



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67, p53, p63 E  
LAMININA EM CERATOCISTO ODONTOGÊNICO:  
ASSOCIAÇÃO A ASPECTOS CLÍNICOS  
E IMAGINOLÓGICOS**

**CLARISSA ARAÚJO SILVA GURGEL**

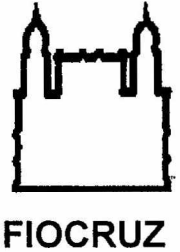


002146

**Salvador - Bahia - Brasil  
2006**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONCALO MONIZ



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

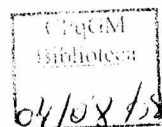
IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67, p53, p63 E  
LAMININA EM CERATOCISTO ODONTOGÊNICO:  
ASSOCIAÇÃO A ASPECTOS CLÍNICOS E IMAGINOLÓGICOS.

MESTRANDA: CLARISSA ARAÚJO SILVA GURGEL  
ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO A. G. RAMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia (UFBA/FIOCRUZ) como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador-Bahia-Brasil

2006





Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G978i Gurgel, Clarissa Araújo Silva  
Imunodeteção das proteínas Ki-67, p53, p63 e laminina em ceratocisto odontogênico: associação a aspectos clínicos e imaginológicos [manuscrito] / Clarissa Araújo Silva Gurgel. - 2006.  
118 f. : il. ; 30 cm.  
  
Datilografado (fotocópia).  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo A. G. Ramos. Laboratório de Histopatológico.  
  
1. Ceratocisto odontogênico. 2. Imunohistoquímica. 3. Proliferação celular. 4. Matriz extracelular. I. Título.

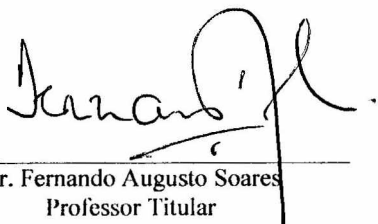
CDU 616.31-003.4:577.27

“IMUNODETECCÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67, p53 ,p63 E LAMININA EM CERATOCISTO ODONTOGÊNICO :  
ASSOCIAÇÃO À ASPECTOS CLÍNICOS E IMAGINOLÓGICOS”

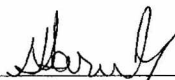
CLARISSA ARAÚJO SILVA GURGEL

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fernando Augusto Soares  
Professor Titular  
USP



Dra. Viviane Almeida Sarmento  
Professora Adjunta  
UFBA



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ

Eu sei, se aqui cheguei, se conquistei o que eu queria  
Cheguei porque teimei, porque apostei na travessia  
Não fiz tudo o que quis, mas sou feliz, não fui perfeita  
Mesmo se errei, procurei fazer direito

Andei, corri e voei  
Voltei, recomecei, replanejei, achei meu rumo  
Não fiz tudo o que eu quis, mas sou feliz, não fui perfeita  
Mesmo se errei, procurei fazer direito

(Autor desconhecido, modificado)

# *Dedicatória*

## **Aos meus pais,**

Instrumentos do Pai maior, por me guiarem no caminho do bem,  
honestidade e respeito.

## **Aos meus irmãos,**

Alicerces de minha vida.

## **Ao meu amor,**

Pela paciência, incansável compreensão, companheirismo e  
amor constantes.

## **Ao meu Luquinhas e minha Malu,**

A inocência de vocês dois desperta meu amor maternal.

## **Ao meu Avô Cardoso (*in memoriam*),**

Pelo dom da busca incansável pelo conhecimento e docência.

## **A minha família,**

Pelo constante incentivo, confiança e compreensão da minha ausência em  
tantos momentos importantes.

# *Agradecimentos Especiais*

**Ao meu orientador, Dr. Eduardo A G Ramos,**

Um exemplo ímpar de professor, pesquisador e ser humano. Agradeço por todo incentivo e confiança. Seus ensinamentos foram além da ciência e com ele aprendi o valor da dedicação, trabalho e humildade.

**Ao Dr. Jean Nunes dos Santos,**

Pelo despertar da minha vocação na vida científica e acadêmica, especialmente na Patologia, minha eterna gratidão. Obrigada pela confiança e incentivo.

**À Dra. Viviane Almeida Sarmiento,**

Uma grande amiga, pelo exemplo de honestidade, ser humano, profissionalismo, ética e, mas que tudo, por compartilhar comigo todas as emoções de uma aprendiz cheia de angústias e anseios.

# *Agradecimentos*

## **À Veronica Sousa Fernandes,**

Minha amiga-irmã, pela amizade verdadeira que alicerça a minha vida, em cada passo.

## **A Dra Aldina Barral,**

Pela competência na coordenação da Pós-graduação em Patologia, incetivo e carinho.

## **Ao Dr. Antônio Luiz R. de Freitas,**

Pelas valiosas contribuições para a minha formação acadêmica.

## **Aos Professores do Mestrado,**

Especialmente **Dra. Marilda Gonçalves, Dr. Edson Moreira, Dr Mitermayer Reis, Dra. Fabíola Cardilho, Dra. Cláudia Brodskyn e Dra. Sônia Andrade** pela dedicação a este centro de pesquisas e à pós-graduação em Patologia.

## **Ao Dr. Zilton Andrade,**

Maior expressão da ciência em nosso estado. Obrigada pelo carinho com que sempre me recebeu.

## **Aos Meus Amigos,**

Em especial Loma, Kerol, Line, Adna, Rhyna e Mile, pela compreensão em meus momentos de grandes inquietações e acreditarem em meus objetivos de vida. A amizade sincera supera obstáculos, distâncias e a cada reencontro renova-se o sentimento de um amor fraternal eterno.

## **Aos meus alunos,**

Fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Cada um de vocês é especialmente responsável pelo meu AMOR à docência.



**Aos Amigos do Mestrado,**

Especialmente Marinho, Fred, Maria José, Ridalva, Balbino, Wendell, Bruno e Carlos que, assim como eu, acreditam na ciência como uma das formas de transformação social.

**À toda equipe da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da UFBA,**

Em especial ao Prof. Roberto Azevedo e Dr. Bráulio Carneiro pela imensa contribuição na obtenção dos casos, acompanhamento dos pacientes e participação nos ambulatórios e centro cirúrgico. Aos residentes da equipe, em especial Ana Flora, Tayguara, Joaquim, André, Fátima, Lilibeth e Antônio Cabral, amigos para toda a vida.

**Aos Professores da Faculdade de Odontologia da UFBA,**

Especialmente Prof. Falcão, Prof<sup>a</sup> Isabel Viana, Prof. André Freitas, Prof<sup>a</sup> Paula Mathias, Prof<sup>a</sup> Iêda Rebello, Prof. Guilherme Meyer, Prof. Antístenes Albernaz, Prof<sup>a</sup> Mônica Franca, Prof<sup>a</sup> Luciana Ramalho e Prof<sup>a</sup>. Sílvia Reis que contribuíram imensamente na minha formação profissional.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

**Cora Carolina**

**À Ana Carvalho,**

Não só pelo carinho com o qual me acolheu no laboratório e me ensinou TUDO, mas principalmente pela amizade e exemplo de mulher decidida, honesta e sensível.

**À Cristina Mota,**

Exemplo de dedicação e perfeccionismo.

**À toda a equipe da Unidade de Histopatologia,**

Em especial Anna Clara pela ajuda constante em todas as etapas experimentais deste trabalho.

**Aos bolsistas de Iniciação Científica,**

Leonardo e Thiago pela imensa ajuda nas etapas de construção deste e outros trabalhos.

**Ao Prof. Urbino Tunes,**

Pela confiança e incentivo a docência.

**À Coordenação de Ensino,**

Dona Rosália, Taíse e Rosângela, pelo carinho constante. Vocês são uns amores.

**Ao CNPq,**

Pelo apoio financeiro durante a realização do mestrado.

**Ao CPqGM,**

Por contribuir para o avanço científico e formação de recursos humanos capacitados e comprometidos com a evolução científica do nosso país.

**A Hugo,**

Pela presteza e competência na organização das imagens histopatológicas.

**À Nancy, Miriam e Lurdes,**

Pessoas fundamentais no processamento e disponibilização do material histológico do SEPAC e FOUFBA.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE QUADROS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Ceratocisto Odontogênico: Considerações Gerais	24
2.2 Proliferação celular	31
2.3 Marcadores de proliferação celular	33
2.3.1 Ki-67	33
2.3.2 p53	35
2.3.3 p63	37
2.4 Matriz Extracelular: considerações gerais	42
2.4.1 Laminina	44
3 PROPOSIÇÃO	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 População e Amostra	47
4.2 Considerações Éticas	47
4.3 Técnica Imuno-Histoquímica	47
4.3.1 Tratamento das Lâminas (Silanização)	47
4.3.2 Protocolo Imuno-Histoquímico	48
4.4 Análise dos Dados	51
4.4.1 Análise Clínico-Epidemiológica e Imaginológica	51
4.4.2 Análise Morfológica	52
4.4.3 Análise Imuno-Histoquímica	53
4.4.4 Correlação entre aspectos clínicos, imaginológicos, morfológicos e imuno-histoquímicos	54
4.5 Análise Estatística	54
5 RESULTADOS	56
5.1 Perfil Epidemiológico	56
5.2 Aspectos clínicos, imaginológicos e de tratamento	57
5.3 Análise Morfológica	62
5.4 Análise Imuno-Histoquímica	65
5.5 Associação entre os marcadores de proliferação celular	74
5.6 Associação histomorfológica e imuno-histoquímica	74
5.7 Associações clínica, imaginológica e imuno-histoquímica	77
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	110
ANEXOS	

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

4A4: clone do anticorpo anti-p63.

°C: unidade de medida de temperatura graus Celsius.

CEC: Carcinoma escamocelular.

CO: Ceratocisto odontogênico.

CO.: do inglês, "Company", traduzido como Companhia.

COs: Ceratocistos odontogênicos.

Cód: Código.

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

$\Delta$ Np63: Formas não transativadas da proteína p63.

DAB: diaminobenzidina.

DMBA: 7, 12 dimetilbenzatraceno.

DNA: do inglês "*desoxyribonucleic acid*", traduzido como ácido desoxirribonucléico.

DO-7: clone do anticorpo anti-p53.

DP: Desvio padrão

DPI: *dots per inch*", traduzido como pontos por polegada.

FOUFBA: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

G0: do inglês "*gap*", traduzido como intervalo. Fase de latência celular.

G1: do inglês "*gap*", traduzido como intervalo. Fase após a mitose a antes a síntese do DNA.

