitos T e B (Takayanagi, 2012).

1.5.3. RANK

O RANK é um recetor transmembranar tipo 1 da família TNF e encontra-se presente nas células precursoras dos osteoclastos, células dendríticas, fibroblastos e células T, estando associado à remodelação óssea (Tekkesin *et al.*, 2011).

É um membro da superfamília dos fatores recetores do fator de necrose tumoral (TNFRSF) e um ativador central do NF- κ B, que controla a transcrição do DNA e é o recetor do complexo OPG-RANKL (Tekkesin *et al.*, 2011).

O complexo OPG-RANKL é muito específico e possui uma grande afinidade ao RANK e a ativação do RANK promove a osteoclastogénese (Pérez-Sayáns *et al.*, 2010). Uma vez ativado, o RANKL promove a maturação dos osteoclastos, aumentando a expressão específica dos genes osteoblásticos. O RANK é altamente expressado na superfície dos osteoclastos progenitores bem como maduros que são aptos a traduzir os sinais da osteoclastogénese ao ligarem-se ao RANKL (Barger *et al.*, 2007).

A cascata de sinalização do RANK é muito complexa, sendo que o seu papel na osteoclastogénese e proliferação de células tumorais ainda ser pouco estudada (Moraes *et al.*, 2013).

1.5.4. RANKL

O RANKL é um peptídeo da família do TNF constituído por 317 aminoácidos. É expresso como uma citocina da membrana celular ou como um fator solúvel libertado por diversos tipos de células, como linfócitos T e osteoblastos (Moraes *et al.*, 2013).

O RANKL constitui um fator de diferenciação dos osteoclastos, sendo considerado um estimulador das células dendríticas, atuando como um fator de sobrevivência das mesmas e regulando a ativação das células T maduras. Estas atividades estão associadas à ativação do NF-Kb após a ligação do RANKL ao seu recetor de membrana RANK (Moraes *et al.*, 2013).

Os efeitos biológicos do RANKL são produzidos quando este se liga ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos, resultando na fusão, diferenciação, sobrevivência e ativação dos osteoclastos, resultando no aumento do número de osteoclastos ativos e reabsorção óssea (Moraes *et al.*, 2013).

A osteoclastogénese induzida pelo RANKL só se inicia quando o RANKL se liga ao seu recetor RANK expresso pelos pré-osteoclastos. Esta ligação do RANKL ao RANK inicia uma cascata de sinais, resultando na ativação e translocação do fator nuclear kappa-B ao núcleo, culminando na expressão da diferenciação induzida dos genes específicos dos osteoclastos. Estes eventos, levam à diferenciação e ativação dos osteoclastos maduros (Nagawa *et al.*, 1998). Esta atividade do RANKL é contrabalançada pela osteoprotegerina (OPG), um recetor segregado pelas células estromais e osteoblastos (Nagawa *et al.*, 1998).

1.5.5 Osteoprotegerina

A osteoprotegerina, conhecida como um fator inibidor da osteoclastogénese, é essencial para a regulação da remodelação óssea ao manter o balanço entre a reabsorção óssea e a formação óssea (Vaziri-Sani *et al.*, 2017).

A OPG atua ao ligar-se ao RANKL, prevenindo assim a ativação do RANK. A supressão deste sistema, diminui o desenvolvimento, a formação e a atividade dos osteoclastos, inibindo, por conseguinte, a reabsorção óssea (Niemec, 2010; Tekkesin *et al.*, 2011).

O equilíbrio entre a OPG e o RANKL regula a formação e a reabsorção óssea. (Tekkesin *et al.*, 2011). Assim, a taxa de remodelação óssea é hipoteticamente controlada pelo equilíbrio entre a OPG e o RANKL. Quando este equilíbrio se encontra a favor do OPG, a reabsorção óssea é inibida e a formação óssea predomina. Quando está a favor do RANKL, a reabsorção óssea predomina com possibilidade de lise óssea (Delmas, 2008).

2. PROJECTO

2.1. Contributo previsto deste trabalho

O contributo deste trabalho reside no fato de não existirem estudos recentes relacionados com a expressão de reguladores de reabsorção óssea (RANKL) em neoplasias odontogénicas, especificamente em Medicina Veterinária. É, portanto, pertinente o desenvolvimento do mesmo para um conhecimento mais alargado dos tumores odontogénicos em cães, particularmente o ameloblastoma acantomatoso canino, uma neoplasia benigna associada a lise óssea devido à sua agressividade local, bem como o estudo do papel do RANKL na reabsorção óssea e a sua associação com o AAC.

2.2. Objetivos

- Avaliar a expressão de reguladores de reabsorção óssea (RANKL) em ameloblastomas acantomatosos caninos e fibromas odontogénicos periféricos no cão através da técnica de imunohistoquímica em cortes de parafina;
- Desenvolver e estabelecer o protocolo de imunohistoquímica em cortes de parafina no Laboratório de Histopatologia da FMV-ULTH em amostras provenientes de AAC e de FOP de cão;
- Otimizar o protocolo de imunohistoquímica em cortes de parafina para o anticorpo anti-RANKL selecionado.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Caracterização da amostra em estudo

As amostras incluídas no presente estudo foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Patologia Veterinária da Universidade de Berna (Suíça) e pelo Laboratório DNAtch (Lisboa, Portugal) e foram recolhidas no período compreendido entre janeiro de 2016 e janeiro de 2018.

As amostras analisadas incluíram 47 neoplasias odontogénicas (40 FOP e sete AAC) e três fígados provenientes de cães. Como controlo positivo, utilizou-se o fígado dado saber-se que o mesmo possui o antígeno RANKL para garantir que os resultados obtidos fossem fidedignos.

2.3.2. Critérios de inclusão

Neste estudo, foram incluídos todos os AACs e FOPs de cães, sem qualquer distinção de género, idade e raça.

2.3.3. Critérios de exclusão

Neste trabalho, foi descartado qualquer outro tumor odontogénico que não AAC e FOP, tumores de origem não odontogénica, bem como outras lesões não neoplásicas da cavidade oral, nomeadamente, hiperplasia gengival e lesões inflamatórias de cão.