G2: do inglês "*gap*", traduzido como intervalo. Fase síntese de DNA e antes da mitose.

HCl: ácido clorídrico.

H&E: hematoxilina e eosina.

HRP: do inglês, "*Horse Raddish Peroxidase*".

kD: quilodaltons.

Ki-67: refere-se ao antígeno Ki-67 ou anticorpo de mesmo nome.

KIS5: clone do anticorpo anti-Ki-67.

M: fase mitótica do ciclo celular.

MB: refere-se a membrana basal.

MCT/CNPq: Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Mdm2: do inglês, "*murine double minutes 2*", refere-se a proteína ou gene do mesmo nome.

ME: Matriz Extracelular.

MIB 1: clone do anticorpo anti-Ki-67.

MIB 2: clone do anticorpo anti-Ki-67.

MIB 3: clone do anticorpo anti-Ki-67.

Min: unidade de medida de tempo minutos.

mL: unidade de medida de volume mililitros.

mol/L: mol por litro.

n: número de indivíduos

NORs: Regiões Organizadoras de Nucléolos.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

%: unidade de valor percentual.

p: propabilidade ou variabilidade amostral.

p16: proteína quinase associada ao ciclo celular.

p21: proteína quinase associada ao ciclo celular.

p53: refere-se ao gene supressor de tumor p53 ou proteína de mesmo nome.

p63: refere-se ao gene p63 ou proteína de mesmo nome.

PA: Pró-análise.

PBS: do inglês, "*Phosphated buffered solution*", traduzido como solução salina fosfatada.

PCNA: do inglês, "*Proliferating cell nuclear antigen*", traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular.

pH: potencial de hidrogênio iônico.

*PTCH*: refere-se ao gene supressor de tumor "*Patched*"

RNA: do inglês, "*ribonucleic acid*", traduzido como ácido ribonucléico.

S: fase se síntede do DNA

SCBCN: Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide.

SEPAC: Serviço de Anatomia Patológica e Análises Clínicas.

Shh: refere-se a via de sinalização "*Sonic Hedgehog*".

TAp63: refere-se as formas transativadas da proteína p63.

TP: do inglês, "Tumor Potein".

TRIS: Tris-hidroximetil-aminometano.

USA: do ingles, "*United States of America*", traduzido com Estados Unidos da América.

µm: unidade de medida de comprimento micrometro.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição dos pacientes por faixa etária. Salvador, Bahia, 2006. 57
- Figura 2. Manifestações clínicas observadas nos pacientes com diagnóstico de CO. Salvador, Bahia, 2006. 57
- Figura 3. Aspectos imaginológicos exibidos pelo CO. (A) e (B) Áreas radiolúcidas uniloculares em ramo e corpo mandibulares, à esquerda, respectivamente. (C) extensa área radiolúcida multilocular e multilobular envolvendo o corpo, ramo e processo coronóide da mandíbula, à direita, associada a unidade dentária não irrompida, (D) Área radiolúcida multilocular envolvendo a sínfise e parasínfise, bilateralmente, reabsorvendo raízes dos dentes envolvidos. (E) Múltiplas áreas radiolúcidas uniloculares envolvendo ossos gnáticos de paciente sindrômico. (F) Áreas radiolúcidas multiloculares reabsorvendo e deslocando raízes de unidades dentárias irrompidas. Salvador, Bahia, 2006. 61
- Figura 4. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) Lesão cística exibindo epitélio de revestimento atrófico, cápsula pouco densa e ausência de inflamação (H/E, 40x); (B) Epitélio cístico de superfície corrugada e placa de acantose (seta), (H/E, 40x); (C) Epitélio cístico exibindo placas de acantose (H/E, 100x); (D), (E) e (F) Células basais dispostas em paliçada e algumas células suprabasais exibindo edema intracelular, em áreas de desprendimento epitelial ((D), H/E, 100x; (E) e (F), H/E, 200x ) Salvador, Bahia, 2006. 81
- Figura 5. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) e (B) Epitélio de revestimento cístico exibindo proliferação de células basais “em broto” (H/E, 100x); (C), (D), (E) e (F) Cistos satélites na cápsula da lesão ((C) e (D) H/E 40x; (E) e (F) H/E, 100x). Salvador, Bahia, 2006. 82
- Figura 6. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) e (B) Ausência de processo inflamatório na cápsula cística (H/E, 400x e 200x, respectivamente); (C) Infiltrado inflamatório discreto, mononuclear e áreas de hiperemia e hemorragia (H/E, 100x); (D) Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e discreto na cápsula cística (H/E, 200x); (E) Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e intenso na cápsula cística (H/E, 200x); (F) Células escamosas exibindo discretas atipias de significado indeterminado (H/E, 400x). Salvador, Bahia, 2006. 83
- Figura 7. Aspectos histomorfológicos do CO. (A), (B), (C) e (D) Membrana basal PAS positiva ligada ao epitélio cístico em áreas de desprendimento epitelial (PAS, 200x, 400x, 200x e 200x, respectivamente). Salvador, Bahia, 2006. 84

- Figura 8. Imunomarcção para o anticorpo anti-Ki-67. (A) Epitélio cístico exibindo menos de 5% de células marcadas (HRP EnVision™, 400x). (B), (C) e (D) Epitélio cístico exibindo, predominantemente, marcação supra-basal e escore +1 (HRP EnVision™, 400x); (E), (F) e (G) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +2 (HRP EnVision™, 400x); (H) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +3 (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006. 85
- Figura 9. Imunomarcção para o anticorpo anti-p53. (A) Epitélio cístico exibindo menos de 5% de células imunomarcadas (HRP EnVision™, 400x). (B) e (C) Epitélio cístico exibindo, predominantemente, marcação supra-basal e escore +1 (HRP EnVision™, 400x); (D) e (E) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +2 (HRP EnVision™, 400x); (F), (G) e (H) Epitélio cístico exibindo escore de marcação +3 (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006. Salvador, Bahia, 2006. 86
- Figura 10. Imunomarcção para o anticorpo anti-p63. (A) até (H) Epitélios císticos exibindo escore +3. (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006. 87
- Figura 11. Imunomarcção para o anticorpo anti- Laminina. (A) MB exibindo marcação contínua e intensa (HRP EnVision™, 200x); (B) MB exibindo marcação moderada e contínua (HRP EnVision™, 200x); (C) e (D) MB exibindo marcação discreta e contínua (HRP EnVision™, 400x); (E) MB ligada ao epitélio de revestimento cístico, exibindo marcação intensa e contínua em área de desprendimento epitelial (HRP EnVision™, 400x); (F) MB exibindo marcação discreta e contínua, circundando os “brotos” epiteliais (HRP EnVision™, 200x). Salvador, Bahia, 2006. 88
- Figura 12. Imunomarcção para o anticorpo anti- Laminina. (A) e (B) MB exibindo marcação intensa e contínua em áreas de acantose (HRP EnVision™, 200x); (C) e (D) MB exibindo discreta descontinuidade em áreas de acantose (HRP EnVision™, 200x); (E) e (F) MB exibindo esmaecimento de imunomarcção em áreas de intenso infiltrado inflamatório (HRP EnVision™, 200x e 400x, respectivamente). Salvador, Bahia, 2006. 89
- Figura 13. Box-Plot. Comparação da imunoexpressão do Ki-67, segundo a intensidade do processo inflamatório. Salvador, Bahia, 2006. 75
- Figura 14. Box-Plot. Diferença na imunomarcção para o Ki-67 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006. 78
- Figura 15. Box-Plot. Diferença na imunomarcção para o p53 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006. 78
- Figura 16 Box-Plot. Diferença na imunomarcção para o p63 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006. 79

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Anticorpos primários. Salvador, Bahia, 2006.	50
Tabela 2. Localização anatômica dos COs. Salvador, Bahia, 2006.	59
Tabela 3. Padrões imaginológicos das lesões de CO. Salvador, Bahia, 2006.	60
Tabela 4. Principais características histomorológicas das lesões de CO. Salvador, Bahia, 2006.	63
Tabela 5. Correlação entre aspectos imaginológicos e histomorfológicos. Salvador, Bahia, 2006.	65
Tabela 6. Distribuição do número de lesões marcadas para o Ki-67, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.	66
Tabela 7. Ki-67. Diferença entre a imunomarcação basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006.	66
Tabela 8. Ki-67. Diferença entre a imunomarcação de COs associados à SCBCN e COs esporádicos. Salvador, Bahia, 2006.	67
Tabela 9. Ki-67. Diferença entre a imunomarcação de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.	67
Tabela 10. Ki-67. Médias de imunomarcação entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006.	68
Tabela 11. Distribuição do número de lesões marcadas para a proteína p53, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.	69
Tabela 12. p53. Diferença entre a imunomarcação basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006	69
Tabela 13. p53. Diferença entre a imunomarcação de COs associados à SCBCN e COs esporádicos. Salvador, Bahia, 2006	70
Tabela 14. p53. Diferença entre a imunomarcação de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.	70
Tabela 15. p53. Médias de imunomarcação entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006	71
Tabela 16. Distribuição do número de lesões marcadas para a proteína p63, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.	71

Tabela 17. p63. Diferença entre a imunomarcção basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006	72
Tabela 18. p63. Diferença entre a imunomarcção de COs associados à SCBCN e COs esporádicos. Salvador, Bahia, 2006	72
Tabela 19. p63. Diferença entre a imunomarcção de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.	73
Tabela 20. p63. Médias de imunomarcção entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006	73
Tabela 21. Ki-67. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.	76
Tabela 22. p53. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.	76
Tabela 23. p63. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.	76
Tabela 24. Ki-67. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.	79
Tabela 25. p53. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.	80
Tabela 26. p63. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.	80

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1. Escores médios da imunomarcção pelo Ki-67. Salvador, Bahia, Anexo 2006.

Quadro 2. Escores médios da imunomarcção para a proteína p53. Salvador, Anexo Bahia, 2006.

Quadro 3. Escores médios da imunomarcção para a proteína p63. Salvador, Anexo Bahia, 2006.

## RESUMO

O Ceratocisto Odontogênico (CO) é uma patologia distinta do complexo estomatognático, especialmente pelo comportamento clínico agressivo, com uma alta taxa de recidiva, comprometimento de estruturas anatômicas nobres, crescimento infiltrativo e características biológicas distintas dos demais cistos odontogênicos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de proliferação celular, Ki-67, p53 e p63 e de matriz extracelular, laminina, em COs, bem como associá-los a aspectos clínicos e imaginológicos, na tentativa de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos no comportamento biológico desta patologia. Trinta e sete COs de trinta pacientes foram submetidos a técnica imuno-histoquímica para os anticorpos supracitados, utilizando o sistema EnVision™. Os resultados clínicos, imaginológicos, histomorfológicos e imuno-histoquímicos foram compilados e associados estatisticamente. A faixa etária de dez a vinte anos (33,3%) e melanodermas (60%) compuseram a maior parte desta amostra e a região posterior da mandíbula foi a mais acometida (83,8%). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de cistos satélites e padrão imaginológico multilocular ( $p= 0,0167$ ), distorção do canal mandibular ( $p= 0,0243$ ) e recidivas ( $p= 0,0033$ ). Para os anticorpos Ki-67 e p53, as células imunomarcadas localizavam-se predominantemente nas camadas supra-basais, enquanto a proteína p63 distribuía-se por todo o epitélio de revestimento cístico. Ao mesmo tempo, não se observou diferença na marcação para estas proteínas, entre lesões primárias e recorrentes (Ki-67,  $p= 0,5591$ ; p53,  $p= 0,9847$ ; p63,  $p= 0,9127$ ) e aquelas associadas a SCBCN (Ki-67,  $p= 0,7013$ ; p53,  $p= 0,3197$ ; p63,  $p= 0,2427$ ). A expressão da laminina foi predominantemente contínua ( $n=18$ ) e intensa ( $n=12$ ), inclusive em áreas de desprendimento epitelial e acantose. Em áreas de inflamação, observou-se o esmaecimento desta imunomarcagem e uma maior expressão do Ki-67 ( $p < 0,05$ ), sem afetar a expressão das proteínas p53 e p63. Estes resultados corroboram com a hipótese da existência de um compartimento proliferativo supra-basal no epitélio do CO, o qual pode contribuir para comportamentos biológico e clínico mais agressivos para esta patologia. Ao mesmo tempo, sugerem a necessidade de mais investigações que abordem as interações entre os componentes da matriz extracelular e ceratinócitos, além de estudos prospectivos que possibilitem associar os achados clínicos e imuno-histoquímicos, na tentativa de estabelecer marcadores de prognóstico para esta patologia.

**Palavras-Chaves:** Ceratocisto Odontogênico, Imuno-histoquímica, Proliferação celular, Matriz extracelular.



## ABSTRACT

Odontogenic Keratocyst (OK) represents a distinct lesion of the jaws, especially due to the aggressive clinical behaviour, and high recurrences rates. These features make it distinguishable from other odontogenic cysts. The aim of this study was to analyse the proliferation markers such as Ki-67, p53 and p63 and laminin in attempt to evaluate the biological behavior of OK as well as associating them with clinical and images features. Using immunohistochemical technique with EnVision™, thirty and seven cases of COs were studied. Clinical, images, histomorphological and immunohistochemical data were compiled and submitted to statistical analysis. Our results showed that black young adults preponderated in the most of the sample and the body-angle-ramus area of mandible was the most common site of occurrence. A statistically significant association was observed between microkeratocysts, multilocular lesions ( $p= 0, 0167$ ), distortion of mandibular canal ( $p= 0,0243$ ) and recurrences ( $p= 0,0033$ ). Positive cells ratio for ki-67 and p53 was more evident in the parabasal epithelial cells and p63 protein distribution involved all epithelial layers. The lesions immunolabeled for Ki-67, p53 and p63 proteins did not show a statistically significant difference between primary and recurrent OK (Ki-67,  $p= 0,5591$ ; p53,  $p= 0,9847$ ; p63,  $p= 0,9127$ ). Similarly, this was detected when these lesions were associated to basal cell naevus syndrome (Ki-67,  $p= 0,7013$ ; p53,  $p= 0,3197$ ; p63,  $p= 0,2427$ ). Laminin was predominantly continuous ( $n=18$ ) and intense ( $n=12$ ), including those areas that exhibited disruption of the epithelium and acanthosis. A statistically significant increase of Ki-67 positive cells ( $p < 0,05$ ) was observed in inflamed OK, without affecting the p53 and p63 expression. Our results suggest that Ki-67, p53 and p63 expression reflects a proliferative cellular activity in epithelium lining of OK, contributing for a more aggressive biological behaviour of it. In addition, other prospectives studies are useful to associate the clinical and imunohistochemical features in attempt to establish prognostic markers for this entity.

**Key Words:** Odontogenic Keratocyst, Immunohistochemistry, Celular Proliferation, Extracellular Matrix.

## 1 INTRODUÇÃO

O Ceratocisto Odontogênico (CO) é uma lesão que acomete os ossos gnáticos, especialmente de adultos jovens, sendo o seu comportamento biológico distinto dos demais cistos de natureza odontogênica. Classicamente, esta patologia é considerada uma alteração de desenvolvimento, associada a remanescentes da lâmina dentária embrionária (LENCH et al., 1996; KOLAR et al., 2006), entretanto, o comportamento clínico agressivo, com uma alta taxa de recidiva, comprometimento de estruturas anatômicas nobres, crescimento infiltrativo e características moleculares distintas têm sugerido uma natureza neoplásica para esta patologia.

Mutações no gene supressor de tumor *PTCH*, identificada inicialmente, em pacientes portadores da Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBCN) e, mais recentemente, em casos de COs esporádicos, corroboram para a hipótese neoplásica desta lesão. Os COs de portadores da SCBCN desenvolvem-se a partir de células precursoras com mutações hereditárias, enquanto nos casos considerados esporádicos, dois eventos mutacionais, em células susceptíveis, parecem ser necessários (BARRETO et al., 2000; BARRETO et al., 2002; SHEAR, 2002b).

Apesar de aspectos imaginológicos diversos, a radiolucência unilocular, de margens definidas, especialmente em região posterior de mandíbula é a apresentação mais comum (STOELINGA, 2001). Histomorfologicamente, o CO assume características peculiares, tais como um epitélio de revestimento atrófico, cápsula cística pouco densa, além de cistos satélites e áreas de desprendimento epitelial.

Molecularmente, a mutação no *PTCH* provoca um mau funcionamento na via de sinalização *Sonic Hedgehog* (Shh), resultando em proliferação celular. Dessa forma, o potencial proliferativo do epitélio de revestimento

cístico constitui uma propriedade peculiar do CO, sendo estudado, isoladamente, por grupos de pesquisa do mundo inteiro, na tentativa de correlacionar esta propriedade com o aspectos clínicos do CO e melhor entender seu comportamento biológico.

Dessa forma, marcadores imuno-histoquímicos, como o Ki-67 e p53, envolvidos na proliferação celular, têm sido utilizados por alguns autores, entretanto, poucos correlacionam a expressão destas proteínas com parâmetros clínicos e imaginológicos.

A expressão do gene p63 é pouco conhecido nesta patologia, sendo que esta proteína tem se destacado como uma molécula essencial nos processos de desenvolvimento do epitélio estratificado, bem como um marcador de proliferação celular, especialmente por funcionar como um fator de transcrição, ativando genes envolvidos na proliferação de ceratinócitos e processos neoplásicos. Dessa forma, a utilização deste marcador em CO, representa uma estratégia que pode ajudar a entender alguns mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do CO.

A membrana basal (MB) tem uma composição molecular diversa, sendo a laminina o constituinte mais abundante (EKBLÖM, LONAI, TALTS, 2003). Esta glicoproteína relaciona-se, estruturalmente, com os demais componentes da MB, como integrinas e colágeno IV, formando redes intimamente relacionadas, as quais garantem a união das células epiteliais aos substratos do tecido conjuntivo, além de participar de eventos celulares importantes, como a proliferação (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004).

Histomorfologicamente, áreas de desprendimento do epitélio cístico são frequentemente observadas nesta patologia. Apesar do conhecimento que as interações entre células, e destas com a matriz extracelular (ME), especialmente MB, são essenciais para o desenvolvimento, regulação celular (proliferação, diferenciação, migração e apoptose) e manutenção da

arquitetura normal do tecido (BRENNAM et al., 2004), poucos estudos avaliam o comportamento de componentes da MB, em CO.

Assim, o objetivo principal do presente trabalho é contribuir para os estudos sobre o comportamento biológico do CO, através da utilização de marcadores de proliferação celular (Ki-67, p53 e p63), de ME (Laminina), bem como correlacionar os achados imuno-histoquímicos com aspectos clínicos, imaginológicos e histomorfológicos,.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ceratocisto Odontogênico: Considerações gerais

O CO constitui uma lesão cística localmente agressiva, com elevado índice de recorrência e um padrão distinto de crescimento, sugerindo, atualmente, tratar-se de uma neoplasia benigna (SHEAR, 2002a; SHEAR, 2002b; SHEAR 2002c; AGARAM et al., 2004; SARAÇOGLU et al., 2005). Uma origem neoplásica para esta entidade patológica poderia explicar o elevado índice de recorrência e a associação com a SCBCN (AGARAM et al., 2004).

Philipsen (2005), na última versão da classificação dos tumores de cabeça e pescoço da OMS, define o CO como um tumor intraósseo de origem odontogênica, uni ou multicístico, solitário ou múltiplo, cujo epitélio escamoso estratificado apresenta-se paraqueratinizado. Este autor sugere que os termos “Tumor Odontogênico Queratocístico” ou “Queratocistoma Odontogênico” sejam utilizados para esta lesão. Entretanto, diversos pesquisadores continuam publicando trabalhos utilizando como terminologia CO, especialmente pela necessidade de estudos mais específicos que comprovem a natureza neoplásica desta patologia.

Acredita-se que o desenvolvimento do CO ocorra a partir da proliferação de remanescentes epiteliais da lâmina dentária (LENCH et al., 1996; KOLAR et al., 2006). A análise de epitélios de revestimento removidos em cirurgias de CO demonstrou a presença de múltiplos microcistos próximos à camada basal da mucosa, sugerindo também um possível envolvimento deste epitélio na etiologia da lesão (STOELINGA, 2001; AULUCK, PAI, 2005), especialmente nos casos de recidiva (AULUCK, PAI, 2005).

Para Shear (2002b), até mesmo COs esporádicos, poderiam derivar de células susceptíveis com mutações somáticas, contribuindo para a hipótese

desta patologia ser uma neoplasia benigna. Lench et al. (1996) citaram que a Teoria de Knudson respalda o comportamento clínico e biológico do CO, ou seja, em pacientes sindrômicos, com mutação em um gene envolvido na tumorigênese, apenas um evento mutacional é suficiente para o desenvolvimento da lesão, enquanto dois eventos mutacionais, em células somáticas, são requeridos para COs esporádicos.