2.3.4. Processamento das amostras

As amostras provenientes do Instituto de Patologia Veterinária da Universidade de Berna já se encontravam processadas em lâminas de microscopia SuperFrost (VWR, Radnor, EUA), prontas a serem utilizadas neste estudo. As amostras antes de seccionadas em cortes seriados com 3 µm de espessura (Thermo Scientific Microm HM325), encontravam-se em blocos de parafina.

Após o fornecimento dos blocos de parafina, previamente fixadas em Formol, pela DNAtch, as amostras foram seccionadas em cortes seriados com 3µm de espessura (Thermo Scientific Microm HM325), transferidas para lâminas de microscopia SuperFrost (VWR, Radnor, EUA) e colocadas numa estufa a 37°C durante a noite, de modo a ser possível efetuar a técnica de imunohistoquímica no dia seguinte.

2.3.5. Protocolo da técnica imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) foi realizada em grupos de 10 lâminas, com duas lâminas gémeas de tumores odontogénicos de cão. Dentro do grupo das 10 lâminas, recorreu-se a quatro lâminas de fígado de cão, gato e rato que foram usadas como controlo positivo e para otimizar a técnica.

Iniciou-se a técnica com a desparafinização das lâminas em xilol e reidratação das mesmas em concentrações decrescentes de álcool etílico, seguida de uma lavagem em água destilada. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em água oxigenada a 37°C durante 15 minutos, num local escuro.

De seguida, as amostras foram incubadas no tampão citrato pH6 (citrato 0,1M pH1,8 + Na citrato 0,1M pH8,8). Este foi aquecido no micro-ondas a 700W durante 3

minutos. Após o aquecimento da solução as lâminas foram submersas na solução e colocadas três vezes por períodos de 5 minutos no micro-ondas a 700W.

Após este procedimento, as lâminas foram arrefecidas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas em PBS-Triston-X 0,3% duas vezes durante 5 minutos. Em seguida distribuiu-se 100µl de solução de bloqueio (PBS com 2% BSA - A7906, Sigma-Aldrich, EUA), por cada lâmina, e estas foram mantidas durante uma hora em câmara húmida à temperatura ambiente.

Passada uma hora, incubou-se o anticorpo primário, neste caso, o RANKL (ab45039, Abcam, Cambridge, United Kingdom) com uma diluição de 1:100. Nas lâminas de controlo negativo, foi utilizada a solução de bloqueio em vez do anticorpo primário. Todas as 10 lâminas foram colocadas na câmara húmida a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, realizaram-se quatro lavagens das lâminas em PBS durante 10 minutos cada. Após a lavagem, incubaram-se todas as lâminas com o anticorpo secundário policlonal de cabra anti-coelho IgG conjugado com peroxidase (410972, Dako, Carpinteria, EUA) durante uma hora em câmara húmida. Procedeu-se, novamente, a duas lavagens em PBS durante 10 minutos cada.

Seguidamente, incubou-se o cromogénio 3'-diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) durante 15-30 segundos, colocando de imediato as lâminas em água destilada para cessar a reação durante 10 minutos.

As lâminas foram coradas com hematoxilina de Meyer (VWR, EUA) por um período de 10 segundos, submetidas a uma breve lavagem com água corrente para remover o excesso do corante, seguida de uma desidratação das amostras em concentrações crescentes de álcool e em xilol durante 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando Entellan (VWR, EUA).

2.3.6. Observação ao microscópio

Após o seu processamento, as lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio Olympus (BX61) com uma ampliação de 400x e por um único observador. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio (U-LH100HG, Olympus Optical, Japão).

A avaliação da imunorreação foi efetuada, através da observação de coloração castanha das células. A avaliação da imunorreatividade de RANKL foi registada consoante os níveis de intensidade do mesmo.

2.4. RESULTADOS

A utilização de imunohistoquímica em cortes de parafina (IHC-P) pretendeu-se permitir a observação da expressão do RANKL nos dois tipos de tumores odontogénicos caninos estudados.

A imunorreatividade do RANKL foi identificada pela presença da coloração castanha nas lâminas analisadas. A observação desta marcação específica foi observada em todas as amostras de AACs e em 11 de FOPs.

O número de células com marcação positiva foi superior no AAC comparativamente com o FOP. A marcação destas lâminas encontrava-se maioritariamente no citoplasma das células do estroma.

É possível observar a expressão do RANKL nos tumores analisados e nas lâminas de controlo positivo na Figura 4 e 5), sendo que nos AAC verifica-se uma intensidade de marcação superior à dos FOPs. Esta marcação também foi observada no controlo positivo (Figura 6).

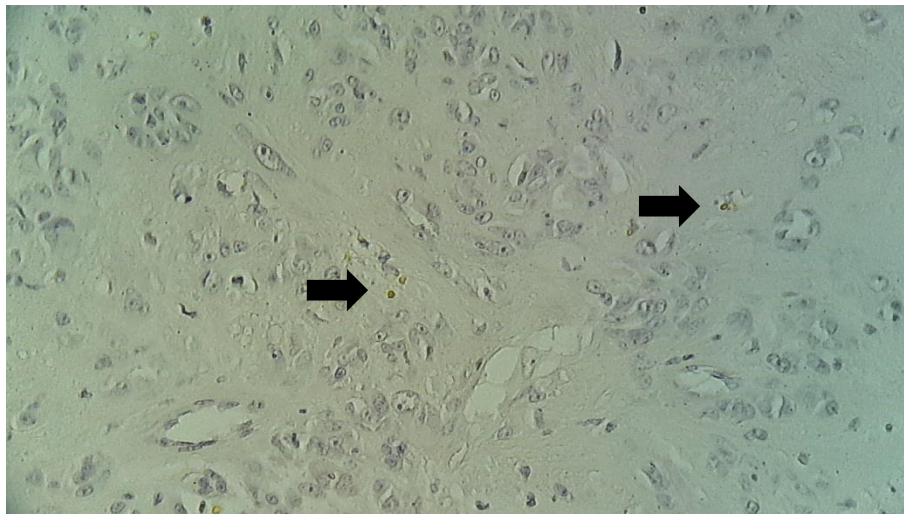


Figura 4 - Detecção de RANKL no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.