Barreto et al. (2002), entretanto, demonstraram que mesmo em COs cuja mutação no *PTCH* foi encontrada, ainda existia a imunomarcagem para o anticorpo anti-PTCH, sugerindo que a perda de apenas um alelo pode ser suficiente na etiopatogenia desta patologia.

A perda clonal de alelos em genes supressores de tumor constitui um evento característico em neoplasias. Lench et al. (1996) estudaram marcadores do cromossomo 9q22.3-q31 (D9S 196, 287, 180, 176 127 e aldolase B2) em pacientes com COs esporádicos e associado a SCBCN e verificaram a perda da heterozigotidade neste cromossomo, para ambos os grupos, sugerindo a participação de um gene supressor de tumor na etiopatogenia das lesões.

A heterozigotidade em outros genes supressores de tumor (p53, p16, PTCH, e MCC) foi abordada por Agaram et al. (2004). Dos dez casos de CO estudados por estes autores, sete apresentaram perda de heterozigotidade para os genes estudados, corroborando para a hipótese neoplásica desta lesão.

Recentemente, Henley et al. (2005) examinaram cinco regiões cromossômicas diferentes, 3p14, 9p21, 11q23, 13q.12.1 e 17p13, envolvidas na etiopatogenia do carcinoma epidermóide de boca. Dos quinze casos de CO estudados, doze demonstraram alteração em pelo menos uma destas regiões, sendo a maior perda de alelos registrada na região 13q12.1, a qual codifica o gene supressor de tumor LATS2.



Segundo Giuliani et al. (2006), o CO corresponde entre 12 e 14% de todos os cistos odontogênicos. Oda et al. (2000), em um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos, analisaram quatrocentos e trinta casos de CO e encontraram a quarta, segunda e quinta décadas de vida, as faixas etárias de maior prevalência, nesta ordem.

Segundo Philipsen (2005), a idade média de pacientes com múltiplos ceratocistos, associados ou não a SCBCN, é menor quando comparada aos indivíduos acometidos por uma única lesão. Em relação ao sexo, há uma discreta predileção para o masculino (ODA et al., 2000; PHILIPSEN, 2005; GIULIANI et al., 2006).

Philipsen (2005) considera a agressividade local, a elevada taxa de recorrência e a tendência à multiplicidade, as características clínicas mais importantes nesta entidade patológica, especialmente quando associadas a SCBCN.

Apesar da considerável predileção pela região de terceiros molares inferiores e ramo mandibular, a ocorrência de CO em diferentes regiões dentadas da maxila e mandíbula não é incomum, sendo que muitas vezes esta patologia assemelha-se a outras lesões odontogênicas (STOELINGA, 2001), como o cisto dentífero e ameloblastoma (GIULIANI et al., 2006).

Aspectos clínicos secundários tais como dor, presença de exsudato, aumento de volume e envolvimento de estruturas anatômicas adjacentes, como nervos e músculos, são consideradas incomuns por Philipsen (2005). O aumento de volume, presente apenas em alguns indivíduos, resulta do abaulamento causado pela pressão cística, uma vez que não há expansão por aposição óssea em CO (STOELINGA, 2001).

Do ponto de vista clínico e biológico, a associação de múltiplos COs com a SCBCN, tem contribuído para estudos que ressaltam as

peculiaridades do comportamento biológico de COs, especialmente para a hipótese desta lesão tratar-se de um processo neoplásico.

Anormalidades no desenvolvimento esquelético, calcificações ectópicas, múltiplos COs em maxilares e predisposição ao desenvolvimento de carcinomas basocelulares nevóides, são características peculiares da SCBCN (LENCH et al., 1996; BOUTET et al., 2003; PASTORINO et al., 2005). Macrocefalia, malformações congênitas, fibroma ovariano e meduloblastoma representam outros achados clínicos menos freqüentes nos pacientes com esta síndrome (PASTORINO et al., 2005).

Geneticamente, a SCBCN constitui uma doença autossômica dominante, com penetrância completa e expressividade variável (BARRETO et al., 2002; BOUTET et al., 2003), sendo que mutações no gene *PTCH* (supressor de tumor), mapeado no cromossomo 9q22.3-q31 (FARNDON et al., 1992), são responsáveis pelo fenótipo dos pacientes portadores da síndrome (BARRETO et al., 2002; SHEAR, 2002b; BOUTET et al., 2003).

O gene *PTCH* codifica uma proteína transmembrânica que, entre outras funções, controla a nutrição e crescimento de diversos tecidos humanos (BARRETO et al., 2000) e funciona como um receptor transmembrânico envolvido na via de sinalização Shh, a qual está diretamente envolvida com o desenvolvimento dentário (HARDCASTLE et al., 1999; COURBONE et al., 2004) e processos neoplásicos de origem odontogênica, como o Ameloblastomas, Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, Tumor Odontogênico Adenomatóide, Mixoma, Fibroma Odontogênico e Cisto Odontogênico Calcificante, conforme sugerido por Heikinheimo et al. (2002), em um estudo molecular utilizando microarranjos de DNA.

Pacientes que manifestam várias recorrências da lesão, mesmo na ausência de outros aspectos peculiares da SCBCN, devem ser investigados

para a mesma, uma vez que estes podem estar expressando uma forma mais branda desta síndrome (AULUCK, PAI, 2003; SHEAR, 2003).

Radiograficamente é possível observar múltiplas radiolucências envolvendo ou não unidades dentárias, nos maxilares dos portadores da SCBCN. Outros padrões imaginológicos em CO, esporádicos ou associados a síndrome, incluem radiolucência uni ou multilocular, com bordas escleróticas uniformes ou multilobuladas, envolvendo ou não dentes, freqüentemente em região posterior e ramo de mandíbula, já que esta constitui a região de maior ocorrência do CO (LENCH et al., 1996; ODA et al., 2000; STOELINGA, 2001; GIULIANI et al., 2006).

Em geral, lesões extensas que acometem mais de um sítio anatômico, são mais destrutivas e colaboram para uma sintomatologia clínica mais exuberante (MORGAN et al., 2005).

Histologicamente, esta patologia caracteriza-se por um epitélio escamoso estratificado paraqueratinizado, atrófico (entre cinco a oito camadas), sendo que as células basais, colunares ou cuboidais, freqüentemente dispõem-se em paliçada e seus núcleos mostram-se intensamente basofílicos e polarizados (LENCH et al., 1996; SHEAR, 2002a; PHILIPSEN, 2005). Em algumas áreas, observa-se o epitélio cístico desprendendo-se da cápsula delgada que o envolve (ODA et al., 2000; KOLAR et al., 2006).

Figuras mitóticas nas camadas supra-basais, displasia epitelial, cistos satélites na cápsula (PHILIPSEN, 2005) e na mucosa de revestimento (STOELINGA, 2001) o que, segundo Agaram et al. (2004), poderiam sugerir uma possível invasão local da lesão, representam outros achados histomorfológicos importantes.

A presença de inflamação não é incomum e pode ser atribuída a comunicações com a mucosa bucal através da perfuração da cortical óssea

ou da comunicação com o ligamento periodontal (KAPLAN, HIRSHBERG, 2004). O processo inflamatório colabora para uma perda das características celulares e estruturais do epitélio de revestimento cístico (KAPLAN, HIRSHBERG, 2004; PHILIPSEN, 2005; GIULIANI et al., 2006) e parece contribuir para um comportamento clínico menos agressivo (GIULIANI et al., 2006).

A conduta terapêutica do CO permanece em discussão por diversos grupos de pesquisas, especialmente vinculada ao debate sobre a natureza neoplásica desta patologia (GIULIANI et al., 2006).

De modo geral, as modalidades de tratamento para esta condição incluem descompressão, marsupialização, enucleação e ressecção óssea, sendo que estas podem estar associadas a terapias adjuvantes como curetagem mecânica e química, com a utilização de soluções fixadoras como a de Carnoy, além da remoção da mucosa bucal que reveste o sítio anômico acometido pela lesão (EL-HAJJ, ANNEROTH, 1996; GIULIANI et al., 2006), uma vez que microcistos presentes neste epitélio podem contribuir para maiores índices de recorrência (STOELINGA, 2001; AULUCK, PAI, 2003).

A marsupialização e descompressão representam estratégias adotadas para a diminuição de lesões extensas ou que envolvam estruturas nobres, como o nervo mandibular, previamente ao tratamento cirúrgico (POGREL, 2005; GIULIANI et al., 2006; MAURETTE, JORGE, MORAES, 2006). Entretanto, há relatos de resolução clínica e histológica de casos de CO após marsupialização, em um período de sete a dezenove meses (POGREL, JORDAN, 2004).

Dessa forma, a descompressão e marsupialização do cisto, além de preservar estruturas vitais, resultaria em menor morbidade para o paciente (POGREL, 2005; MAURETTE, JORGE, MORAES, 2006), apesar de

contribuir com os maiores índices de recorrência e impossibilitar a análise histopatológica da lesão como um todo, essencial para a avaliação do comportamento biológico da lesão e possíveis áreas de displasia e transformações carcinomatosas (GIULIANI et al., 2006).

A enucleação cirúrgica e curetagem óssea correspondem a principal estratégia terapêutica para os pacientes com CO, especialmente quando a lesão envolve as regiões de sínfise, corpo mandibular e terceiros molares. Lesões em ramo, entretanto, são mais difíceis de serem tratadas desta maneira (GIULIANI et al., 2006). Blanas et al. (2000), em uma ampla revisão da literatura, constataram que a ressecção cirúrgica para lesões extensas contribui com menores índices de recorrências, sendo os comprometimentos funcional e estético críticos para os pacientes submetidos a este tipo de cirurgia (GIULIANI et al., 2006).

A utilização concomitante de terapias adjuvantes, como a crioterapia, resulta em uma diminuição significativa nas recidivas e, ao mesmo tempo, um aumento nos casos de parestesia, a qual, na maioria dos casos, é transitória (POGREL, 2005).

Os estudos moleculares conduzidos em lesões odontogênicas, os quais tem comprovado a participação da via de sinalização Shh na patogênese destas patologias, têm aumentando as perspectivas em relação a utilização de fármacos que possam interferir nesta via de sinalização e, dessa forma, favorecer um melhor prognóstico para os portadores destes tumores (ZHANG et al., 2005).

Uma das estratégias ressaltada por Gomez, Marco (2005) poderá ser a utilização de fármacos com estrutura molecular semelhante a ciclopamina, a qual deriva da planta *Veratrum californicum*. Esta droga inibe a proteína *Smoothened* e, portanto, a transdução de sinal via Shh e a proliferação celular.

## 2.2 Proliferação celular

O índice proliferativo de um determinado tecido é determinado pela fração de crescimento deste, considerando o tempo que as células levam para completar o ciclo celular. Os marcadores de proliferação, como o Ki-67, entretanto, fornecem informações sobre as células em ciclo celular, mas não informam sobre o tempo que estas células levam para finalizar o ciclo celular e, portanto, informam sobre o potencial proliferativo ou fração de crescimento do tecido (BROWN, GATTER, 1990).

O mecanismo de crescimento, bem como a agressividade do CO, constituem fatores de investigação científica por grupos do mundo inteiro (SHEAR, 2002a), especialmente em relação às características proliferativas peculiares do revestimento epitelial (OLIVEIRA et al., 2002; SHEAR, 2002a; SHEAR, 2002b, KIM et al., 2003; THOSAPORN et al., 2004), as quais poderiam contribuir para a agressividade, recorrência (LENCH et al., 1996; KIM et al., 2003; WAHLGREN et al., 2003), expansão (KIM et al., 2003) e crescimento infiltrativo dos COs (SCHARFFETTER et al., 1989).

Dessa forma, muitos marcadores biológicos de proliferação celular, como o Ki-67 e o PCNA têm sido estudados, auxiliando na escolha de terapias apropriadas e preservação (GIULIANI et al., 2006).

O potencial proliferativo do CO é similar a algumas neoplasias odontogênicas benignas, como o Ameloblastoma e, quando comparado a outras lesões císticas, como o Cisto Dentífero, a fração de crescimento tecidual mostra-se significativamente superior (THOSAPORN et al., 2004). Scharffetter et al. (1989), demonstraram, através de autorradiografia e citofotometria de DNA, que a proliferação no epitélio e cápsula desta lesão é irregular, com áreas de intensa e baixa atividade proliferativa, sendo superior ao Cisto Radicular.

A proliferação celular constitui um evento biológico altamente regulado por diversos genes e encontra-se diretamente envolvida em processos neoplásicos. Fatores de crescimento, tais como o TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ , participam deste processo, sendo que a expressão acentuada do primeiro, no epitélio de revestimento de CO, sugere que este mediador químico poderia atuar como um fator de crescimento autócrino, estimulando a proliferação das células do epitélio cístico e participando na patogênese do CO (LI et al., 1997).

A expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e apoptose em CO, por outro lado, sugere um distúrbio no controle deste ciclo, resultando em atividade proliferativa no epitélio de revestimento desta patologia, em consequência, provavelmente, de distúrbios na via de sinalização Shh (LO MUZIO et al., 1999).

No epitélio de COs de pacientes sindrômicos, a ciclina D1 foi detectada mais frequentemente, quando comparada ao CO esporádico (Lo MUZIO et al., 1999; KIMI et al., 2000), sendo que a diferença na imunodeteção desta proteína poderia contribuir para um comportamento biológico mais agressivo do CO associado a SCBCN (LO MUZIO et al., 1999).

Em geral, marcadores de proliferação celular, como o PCNA, Ki-67 e o p53 (SHEAR, 2002b) têm uma expressão mais intensa em células supra-basais do revestimento epitelial de CO, quando comparado a outros cistos, como os dentígeros e radiculares (SHEAR, 2002b; SARAÇOGLU et al., 2005), sugerindo a existência de um compartimento proliferativo supra-basal nesta lesão (LI et al., 1994).

## 2.3 Marcadores de proliferação celular

### 2.3.1 Ki-67

O anticorpo Ki-67 representa um marcador de proliferação celular o qual reconhece seu antígeno em todas as fases do ciclo celular, exceto em G<sub>0</sub>, tendo uma expressão aumentada nas fases G<sub>2</sub> e M (RABENHORST et al., 1993). Dessa forma, constitui uma proteína nuclear indispensável para síntese do DNA (De PAULA et al., 2000), sendo facilmente detectada nas frações de tecido em proliferação, permitindo monitorar o comportamento deste (BROWN, GATTER, 1990).

Apesar da ampla utilização desta proteína na rotina da patologia, especialmente em processos neoplásicos, a sua função celular é pouco conhecida (BULLWINKEL et al., 2005).

Bioquimicamente, o antígeno Ki-67 é uma proteína não-histona, com peso molecular entre 345 e 395 kd (GERDES et al., 1991; McCORMICK et al., 1993), codificada por um único gene no cromossomo 10 (McCORMICK et al., 1993) e localizado no nucléolo, especialmente na periferia e zona fibrilar densa deste, compondo a matriz nuclear, durante a interfase e associada ao cromossomo na mitose (VERHEIJEN et al., 1989).

Por muito tempo, a utilização do Ki-67 na rotina imuno-histoquímica foi limitada, uma vez que a fixação dos tecidos em formol destruía o epítipo desta proteína (BROWN, GATTER, 1990). A produção de anticorpos monoclonais, designados MIB 1(UM), 2 (DOIS) e 3 (TRÊS), entretanto, trouxe novas perspectivas aos estudos de proliferação celular, permitindo a utilização do Ki-67 em material previamente fixado em formol (RABENHORST et al., 1993).

O Ki-67 avalia o número de células que estão no ciclo celular, mas não fornece informação sobre a taxa de proliferação, uma vez que não há como



saber sobre o tempo que estas células levam para completar o ciclo celular (ARISAWA et al., 1999).

A expressão desta proteína em tecidos, parece ser influenciada pelo suprimento nutricional e, portanto, amostras retiradas do centro de uma neoplasia, por exemplo, poderia subestimar a proliferação celular (BROWN, GATTER, 1990; ARISAWA et al., 1999).

Como um indicador de prognóstico, a utilização do Ki-67 ainda é controverso e a preservação clínica permanece como um critério indispensável. Entretanto, Brown, Gatter (1990) encontraram uma correlação significativa entre a sobrevida de pacientes com neoplasias linfoproliferativas, de sistema nervoso e de mama e a expressão da proteína Ki-67.

Kim et al. (2003) compararam a expressão do antígeno Ki-67 em ceratocistos odontogênicos uni e multiloculares, associados ou não a dentes impactados. Concluíram que não existe correlação entre a expressão do anticorpo com sua apresentação clínico-radiográfica, mas observaram imunopositividade, principalmente nas camadas supra-basais e uma significativa atividade apoptótica nesta patologia, corroborando para a agressividade e recorrência dos ceratocistos odontogênicos.

A expressão de marcadores de proliferação celular, incluindo o Ki-67, em CO inflamados, foi estudada por De Paula et al. (2000). Segundo estes autores, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias poderiam influenciar a atividade proliferativa do epitélio de revestimento do CO, uma vez que uma expressão aumentada do Ki-67, PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas) e NORs (regiões organizadoras nucleolares) foi constatada em em CO com processo inflamatório subjacente ao epitélio cístico.

A inflamação, entretanto, parece ter uma influência localizada no epitélio cístico, induzindo um aumento focal na expressão de marcadores de proliferação, como o Ki-67, sem alterar, entretanto, a média de expressão destes marcadores na lesão como um todo (KAPLAN, HIRSHBERG, 2004).

### 2.3.2 p53

O gene TPp53 localiza-se no braço curto do cromossomo 17 e codifica uma proteína de mesmo nome e peso molecular de 53Kd, cujas funções estão relacionadas ao controle da proliferação celular e apoptose (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991; LANE, 1992).

Apesar da transcrição contínua deste gene, a meia-vida da proteína é cerca de cinco a dez minutos e não atinge altas concentrações em células não lesadas, especialmente pelo *feedback* negativo desempenhado pela proteína Mdm2, a qual bloqueia as funções e facilita a degradação da p53 interagindo com o domínio de transativação deste gene (MORGUNCOVA, 2005).

Em condições de estresse, entretanto, os sítios de interação entre a p53 e mdm2 são fosforilados por quinases, impedindo a formação do complexo p53/Mdm2 (MORGUNCOVA, 2005). Dessa forma, danos genéticos, como os descritos em neoplasias, favorecem o acúmulo da forma mutada da proteína p53 (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991; OGDEN et al., 1992), em níveis detectáveis pela imuno-histoquímica (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991; LANE, 1992).

Dentre os genes biologicamente reconhecidos como supressores de tumor, o p53 desempenha uma função crucial na proteção celular contra transformações malignas, sendo reconhecido como “Guardião do Genoma”, uma vez que mantém a integridade e estabilidade do genoma atuando na parada do ciclo celular na fase G1, ativando a transcrição de p21 e

permitindo o reparo do DNA lesado, ativando os mecanismos de morte celular programada ou ainda “ligando” e “desligando” genes alvos e, neste caso, atuando como um verdadeiro fator de transcrição (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991; LANE, 1992; MORGUNCOVA, 2005).

Em diversas neoplasias humanas, as alterações afetando o p53 são frequentes, especialmente as malignas (PARTRIDGE et al., 1999). Em muitos tumores humanos, as mutações genéticas afetam diretamente o gene p53 e, portanto, suas funções. Entretanto, a proteína também pode ser indiretamente inativada, através da ligação da proteína p53 a alguma proteína viral ou da sua interação com os produtos de outros genes (VOGELSTEIN et al., 2000; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004).

A inativação funcional da proteína p53 é descrita em mais da metade dos tumores humanos malignos (PARTRIDGE et al., 1999). Shin et al. (2001) sugeriram uma possível influência das anormalidades neste gene durante a tumorigênese dos tecidos bucais.

Piattelli et al. (2001) ressaltaram que poucos autores têm investigado a imunopressão da proteína p53 em cistos odontogênicos. Em 1992, Ogden et al. investigaram pela primeira vez o gene p53 em CO, cistos dentígeros e radiculares e foi possível observar imunomarcagem apenas em CO. Ainda neste estudo, a marcação pelo PCNA dos casos positivos para a p53, indicou que as células imuno-marcadas para este anticorpo estavam em proliferação.

Apesar de Piattelli et al. (2001) considerarem a imunopositividade relacionada a casos de pacientes com SCBCN, Lombardi et al (1995) e Li et al. (1996) demonstraram que não há uma diferença estatisticamente significativa quando se compara CO esporádicos, recorrentes e associados a SCBCN.