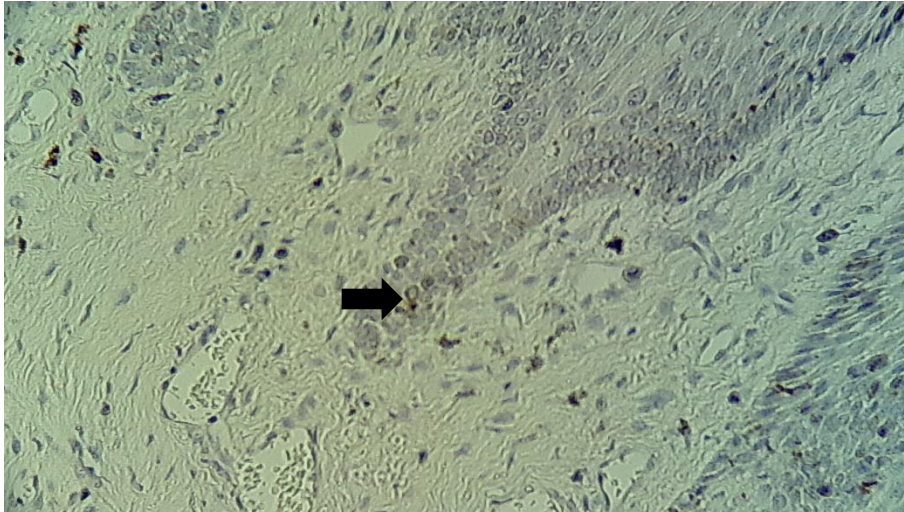


Figura 5 - Detecção de RANKL no FOP com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x

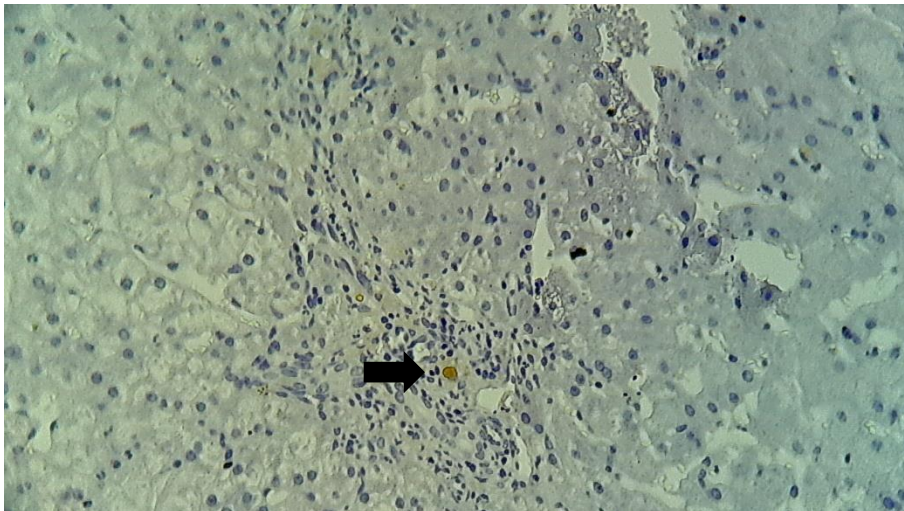


Figura 6 - Detecção de RANKL no fígado de cão com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x

Nas lâminas de controlo negativo de ambas as neoplasias estudadas, também se verificou a presença da mesma marcação, inclusive em algumas amostras a mesma foi mais intensa do que nas lâminas de controlo positivo (Figura 7-10).

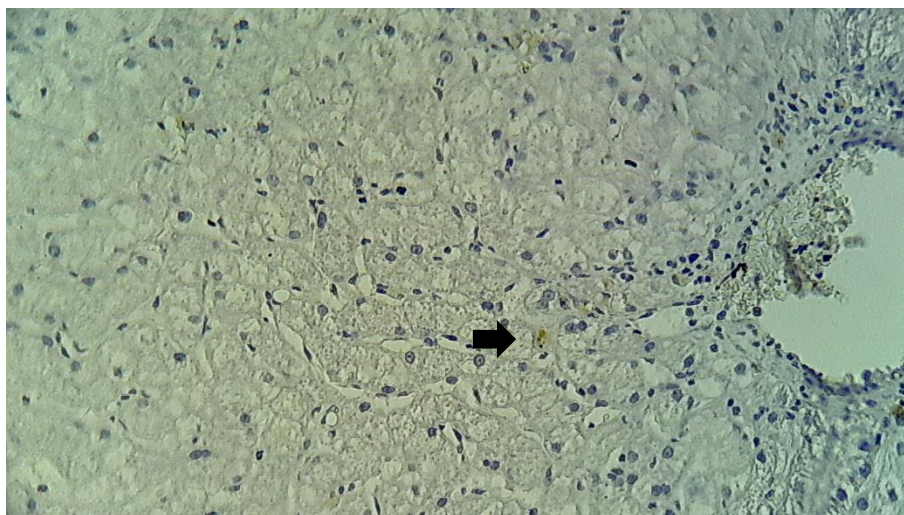


Figura 7 – Controle negativo - Detecção de marcação no fígado de cão com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.

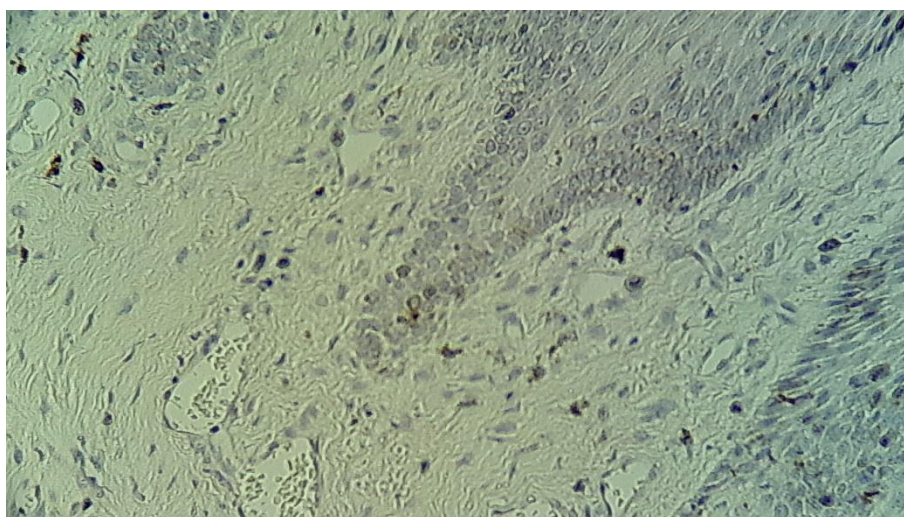


Figura 8 – Controle negativo da deteção de marcação no FOP com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.

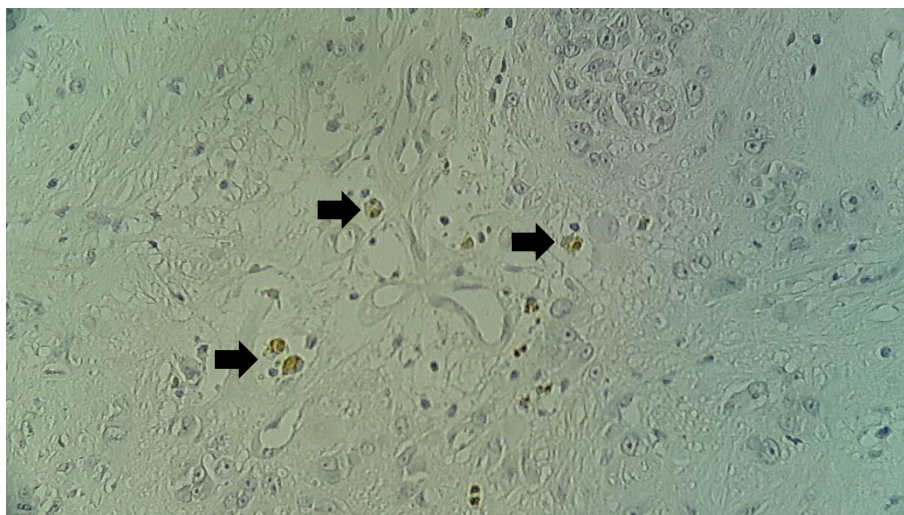


Figura 9 - Controlo negativo da deteção de marcação no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 40x.

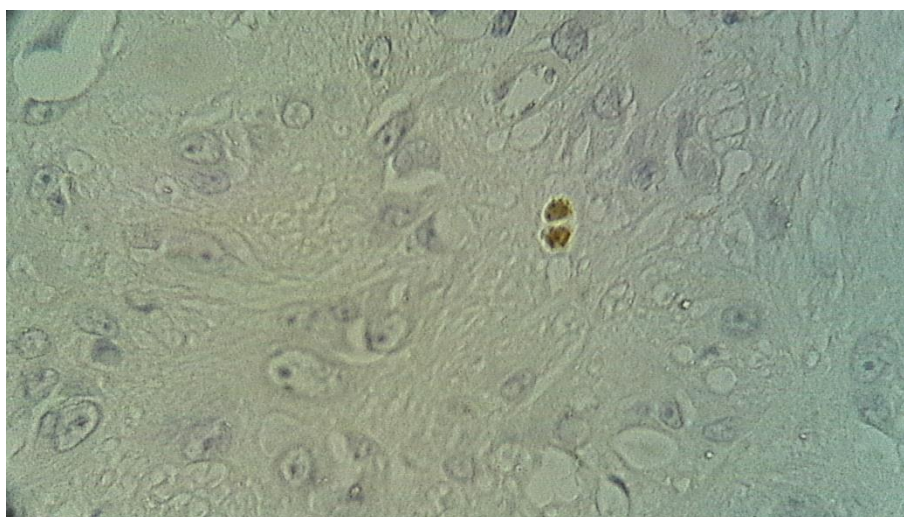


Figura 10 - Controlo negativo da deteção de marcação no AAC com recurso a imunohistoquímica. Coloração positiva em castanho, contra-coloração com hematoxilina. Ampliação 100x.

Apesar de se ter procedido à otimização da técnica com recurso a lâminas de fígado de várias espécies e terem sido ensaiadas duas tentativas com a técnica acima, com as mesmas 47 amostras, verificou-se que:

1. A ocorrência de resultados positivos no FOP, um tumor odontogénico que não causa invasão e lise óssea;
2. Após a análise das lâminas de controlo positivo que demonstraram sinal, verificou-se também que todas as lâminas de controlo negativo, lâminas que não possuíam o anticorpo primário, de AAC, bem como as de 11 do FOP tinham a presença de imunorreatividade nas mesmas células e localização da amostra em estudo (Figura 7-10).

Ambas as situações levam a que os resultados obtidos neste estudo possam ser considerados questionáveis.

2.5. DISCUSSÃO

O RANKL é expresso pelos osteoblastos, que são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, colagénio, glicoproteínas e proteoglicanos. O RANKL apresenta um papel fundamental na formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, sendo estes os responsáveis pela reabsorção óssea (Moraes *et al.*, 2013).

Quando as neoplasias invadem o osso, estabelecem com este um ciclo contínuo de reabsorção óssea: inicialmente o tumor liberta fatores que estimulam as células ósseas a libertar fatores de crescimento e diferenciação, como o TGF-beta, e citocinas que promovem o crescimento tumoral perpetuando o ciclo (Tekkesin *et al.*, 2011). A osteoclastogénese induzida pelas células tumorais implica alterações nas proporções de RANKL e OPG, a favor da formação e ativação de osteoclastos, que está também associada a um aumento da atividade dos osteoblastos em resposta à reabsorção óssea. Por sua vez, do aumento da reabsorção óssea resulta a libertação de fatores de crescimento da matriz óssea que promovem o crescimento tumoral, mantendo assim o ciclo (Tekkesin *et al.*, 2011).