A proteína p53 participa diretamente da maioria dos processos neoplásicos em humanos. Para Lombardi et al. (1995) e Li et al. (1996), em CO, a imunodeteção desta proteína poderia refletir um acúmulo e estabilização da p53 selvagem, uma vez que estudos genéticos não identificaram mutação na p53 de portadores de CO (LI, BROWNE, MATTHEW, 1995).

O p53, por muito tempo, foi considerado como o único gene no genoma humano com inúmeras funções biológicas essenciais para a manutenção de populações celulares (MORKUNKOVA, 2005). Entretanto, esta situação mudou quando proteínas homólogas a p53 foram identificadas em células de murinos por Yang et al. (1998).

### 2.2.3 p63

Recentemente, foram descritos dois novos genes homólogos ao p53, denominados p63 e p73, constituindo a denominada família p53. Yang et al. (1998) descreveram pela primeira vez o segundo *locus* no cromossomo humano 3q27-29, com quinze exons, o qual codifica a proteína p63.

Apesar do pouco conhecimento sobre a biologia e função da proteína p63 sabe-se que, apesar da maior complexidade molecular, esta assume similaridades estruturais com a p53 (MELINO et al., 2003; Lo MUZIO et al., 2005; MILLS, 2006), sugerindo que poderia funcionar como um fator de transcrição e regulação da p53 (HALL et al., 2000; CHEN, HSUE, LIN, 2003), indicando um possível envolvimento na carcinogênese.

O gene p63 codifica pelo menos seis isoformas, as quais são subdivididas em dois grupos, segundo a presença ou não de um domínio de ativação transcricional: as isoformas que contêm um domínio de ativação transcricional (TA) são transcritas a partir de um promotor mais próximo da extremidade 5', precedendo o primeiro éxon. Já as isoformas que não

contêm qualquer domínio de ativação ( $\Delta N$ ), são transcritas a partir de um promotor na posição 3' (YANG et al., 1998; LITTLE, JOCHEMSEN, 2002; BARBIERE, PIETENPOL, 2005).

Após a transcrição do gene p63, os RNAs sofrem *splicing* alternativo, resultando em isoformas diferentes entre si quanto a presença de um *motif* na região c-terminal, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , o qual participa da interação célula-célula (LITTLE, JOCHEMSEN, 2002) e proteína-proteína (BARBIERE, PIETENPOL, 2005). Apenas as isoformas  $\alpha$  são transcritos completos e possuem este *motif*, enquanto as  $\beta$  e  $\gamma$  resultam do *splicing* dos éxons 13 e 11-14, respectivamente e não possuem esta região (YANG et al., 2002).

Pesquisas experimentais com a proteína p63 sugerem que a isoforma  $\Delta Np63$  é expressa primariamente no compartimento proliferativo e células-tronco do epitélio (PARSA et al. 1999; PELLEGRINI et al., 2001; BARBIERE, PIETENPOL, 2005), sendo necessária para proliferação de células progenitoras, diferenciação escamosa de células epiteliais e interação entre epitélio e mesênquima (BARBIERE, PIETENPOL, 2005).

Estudos envolvendo genes alvos da proteína p63 têm contribuído para uma série de discussões sobre as funções biológicas deste gene, especialmente com relação à iniciação, progressão tumoral e desenvolvimento dos tecidos.

Sbisa et al. (2006) identificaram a Adenosina Desaminase, uma importante proteína envolvida na hiperproliferação celular, como um gene alvo da p63. Dessa forma, a ativação deste gene manteria as células em proliferação, especialmente pela a inibição da apoptose.

As isoformas TA têm função similar à p53, sendo capazes de ativar determinados genes alvos e induzir a célula a entrar em apoptose (LITTLE,

JOICHEMSEN, 2002; MELINO et al., 2003) e, portanto, funcionando como um gene supressor de tumor (CHEN, HSUE, LIN, 2003).

Já as isoformas  $\Delta N$  funcionam como reguladores negativos da p53 e das isoformas TA, competindo com sítios de clivagem do DNA e interagindo diretamente com a p53 e as isoformas TAp63, inibindo as ações das mesmas e funcionando como oncogene (LITTLE, JOICHEMSEN, 2002; CHEN, HSUE, LIN, 2003; MELINO et al., 2003).

Segundo Little, Jochemsen (2002) e Chen, Hsue e Lin (2003), as células basais de diversos tipos de epitélios são responsáveis pela maior expressão das proteínas codificadas pelo p63, especialmente as isoformas  $\Delta Np63\alpha$ , altamente expressas em células-tronco de epitélios. Segundo estes autores, a  $\Delta Np63\alpha$ , em condições fisiológicas, permitiria uma renovação tecidual, além de inibir a apoptose mediada pela p53 e TAp63.

No tecido humano normal, Vincek, Knowles, Nassiri (2003) descreveram as isoformas codificadas pelo gene p63, em células basais do epitélio estratificado e células mioepiteliais. Para estes autores, o equilíbrio na expressão das proteínas apoptóticas (isoformas TA) e anti-apoptótica (isoformas  $\Delta N$ ) poderia funcionar como um mecanismo de regulação do crescimento tecidual normal ou maligno. Entretanto, ainda não se sabe ao certo como ocorre a regulação da expressão do p63 (LITTLE, JOICHEMSEN, 2002).

Yang et al. (1999) demonstraram que camundongos *Knouckout* para o p63, apresentaram profundos defeitos no desenvolvimento craniofacial e na diferenciação de tecidos como o epitélio estratificado da pele, cavidade bucal e esôfago, sendo, portanto, essencial para diferenciação ectodérmica durante embriogênese (CHEN, HSUE, LIN, 2003; KOSTER et al., 2004; BARBIERE, PIETENPOL, 2005).

Já está bem estabelecido que a mutação heterozigótica no gene p63 resulta em síndromes com penetrância completa e expressividade variável, as quais sugerem funções específicas da proteína p63 (LITTLE, JOCHEMSEN, 2002; BARBIERE, PIETENPOL, 2005).

A síndrome denominada EEC (Ectrodactilia, displasia ectodérmica e fenda labial, com ou sem fenda palatina) está associada a um defeito neste gene (CELLI et al., 1999), assim como a síndrome de Hay-Wells (McGrath et al., 2001). Little, Jochemsen (2002) ressaltaram que, ao contrário das patologias associadas a mutação do p53, como a Síndrome de Li-Fraumeni, indivíduos com a mutação do p63 não parecem desenvolver tumores, contribuindo para a idéia de que o p63 seria mais importante para o desenvolvimento embriológico que para carcinogênese.

Tsujita-Kyutoku et al. (2003) compararam a expressão das proteínas p63 e ki-67 em epiderme normal e tumores de origem epitelial (Carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, ceratoacantoma, entre outros), observando uma expressão positiva de p63 nas células basais e suprabasais da epiderme normal. Nos tumores de origem epitelial, a p63 marcou positivamente as células que compunham o parênquima da neoplasia, sendo a imunomarcção mais intensa naqueles tumores menos diferenciados. Tanto para epiderme normal quanto em tumores, nem todas as células positivas para o p63 foram imunomarcadas para o Ki-67. Ou seja, as células podem ter capacidade proliferativa, mas não duplicarem seu DNA. Desta forma, estes autores concluíram que a p63 pode ser um marcador de células imaturas em tumores de epiderme, além de indicar compartimentos de proliferação neste tecido.

Chen, Hsue, Lin (2003) induziram alterações pré-malignas e carcinoma em mucosa bucal de ratos utilizando a substância 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), conforme protocolo aceito mundialmente. Observaram, nas lesões pré-malignas, uma imunomarcção positiva para a p63 distribuída por todo o

epitélio. Já nos carcinomas induzidos, a imunomarcagem apresentou-se mais uniforme e homogênea nas áreas menos diferenciadas dos tumores, enquanto nas ilhas tumorais com maior grau de diferenciação, a p63 mostrou-se mais intensamente corada nas células periféricas às ilhas tumorais.

Desta forma, concluiu-se que a p63 pode exercer funções importantes na regulação da proliferação e diferenciação de lesões pré-malignas e malignas de origem epitelial, além de refletir a maturidade das células que deram origem à neoplasia (CHEN, HSUE, LIN, 2003).

Pellegrini et al. (2001) confirmaram que a expressão da p63 não está vinculada apenas às células com capacidade de proliferação, mas também a células progenitoras, refletindo o grau de maturação do tumor.

Estudos como o de Parsa et al. (1999) demonstraram a expressão de p63 em tumores de origem escamosa pouco diferenciados e ceratinócitos com capacidade proliferativa e, não simplesmente naqueles que estão duplicando o seu DNA. Para Tsujita-Kyutoku et al. (2003), a marcação para a p63 pode ser valiosa como indicador de anaplasia em carcinomas de células escamosas.

Existem poucos estudos envolvendo a expressão de p63 em lesões de natureza odontogênica, sendo que Lo Muzio et al. (2005) foram os pioneiros em estudar este gene em CO. Desde então, não há publicação na literatura envolvendo esta proteína em CO.

Acreditar que somente a proteína p53, desta família de genes, esta relacionada com o câncer é uma forma simplista de análise já que todos os membros desta complexa família interagem entre si (MELINO et al., 2003).



## 2.4 Matriz Extracelular: Considerações Gerais

A ME é um conjunto dinâmico e inter-relacionado de macromoléculas com diversas funções biológicas, tais como adesão, crescimento, proliferação, apoptose, migração e diferenciação celular (KLEINMAN, KLEBE, MARTIN, 1981), assumindo importantes funções em processos fisiológicos e neoplásicos (KLEINMAN, KLEBE, MARTIN, 1981; TERRANOVA et al., 1982).

Três grupos de macromoléculas compõem a ME: Proteínas estruturais fibrosas, como colágeno e elastina; Glicoproteínas adesivas, como integrinas e laminina; Proteoglicanos e ácido hialurônico. Estes componentes são agrupados em duas estruturas distintas, a matriz intersticial, presente entre as células epiteliais, endoteliais e musculares lisas; e a membrana basal, secretada pelas células epiteliais e mesenquimais, formando uma rede de laminina, colágeno não fibrilar, proteoglicanos, sulfato heparan e outras glicoproteínas (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004), sendo o colágeno IV e a laminina os constituintes mais abundantes da MB de mamíferos (EKBLÖM, LONAI, TALTS, 2003)

A heterogeneidade na composição bioquímica garante funções diversas para a MB, especialmente pela presença de múltiplas moléculas sinalizadoras nesta estrutura (EKBLÖM, LONAI, TALTS, 2003).