O AAC constitui um tumor benigno que invade o osso e pode ser muito destrutivo, enquanto que o FOP é um tumor benigno que não apresenta sinais de invasão de tecidos adjacentes (Meuten, 2017).

O facto de se terem obtido resultados diferentes do esperado, no que concerne aos FOPs, e o facto de se terem obtido resultados positivos nos controlos negativos, levantam dúvidas relativamente aos resultados obtidos, não devendo assim os mesmos serem considerados relevantes. Desta forma, o presente trabalho foi um exercício sobre as problemáticas e desafios que surgem em estudos desta natureza e que, por vezes, dificultam ou impedem a obtenção de conclusões válidas.

Para contornar os resultados obtidos, seria pertinente a otimização da técnica de IHQ utilizada, investindo-se mais tempo na avaliação de vários passos do protocolo, como a recuperação antigénica a realizar, a concentração do anticorpo ou os detergentes que seriam aplicados. Assim, poder-se-ia ter eliminado o passo do PBS-Triton-X 0,3%, sendo que este permeabiliza a membrana celular, permitindo a passagem do anticorpo primário; ou proceder à sua substituição por lavagens com Tween 20, uma vez que este é

menos agressivo para a membrana e proteínas a identificar. Por outro lado, poder-se-ia ter alterado a concentração de anticorpo primário ou até mesmo o tipo de recuperação antigénica, podendo-se ter utilizado outro tipo de soluções, como por exemplo o Tris-EDTA.

Estes passos permitiriam melhorar o sinal obtido nos controlos positivos e amostras, mas o verdadeiro problema residia na presença de sinal similar nos controlos negativos das amostras analisadas. Assim, devido à natureza dos resultados nos controlos negativos, presume-se que os mesmos pudessem ser resultado da presença de peroxidases endógenas. Desta forma, poderia realizar-se a mesma técnica deixando as lâminas durante mais tempo em água oxigenada, de modo a garantir a inibição da atividade das peroxidases endógenas ou procurado identificar as células marcadas e avaliar que tipo de corante ou enzima poderá ter interferido com a técnica.

2.5.1. Resultados esperados

A maioria dos estudos realizados sobre a reabsorção óssea tem como objetivo uma melhor compreensão da interação do RANK, RANKL e OPG. A reabsorção óssea é um processo complexo iniciado pela proliferação de osteoclastos imaturos, cuja diferenciação é regulada, principalmente, pelos mediadores RANK/RANKL/OPG. A interação entre o RANK e o RANKL possui um papel crítico na promoção da diferenciação e ativação do osteoclasto, levando assim à reabsorção óssea. O OPG bloqueia a formação de osteoclastos, ao inibir a ligação do RANKL ao RANK (Suda *et al.*, 1999). O OPG e RANKL já foram detetados nos odontoblastos, ameloblastos e células dos ligamentos periodontal como os fibroblastos e cementoblastos (Tekkesin *et al.*, 2011).

Estudos em Medicina Humana, demonstram a expressão do RANK, RANKL e OPG no epitélio, bem como nas paredes dos quistos odontogénicos, incluindo quistos periapicais e granulomas (da Silva *et al.*, 2008). Da Silva e seus colaboradores (2008) referiram que o ameloblastoma sólido/multiquístico apresentava um número elevado de células RANKL- positivas no estroma (Figura 11). Ainda outro estudo mais recente de Tekkesin e colegas (2011) verificaram uma expressão semelhante entre os tumores odontogénicos, sendo que o RANKL se encontrava expresso no estroma em ameloblastomas, num estudo em medicina humana.

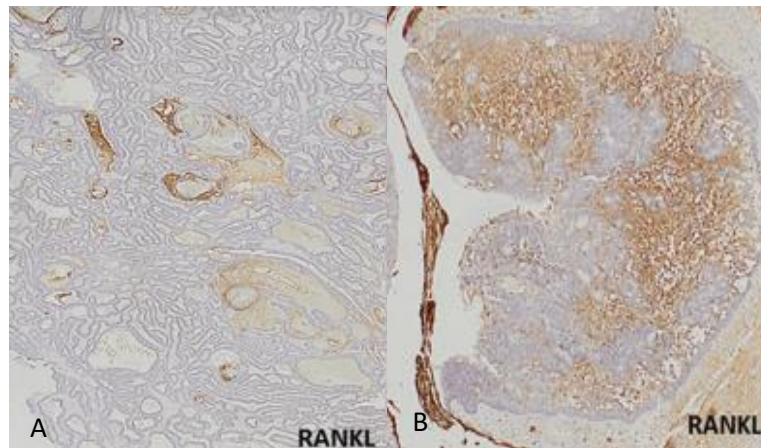


Figura 11. A-Marcação de RANKL num Ameloblastoma. Marcação no citoplasma e membrana periférica das células colunares. B-Marcação de RANKL num Ameloblastoma. Marcação nas células centrais poliedras (da Silva *et al.*, 2008).

Noutro estudo de Medicina Humana, também avaliando a expressão de RANKL, RANKL e OPG em ameloblastomas sólidos/multiquísticos recorrentes foi observada uma expressão alta de RANKL no estroma (Siar *et al.*, 2015). Andrade e colegas (2008) avaliaram a presença desses marcadores em tumores odontogénicos e a expressão de RANKL foi encontrada em todos os casos, sendo o estroma o local de maior expressão.

Outro estudo concluiu que, nos ameloblastomas, existe um número maior de células RANKL-positivas no estroma e ainda que o aumento da expressão de RANKL está relacionado com a ativação osteoclástica, favorecendo assim a reabsorção óssea (Hofbauer, 2006). Menezes e os seus colaboradores (2008) demonstraram uma elevada secreção de RANKL em condições inflamatórias, sendo que esta secreção não levaria a um processo de reabsorção óssea, devido à presença de OPG. Por sua vez, Ohazama e os seus colaboradores (2004), observaram a expressão de RANKL e OPG durante a odontogénese e o RANKL foi expresso no mesênquima do dente.

Tendo em conta que o FOP corresponde a uma neoplasia benigna sem capacidade de invasão óssea, os resultados esperados seriam a ausência de marcação. Não existem estudos que demonstrem resultados de marcação positiva do FOP em cães.

Contrariamente os resultados esperados das amostras de AAC seriam a presença de uma marcação de intensidade elevada no estroma, visto que esta corresponde a uma neoplasia benigna com capacidade de invasão óssea.

2.5.2. Limitações do estudo

A escassez de amostras de AAC no cão originou uma amostragem inferior à desejada.

Por outro lado, um número mais elevado de lâminas por amostra tornaria possível a otimização da técnica com a obtenção de resultados mais concretos.

Ao terem-se obtido resultados positivos no controlo negativos das amostras e pelo facto do sinal obtido ter sido similar, não podemos considerar os presentes resultados como válidos.

2.6. CONCLUSÃO

Este trabalho pretendia contribuir para o conhecimento dos tumores odontogénicos caninos e para o papel do RANKL no estudo do potencial de reabsorção óssea destas doenças.

Dado que os resultados obtidos não foram conclusivos, será necessário continuar a otimizar a técnica de imunohistoquímica até ser estabelecido um protocolo adequado ao estudo deste tipo de amostras.

São assim necessários mais estudos em Medicina Veterinária sobre o tema, de forma a contribuir para o conhecimento do diagnóstico histopatológico destas lesões as têm características biológicas bastante distintas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron, J.R., Choi, Y. (2000). Osteoimmunology: bone versus immune system. *Nature*, 408: 535-536

Andrade FR. et al. (2008). Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106(4): 548-555

Amory, J. T., Reetz, J. A., Sánchez, M. D., Bradley, C. W., Lewis, J. R., Reiter, A. M., & Mai, W. (2014). Computed tomographic characteristics of odontogenic neoplasms in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 55(2) 147–158.

Barger, A. M., Fan, T. M., de Lorimier, L.-P., Sprandel, I. T., & O'Dell-Anderson, K. (2007). Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in neoplasms of dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1): 133–140

Bar-Am, Y., & Verstraete, F. J. M. (2010). Elastic training for the prevention of mandibular drift following mandibulectomy in dogs: 18 cases (2005-2008). *Veterinary Surgery*, 39(5), 574–580.

Bell, C. M., & Soukup, J. W. (2014). Nomenclature and classification of odontogenic tumors - Part II: Clarification of specific nomenclature. *Journal of Veterinary Dentistry*, 31(4), 234–243.

Bellows, J. (2010). Treatment of Endodontic Disease. Feline Dentistry – Oral Assessment, Treatment and Preventive Care. WileyBlackwell, Iowa, USA

Bock, P., Hach, V., & Baumgärtner, W. (2011). Oral masses in two cats. *Veterinary Pathology*, 48(4), 906–910.

Branstetter, D., Rohrbach, K., Huang, L. Y., Soriano, R., Tometsko, M., Blake, M., ... Dougall, W. C. (2015). RANK and RANK ligand expression in primary human osteosarcoma. *Journal of Bone Oncology*, 4(3), 59–68.

Breuer, W., Geisel, O., Hermanns, W., & Linke, R. P. (1994). Light Microscopic, Ultrastructural, and Immunohistochemical Examinations of Two Calcifying Epithelial Odontogenic Tumors (CEOT) in a Dog and a Cat. *Veterinary Pathology*, 31(4), 415–420.

- Bruijn, N.D., Kirpensteijn, J., Neyens, I.S., Van Den Brand, J.A. & Van Den Ingh, T.S. (2007). Clinicopathological study of 52 feline epulides. *Veterinary Pathology*, 44(2),161-169.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., ... Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841-846
- Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., & Teti, A. (2014). Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1(561):13-21
- Chen, Y., Di Grappa, M. A., Molyneux, S. D., McKee, T. D., Waterhouse, P., Penninger, J. M., & Khokha, R. (2015). RANKL blockade prevents and treats aggressive osteosarcomas. *Immunotherapy*, 7(317):1–13
- Collin, Osdoby, P., Oursler, M. J., Rothe, L., Webber, D., Anderson, F., & Osdoby, P. (1995). Osteoclast 121F antigen expression during osteoblast conditioned medium induction of osteoclast like cells in vitro: Relationship to calcitonin responsiveness, tartrate resistant acid phosphatase levels, and bone resorptive activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(1):45-58
- da Silva, T. A., Batista, A. C., Mendonça, E. F., Leles, C. R., Fukada, S., & Cunha, F. Q. (2008). Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 105(3):333-41
- Das, S., Nath, B. K., Alim, A., Sikder, S., & Pallab, M. S. (2013). Acanthomatous ameloblastoma in a female Spitz dog with rare atypical histomorphology: A case study. *Veterinary World*, 6(4):219–222
- Delaney, M. A., Singh, K., Murphy, C. L., Solomon, A., Nel, S., & Boy, S. C. (2013). Immunohistochemical and Biochemical Evidence of Ameloblastic Origin of Amyloid-Producing Odontogenic Tumors in Cats. *Veterinary Pathology*, 50(2), 238–242.
- Delmas, P. D. (2008). Clinical Potential of RANKL Inhibition for the Management of Postmenopausal Osteoporosis and Other Metabolic Bone Diseases. *Journal of Clinical Densitometry*, 11(2):325-38.