Dentre estas funções incluem-se a adesão de células de diferentes tipos, polarização celular, organização e desenvolvimento dos tecidos ainda no estágio embrionário, regulação do comportamento celular e expressão gênica, além de filtração de sais e pequenas moléculas (ALBERTS et al., 1997). Defeitos na adesão e polaridade celular estão relacionados com a invasão celular a tecidos vizinhos, bem como desorganização estrutural tecidual (LI et al., 2003).

Poucos autores têm ressaltado a participação dos componentes da matriz extracelular em CO, sendo que a separação do epitélio de revestimento e cápsula cística, representa um aspecto histomorfológico comum em CO. Freitas, Serafim (1998) sugerem que, para um melhor entendimento do comportamento biológico desta patologia são necessários estudos ressaltando a interação entre a ME e epitélio de revestimento cístico.

Wahlgren et al. (2003) estudaram o padrão de expressão das collagenases dois e três, gelatinase-A e cadeia cinco da laminina em cistos radicular, folicular e CO. A diferença entre a expressão destes componentes da matriz extracelular nos grupos estudados corrobora para um comportamento biológico mais agressivo do CO, uma vez que a gelatinase-A e collagenase -3, mais expressas em CO, são enzimas que favorecem a migração epitelial e fragmentação da cadeia cinco da laminina, colaborando para a formação de cistos satélites e desprendimento epitelial, respectivamente.

Oliveira et al. (2004) compararam a expressão de tenascina e fibronectina em CO, cistos radiculares e dentígeros e encontraram uma marcação mais intensa desta proteína na cápsula do CO, sugerindo a participação destas no comportamento biológico mais agressivo desta patologia.

Ao contrário, Poomsawat et al. (2006), não demonstraram diferenças na expressão de componentes da ME, laminina, colágeno IV e fibronectina, entre o CO, cistos radiculares e dentígeros. Para estes autores, o destacamento epitelial, observado em CO, pode resultar de distúrbios envolvendo receptores de integrina.

### 2.4.1 Laminina

A laminina é uma glicoproteína não-colagênica de alto peso molecular, detectada inicialmente por Timpl et al. (1979) em um tumor secretor de proteínas da membrana basal em camundongos. Estudos imunológicos realizados por estes autores permitiram concluir que esta glicoproteína representava um constituinte normal da membrana basal de diversos tecidos normais, tais como a pele.

Representa a principal glicoproteína da membrana basal (KLEINMAN, KLEBE, MARTIN, 1981; GIVANT-HORWITZ, DAVIDSON, REICH, 2005), participando de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, como a diferenciação celular (MALINDA, KLEINMAN, 1996; LI et al., 2003), adesão (MALINDA, KLEINMAN, 1996), proliferação e migração celular (ENBRING, KLEINMAN, 2003), invasão de células tumorais (MALINDA, KLEINMAN, 1996; ENBRING, KLEINMAN, 2003; GIVANT-HORWITZ, DAVIDSON, REICH, 2005), angiogênese (ENBRING, KLEINMAN, 2003), ligação estrutural entre as células epiteliais e neoplásicas ao colágeno IV (KLEINMAN, KLEBE, MARTIN, 1981), além de funcionar como receptora para o colágeno IV e outros componentes da membrana basal (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2004).

A laminina é um trímero formado por três cadeias longas de polipeptídeos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) organizadas em forma de uma cruz assimétrica e mantidas unidas através de pontes dissulfeto (ALBERTS et al. 1997), as quais se combinam e dão origem a pelo menos quinze isoformas distintas (KARIYA, MIYAZAKI, 2004).

Segundo Givant-Horwitz, Davidson, Reich (2005), as inúmeras funções da laminina estão relacionadas a sua complexidade estrutural. Dessa forma, as diferentes isoformas da proteína parecem desempenhar funções distintas, sendo que, em algumas situações, a laminina parece induzir a ação de

proteases, as quais promovem a interação desta glicoproteína com vários tipos celulares, além de atuar na degradação da matriz extracelular, evento importante na invasão de células tumorais (ENBRING, KLEINMAN, 2003).

As funções da laminina na manutenção da integridade tecidual, adesão e proliferação celular já estão bem estabelecidas. Engbring, Kleinmam (2003) ressaltaram a importância desta glicoproteína de ligação como receptor para proteoglicanas, inclusive estimulando a angiogênese. Em sua configuração estrutural é possível caracterizar um sítio de ligação específico ao Colágeno IV.

Amorim et al. (2004) estudaram a expressão imuno-histoquímica de componentes da matriz extracelular em ceratocistos odontogênicos, observando uma imuno-marcação descontínua para a laminina tanto nos casos de SCBCN, quanto em lesões esporádicas de CO.

Oliveira et al. (2002) compararam diversos tipos de cistos odontogênicos através da marcação imuno-histoquímica de componentes da membrana basal (colágeno IV e laminina). Das lesões estudadas, o cisto radicular mostrou imunomarcação mais acentuada para ambas as proteínas avaliadas, quando comparado ao cisto dentífero e COs. Estes, por sua vez, revelaram uma imunomarcação fraca, delgada e descontínua para o colágeno IV e laminina.

Para estes autores, a descontinuidade na imunomarcação para a laminina poderia estar relacionada com distúrbios na síntese e degradação desta proteína de matriz, corroborando para um comportamento biológico mais agressivo do CO, quando comparado a outros cistos odontogênicos.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar morfológicamente e estudar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, p53, p63 e laminina em CO, bem como associar os achados histológicos com aspectos clínicos e imaginológicos desta patologia, a fim de melhor compreender os mecanismos biológicos envolvidos nesta patologia, especialmente proliferação celular e comportamento da membrana basal.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o padrão de imunomarcção das proteínas Ki-67, p53 e p63 no epitélio de revestimento de CO.
- Semi-quantificar a imunomarcção das proteínas Ki-67, p53 e p63 em CO.
- Analisar o padrão de imunomarcção da laminina em CO, especialmente em áreas de desprendimento epitelial e alteração da morfologia tecidual.
- Associar, estatisticamente, a expressão dos marcadores de proliferação celular, Ki-67, p53, p63 em CO.
- Avaliar a associação da imunomarcção das proteínas Ki-67, p53, p63 com o processo inflamatório da cápsula cística.
- Estudar a associação da expressão das proteínas Ki-67, p53 e p63 com o comportamento clínico, especialmente recidivas e SCBCN;
- Comparar a expressão das proteínas Ki-67, p53, p63 com características imaginológicas da lesão.

## 4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram utilizados trinta casos de CO obtidos dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), Serviço de Anatomia Patológica e Análises Clínicas (SEPAC, Salvador, Bahia) e Hospital Santo Antônio (Salvador, Bahia), entre os anos de 2003 e 2005. No total, foram analisados trinta e sete COs, sendo que todas as lesões incluídas neste estudo foram obtidas a partir de biópsia excisional.

Todos os pacientes incluídos na amostra foram contactados e convidados para reavaliação clínica e exame radiográfico panorâmico de preservação nos ambulatórios de Estomatologia, Radiologia e Cirurgia Bucocomaxilo-facial da FOUFBA.

### 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os pacientes incluídos na amostra assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido especialmente elaborado para o trabalho. O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, com número de certificação de apresentação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) 0011.1.225.000-05 e parecer favorável número 86/2006.

### 4.3 TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA

#### 4.3.1 Tratamento das lâminas (Silanização)

Todas as lâminas utilizadas para a imuno-histoquímica foram cuidadosamente imersas em detergente neutro (EXTRAN), sendo as

mesmas mantidas neste por um período mínimo de seis horas. Após enxaguadas abundantemente em água corrente, as lâminas foram lavadas com água destilada e imersas em solução de ácido clorídrico (HCL) um molar por vinte minutos e, posteriormente, submetidas a três passagens consecutivas em água destilada e imersão em solução de álcool absoluto e ácido acético um molar, durante vinte minutos. Após este período, as lâminas foram acondicionadas, uma a uma, sobre papel de filtro para secagem a temperatura ambiente.

Para a silanização das lâminas, uma solução de 4 mL de 3-aminopropiltriéoxissilano (Cód. 3648, *Sigma Chemical CO. Saint Louis, USA*) e 196 mL de acetona PA foi preparada sob proteção de luz direta.

As lâminas foram cuidadosamente dispostas em cubas de vidro e passaram, progressivamente, por imersão na solução de silano durante quatro minutos, acetona pelo mesmo período de tempo e água destilada por dois minutos. Após secagem em temperatura ambiente, as mesmas foram acondicionadas, uma a uma, em papel absorvente e protegidas da luz em alumínio.

#### 4.3.2 Protocolo Imuno-Histoquímico

Todo o protocolo imuno-histoquímico foi realizado utilizando o Sistema EnVision™ (*DAKO Corporation, Carpinteria, USA*).

Cortes de três micrometros de espessura foram obtidos a partir dos espécimes emblocados em parafina e acondicionados sobre lâminas previamente silanizadas.

Para desparafinização, os cortes foram submetidos à imersão em xilol em temperatura ambiente, em dois tempos de dez minutos e, em seguida,

álcool absoluto e álcool 50%, em dois tempos de cinco minutos cada, e, posteriormente, lavagem em água destilada por trinta segundos.

Para a recuperação antigênica das proteínas Ki-67, p53 e p63 foi utilizada uma solução de Citrato monohidratado, pH 6.2 (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*) a 96° C, por trinta minutos, em banho-maria.

Para a marcação do anticorpo anti-laminina, foram selecionadas vinte lesões de CO, considerando a quantidade de material biológico incluído em parafina, além da avaliação morfológica, em H/E, do epitélio de revestimento cístico. Os cortes histológicos foram submetidos a digestão enzimática por uma solução de Pepsina (*Sigma, Saint Louis, USA*) a 0,4%, pH 1,5, por trinta minutos, à 37° C.

Os cortes submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido à 96° C foram resfriados em temperatura ambiente, por vinte minutos e lavados duas vezes em água destilada e solução salina fosfatada 0,01 molar, pH 7.4 (PBS).

A área do corte histológico foi demarcada com o auxílio de uma caneta hidrofóbica apropriada (*Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca*).

Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se uma solução pronta de Peróxido de Hidrogênio (*Sistema EnVision™, Dako Corporation, Carpinteria, USA*), durante dez minutos, em temperatura ambiente. Após passagem em água destilada, os cortes foram imersos em PBS, em dois tempos de cinco minutos cada.

Para determinar as melhores diluições dos anticorpos testados foram realizados estudos pilotos, levando em consideração as diluições sugeridas pelos fabricantes e as utilizadas no laboratório de imuno-histoquímica da Unidade de Histopatologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.