- Ducy, P., Schinke, T., & Karsenty, G. (2000). The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289(5484):1501-4.
- Dvm, J. W. S., & Bell, C. M. (2014). Nomenclature and Classification of Odontogenic Tumors - Part I : Historical Review. *Journal of Veterinary Dentistry*, 31(4):228–232
- Dyce, K., Sack, W. & Wensing, C. (2002). *Text Book of Veterinary Anatomy* (3rd ed). Philadelphia: Saunders
- Evans, H. E. & de Lahunta, A. (2013). *Miller's Anatomy of the Dog*. (4th ed.) Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA.
- Gardner DG (1996). Ameloblastic fibromas and related tumors in cattle. *J Oral Pathol Med* 25:119–124.
- Garg, N., & White, C. E. (2017). Mechanism of zinc oxide retardation in alkali-activated materials: An: in situ X-ray pair distribution function investigation. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(23):11794–11804.
- Getty, R., Sisson, S & Grossman, J. D. (1986) *Anatomia dos animais domésticos* (5^a ed.) Vol.2, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Goldschmidt, S. L., Bell, C. M., Hetzel, S., & Soukup, J. (2017). Clinical characterization of canine acanthomatous ameloblastoma (CAA) in 263 dogs and the influence of postsurgical histopathological margin on local recurrence. *Journal of Veterinary Dentistry*, 34(4):241–247.
- Head, K., Cullen, J., Dubielzig, R., Else, R., Misdorp, W., Tateyama, S. & Gaag, I. (2003). *Histological Classification of Tumours of the Alimentary Sytem of Domestic Animals* (2nd ed., Vol. 10). Washington: Armed Forces Institute of Pathology
- Heithersay, G. S., Musu, D., & Cotti, E. (2017). External tooth resorption associated with a peripheral odontogenic fibroma: review and case report. *Australian Dental Journal*, 62(4):516-522.
- Hirayama, K., Miyasho, T., Ohmachi, T., Watanabe, T., Yokota, H., & Taniyama, H. (2010). Biochemical and Immunohistochemical Characterization of the Amyloid in Canine Amyloid-Producing Odontogenic Tumor. *Veterinary Pathology*, 47(5):915–922.

- Holmstrom, S. E., Gioso, M. a, Carvalho, V. G. G., Hale, F. a, & Harvey, C. E. (2005). Preface Options. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 35(4).
- Iakovou, M., Chrysomali, E., Piperi, E., Fanourakis, G., Sklavounou, A., Vlachodimitropoulos, D., & Tseleni-Balafouta, S. (2015). A comparative study of bone remodeling molecules expression in different types of jaw ameloblastoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 44(7):543–551.
- Junqueira, L., Carneiro, J. & Kelley, R. (1995). *Basic Histology* (8th edition). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A
- Kelly, J. M., Belding, B. A., & Schaefer, A. K. (2010). Acanthomatous ameloblastoma in dogs treated with intralesional bleomycin. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(2):81–86.
- Kreutzer, R., Wohlsein, P., Staszky, C., Nowak, M., Sill, V., & Baumgärtner, W. (2007). Dental benign cementomas in three horses. *Veterinary Pathology*, 44(4):533–536.
- Leon-Roman, M. A. & Gioso, M. A. (2004) Endodontia - anatomia, fisiopatologia e terapia para afecções dos tecidos internos do dente. *Medvep - Rev Cient Eletrônica Med Vet - Pequenos Animais e Animais de Estimação*. 2(7):195-203.
- Lewis JR (2007). Benign oral neoplasia. In: Côte E, ed. *Clinical Veterinary Advisor – Dogs and Cats*. St. Louis, USA. Mosby Elsevier. 769-771
- Macgee, S. (2014). Endodontic therapy of a mandibular canine tooth with irreversible pulpitis secondary to dentigerous cyst. *Journal of Veterinary Dentistry*, 31(1):30-9
- McGavin, M.D.; Zachary, J.F. Bases da Patologia em Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476p.
- Malmberg, J. L., Howerth, E. W., Powers, B. E., & Schaffer, P. A. (2017). Acanthomatous ameloblastoma with atypical foci in five dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(2):154–159.
- Marley, K., Bracha, S., & Seguin, B. (2015). Osteoprotegerin activates osteosarcoma cells that co-express RANK and RANKL. *Experimental Cell Research*, 338(1):32–38.
- Mayer, M. N., & Anthony, J. M. (2007). Radiation therapy for oral tumors: Canine

- acanthomatous ameloblastoma. *Canadian Veterinary Journal*, 48(1):99–101.
- Menezes R, Garlet TP, Letra A, et al (2008) Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: Possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod* 34: 932
- Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2002). Periodontics. Small Animal Dentistry (Vol. 1).
- Meuten, D. (2017). Tumors in Domestic Animals (5th edition). Iowa: John Wiley & sons inc.
- Amory, J. T., Reetz, J. A., Sánchez, M. D., Bradley, C. W., Lewis, J. R., Reiter, A. M., & Mai, W. (2014). *Computed tomographic characteristics of odontogenic neoplasms in dogs*. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 55(2):147–158.
- Miles, C. R., Bell, C. M., Pinkerton, M. E., & Soukup, J. W. (2011). Maxillary ameloblastic fibroma in a dog. *Veterinary Pathology*, 48(4):823–826.
- Morris, J., Dobson, J. *Cabeça e pescoço. Oncologia em pequenos animais*. (1st. Ed.) São Paulo: Roca, 2007- p.10-118
- Nagy, V., & Penninger, J. M. (2015). The RANKL-RANK Story. *Gerontology*, 61(6):534-42
- Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., ... Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2):395-400
- Niemiec, B. A. (2010). *Small animal dental, oral and maxillofacial disease: A color handbook*. Manson, London, 10-39.
- Niemiec, B. A. (2011). Diagnosis & Treatment of Crown Fractures. *Today's Veterinary Practice Journal*. 1(1):8-21.
- Niemiec, B. A. (2013). *Veterinary Periodontology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Nonaka, C. F. W., Cavalcante, R. B., Nogueira, R. L. M., De Souza, L. B., & Pinto, L. P. (2012). Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG),

angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Archives of Oral Biology*, 57(3):230–237.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT: OPG, RANK, and RANKL in tooth development: Co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res* 83:241.

Paulista, X. I. V. C., & Animais, P. (2011). XIV Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - CONPAVEPA - São Paulo-SP, 1–6.

Pérez-Sayáns, M., Somoza-Martín, J. M., Barros-Angueira, F., Rey, J. M. G., & García-García, A. (2010). RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 109(5):679-86.

Poulet, F. M., Valentine, B. A., & Summers, B. A. (1992). A Survey of Epithelial Odontogenic Tumors and Cysts in Dogs and Cats. *Veterinary Pathology*, 29(5):369–380.

Reiter, A. M., Lewis, J. R., & Harvey, C. E. (2012). *Dentistry for the Surgeon*, 1037–1053.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Odontogenic tumors. In: Oral pathology clinical pathology correlations*. (5th Ed.) St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2008, pp 261–281.

SALES, M. A. O.; GAIA, B. F.; PERELLA, A.; CAVALCANTI, M. G. P. (2013). *Revista Odonto Ciência. Rev Odonto Cienc*, 28(2): 47–52.

Senn, D., Schwalder, P., Roux, P., Bosshardt, D. D., & Stoffel, M. H. (2010). Immunohistochemical localization of osteoclastogenic cell mediators in feline tooth resorption and healthy Teeth. *Journal of Veterinary Dentistry*, 27(2):75–83.

Seyedmajidi, M., Nafarzadeh, S., Siadati, S., Shafae, S., Bijani, A., & Keshmiri, N. (2013). p53 and PCNA Expression in Keratocystic Odontogenic Tumors Compared with Selected Odontogenic Cysts. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(4):185–193.

Shimamura, M., Nakagami, H., Osako, M. K., Kurinami, H., Koriyama, H., Zhengda, P., ... Morishita, R. (2014). OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(22):8191-6.

- Siar, C. H., Tsujigiwa, H., Ishak, I., Hussin, N. M., Nagatsuka, H., & Ng, K. H. (2015). RANK, RANKL, and OPG in recurrent solid/multicystic ameloblastoma: Their distribution patterns and biologic significance. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 119(1), 83–91.
- Spahni, A. I., Schawalder, P., Rothen, B., Bosshardt, D. D., Lang, N., & Stoffel, M. H. (2009). Immunohistochemical localization of RANK, RANKL and OPG in healthy and arthritic canine elbow joints. *Veterinary Surgery*, 38(6): 780–786.
- Soluk-Tekkeşin, M., & Wright, J. M. (2017). Odontogenic tumors: where are we in 2017? *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*. S10-S30.
- Takayanagi H. (2012). New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol*. 8:684-9.
- Tekkesin, M. S., Mutlu, S., & Olgac, V. (2011). The Role of RANK/RANKL/OPG Signalling Pathways in Osteoclastogenesis in Odontogenic Keratocysts, Radicular Cysts, and Ameloblastomas. *Head and Neck Pathology*, 5(3):248–253.
- Theilen GH, Madewell BR. (1987). Tumours of the digestive tract. In: *Theilen GH, Madewell BR, eds. Veterinary Cancer Medicine*. Filadélfia, EUA: Lea&Febiger, 499-534.
- Trinidad, E. M., & González-Suárez, E. (2016). RANKL inhibitors for osteosarcoma treatment: hope and caution. *Annals of Translational Medicine*, 4(24):534–534.
- Ueki, H., Sumi, A., Takaishi, H., Ito, H., Oyamada, T., & Yoshikawa, H. (2004). Malignant ameloblastic fibro-odontoma in a dog. *Veterinary Pathology*, 41(2):183–185.
- Vaziri-Sani, F., Brundin, C., & Agardh, D. (2017). Osteoprotegerin autoantibodies do not predict low bone mineral density in middle-aged women. *Bone Reports*, 7:132-136.
- Verstraete FJM, Ligthelm AJ, Weber A. (1992). The histological nature of epulides in dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 106:169-182.
- Villamizar-Martinez, L. A., Reiter, A. M., Sánchez, M. D., & Soltero-Rivera, M. M. (2016). Benign cementoblastoma (true cementoma) in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3:2(1) 2055116915626847.

- Wang WJ, Zhao YM, Lin BC, Yang J, Ge LH. (2012). Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. *Eur J Oral Sci* 120(4): 303-310
- Withrow, S. J., & Vail, D. M. (2007). Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*.

ANEXO I – Protocolo de imunohistoquímica de cortes de parafina

1. As lâminas devem ser submetidas à desparafinação das lâminas em xilol e reidratar em concentrações decrescentes de etanol:
 - a. Xilol (3x5 minutos)
 - b. Álcool 100% (2x5 minutos)
 - c. Álcool 95% (3 minutos)
 - d. Álcool 70% (3 minutos)
2. Lavar em água destilada durante 5 minutos
3. Incubar em água oxigenada no escuro, durante 15 minutos a 37°C
4. Proceder à recuperação antigénica em 10 mM de tampão citrato pH6 (450mL de H₂O + 9mL citrato 0.1M pH 1.8+ 41mL Na citrato 0.1M pH8.8)
 - a. Aquecer a solução durante 3 minutos a 700 W sem lâminas
 - b. Incubar durante 5 minutos x 3 a 700W
 - c. Após as três lavagens, as lâminas devem ser arrefecidas à temperatura ambiental durante cerca de 20-30 minutos.
5. Lavar em PBS (2x5 minutos)
6. Retirar o excesso
7. Distribuir 200µl da solução de bloqueio por cada lâmina.
8. Incubar durante 1 hora em câmara húmida.
9. Escorrer as lâminas, uma a uma, para eliminar o excesso da solução de bloqueio.
10. Distribuir 100µl/lâmina e cobrir com lamela.
11. Incubar a 4°C, em câmara húmida, overnight.
12. Lava rem PBS (4x10 minutos)
13. Escorrer as lâminas, uma a uma, no final da última lavagem.

14. Distribuir 100µl/lâmina e cobrir com lamela.
15. Incubar à temperatura ambiente, em câmara húmida, durante 1 hora.
16. Lavar em PBS (2x10 minutos)
17. Incubar no cromogénio DAB durante 5 minutos.
18. Lavar em água destilada (2x 10 minutos)
19. Retirar o excesso
20. Fazer coloração com hematoxilina de Mayers durante 10 segundos.
21. Lavar em água corrente para remover o excesso de corante
22. Desidratar em concentrações crescentes de álcool:
 - a. Álcool 95% (2 minutos)
 - b. Álcool 100% (2 minutos)
 - c. Xilol (5 minutos)
 - d. Xilol (5 minutos)
23. Montar em Etellan®