Os anticorpos primários (Ki-67, p53, p63, Laminina) foram diluídos em uma solução de Tris-HCL 0,05mol/L, com 0,1% de Tween e proteínas redutoras de *Background* (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) e incubados em temperatura ambiente durante quarenta minutos. O clone, a marca comercial e a diluição de cada anticorpos estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos primários. Salvador, Bahia, 2005

<i>Especificidade</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Marca Comercial</i>
Ki-67	KIS5	1:100	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca
p53	DO-7	1:50	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca
p63	4A4	1:150	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca
Laminina	L9393	1:50	Sigma, Saint Louis, USA

Após incubação do anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS, em dois tempos de cinco minutos cada. O polímero marcado, uma peroxidase conjugada com anticorpos anti-coelho e anti-camundongo em solução de Tris-HCl contendo proteínas estabilizadoras (Sistema EnVision™, DAKO Corporation, Carpinteria, USA), foi aplicado sobre o tecido durante trinta minutos e, após este tempo, mais uma vez, os cortes foram lavados com água destilada e PBS, nesta ordem, por cinco minutos cada.

Para a revelação da reação empregou-se uma solução cromógena de 3,3 diaminobenzidina diluída em uma solução tampão de Imidazole-HCL, pH 7.5, contendo peróxido de hidrogênio (Sistema EnVision™, DAKO Corporation, Carpinteria, USA) durante cinco minutos, em câmera escura e sob controle microscópico.

Após nova lavagem em água destilada, as secções histológicas foram contracoradas com hematoxilina alcoólica de Harris por dez segundos. Após desidratação com álcool e diafanização com xilol, as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá natural.

Para o controle negativo das reações, o anticorpo primário foi substituído por soro albumina bovina. Carcinoma epidermóide de boca correspondeu ao controle positivo tanto para o Ki-67 (SANTOS, 2000), quanto para o p63 (CHEN et al., 2003) e p53. Para a Laminina, os vasos sanguíneos do próprio tecido corresponderam ao controle interno positivo.

## 4.4 ANÁLISE DOS DADOS

### 4.4.1 Análise Clínica-Epidemiológica e Imaginológica

Dados referentes à história clínica e procedimento cirúrgico foram recuperados dos prontuários dos pacientes incluídos na amostra, confirmados durante o exame clínico de preservação e através de contato pessoal com os cirurgiões buco-maxilo-faciais responsáveis pelos casos.

As radiografias panorâmicas de diagnóstico e controle foram exibidas em um monitor Super VGA (matriz de 1024x768). O brilho e contraste de todas as imagens foram ajustados, utilizando o programa operacional Photoshop CS2, versão 9.01 (ADOBE SYSTEM), permitindo uma melhor avaliação destas, a qual foi realizado por uma única radiologista experiente.

As informações clínicas e imaginológicas de cada paciente foram compiladas em fichas específicas elaboradas para esta pesquisa, levando em consideração o gênero, idade no primeiro diagnóstico e recidivas, cor da pele, localização anatômica, aspectos radiográficos, relação com unidades

dentárias e estruturas adjacentes, além das formas de tratamento. Os critérios avaliados podem ser observados no ANEXO A.

Foram considerados como recorrentes apenas os CO que acometeram a mesma localização anatômica da lesão primária, conforme estabelecido por Stoeltinga (2001).

#### 4.4.2 Análise Morfológica

Para a revisão e análise morfológica, cortes de quatro micrometros de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, sendo os mesmos submetidos às colorações pela hematoxilina/eosina e PAS, conforme a rotina histotécnica da Unidade de Histopatologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

A análise morfológica dos casos foi realizada individualmente por um examinador devidamente calibrado, utilizando um microscópio ótico binocular, nos aumentos de dez, vinte e quarenta vezes considerando-se os critérios estabelecidos pela Classificação da OMS (KRAMER, PINDBORG, SHEAR, 1992)) para o diagnóstico de CO:

- Características do epitélio (atrófico e disposição das células da camada basal em paliçada);
- Tipo de ceratinização (orto ou paraceratinização);
- Integridade na interface epitélio-conjuntivo (desprendimento do revestimento epitelial);
- Presença de cistos satélites na cápsula;
- Displasia epitelial;
- Qualidade da resposta inflamatória e magnitude desta na cápsula cística.

Os dados obtidos na análise morfológica foram compilados em uma ficha específica (ANEXO A).

#### 4.4.3 Análise Imuno-Histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada por um observador previamente calibrado. As lâminas foram exibidas em um monitor Super VGA (matriz de 1024x768), a partir de um microscópio de luz (*AXIOSCOP1-ZEISS*), com aumento final de 400x, sob um foco fixo e clareza de campo, acoplado a um sistema de câmara digital (*AXIOCAM HRP, ZEISS, Germany, 2004*) e com auxílio do sistema operacional Axio-Zeiss versão 4.04 (*ZEISS, Germany, 2004*).

Após a captura das imagens, foi realizada a contagem manual das células marcadas positivamente para o Ki-67, p53 e p63, para cada caso, considerando-se, separadamente, a localização basal e/ou supra-basal, utilizando, o programa operacional Image Tool 2.0 (*UTHSCSA, Texas University, USA, 1996*). Para estes anticorpos, apenas as células do revestimento epitelial dos casos de CO que exibiam imunomarcagem nuclear acastanhada foram consideradas, independente da intensidade.

Obteve-se os valores absolutos e porcentagem de células positivamente marcadas para cada anticorpo (Ki-67, p53 e p63) através da contagem de, no mínimo, mil núcleos do revestimento epitelial de até dez campos microscópicos consecutivos, a partir de uma área representativa da lesão, para cada caso.

De acordo com a porcentagem de células positivas para cada anticorpo, as amostras foram avaliadas semi-quantitativamente, considerando-se os seguintes parâmetros: - (0 a 5% de células positivas); +1 (6 a 25% de células positivas); +2 (26 a 50% de células positivas); + 3 (> 50% de células positivas).

Para a análise do padrão de expressão imuno-histoquímica da laminina foram adotados critérios estabelecidos por Oliveira et al. (2002): continuidade (contínuo ou descontínuo) e intensidade da imunomarcação (fraca, moderada, intensa) na membrana basal do epitélio de revestimento dos casos de CO.

#### 4.4.4 Correlação entre aspectos clínicos, imaginológicos, morfológicos e imuno-histoquímicos

Os resultados referentes a formas de tratamento, recidivas, localização anatômica, características imaginológicas e morfológicas foram comparados e associados estatisticamente, bem como com os marcadores imuno-histoquímicos.

### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional *Microsoft Excel*. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *BIOESTAT 3.0* (Sociedade Civil Mamiarauá, MCT-CNPq, Conservation International, Brasil, 2003).

Os dados referentes a imunomarcação pelos anticorpos Ki-67, p53 e p63 foram analisados segundo a sua distribuição na curva normal de Gauss, sendo que a análise estatística descritiva dos dados (Média, Mediana, Desvio Padrão, Curtose e Variância) permitiu concluir que os mesmos distribuíam-se de forma assimétrica.

Mesmo após transformações logarítmicas e exponenciais não foi possível obter amostras simétricas para os parâmetros analisados. Dessa forma, optou-se pela utilização de testes estatísticos não-paramétricos:

- Mann-Whitney, para comparar e testar diferenças estatísticas entre duas amostras independentes.

- Kruskal-Wallis para comparar e testar diferenças estatísticas entre mais de duas amostras independentes.

- $X^2$  de Fisher para testar associações ou independências entre variáveis categóricas.

O nível de significância e poder do teste foram estabelecidos, respectivamente, em 5% e 80%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil epidemiológico

Trinta pacientes com diagnóstico histopatológico de CO, entre os anos de 2003 e 2006, foram incluídos na amostra sendo, no total, trinta e sete lesões estudadas.

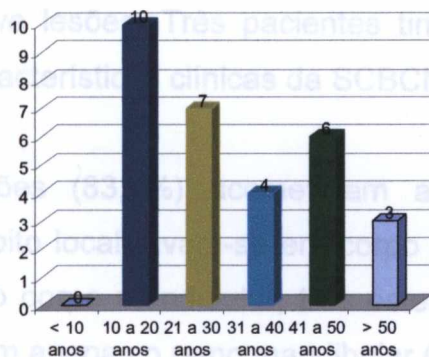
Destes pacientes, dezesseis (53,33%) apresentaram lesões primárias e quatorze (46,67%) correspondiam a recorrências. Estas, por sua vez, desenvolveram-se em um tempo médio de doze a vinte e quatro meses (57,1%; n=8) e apenas um paciente apresentou recidiva após dez anos do tratamento cirúrgico e acompanhamento radiográfico anual. Nesta amostra, cinco indivíduos tinham o diagnóstico de SCBCN e apresentavam entre um e três COs primários.

Para a classificação dos pacientes em faixas etárias, as idades do primeiro diagnóstico e recorrências, caso estas existissem, foram consideradas.

Nesta amostra, a idade dos pacientes no primeiro diagnóstico variou entre onze e oitenta e um anos, sendo a faixa etária de dez a vinte anos a mais acometida (33,3%; n= 10), seguida da faixa etária de vinte e um a trinta anos (23,3%; n=7) (Figura 1). Considerando-se apenas as recorrências, a idade média dos pacientes foi de 33,6 anos.

Homens foram acometidos em 53,3% (n=16) dos casos e mulheres em 46,7% (n=14), em uma proporção de 1:1,5. Com relação a cor da pele, 60% (n=18) corresponderam a melanodermas, seguido por leucodermas (23,3%; n=7) e faiodermas (16,7%; n= 5).

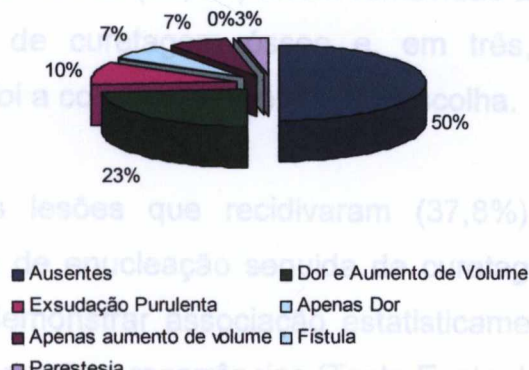
Figura 1. Distribuição dos pacientes por faixa etária. Salvador, Bahia, 2006.



## 5.2 Aspectos clínicos, imaginológicos e de tratamento

Do total de pacientes da amostra 50% (n=15) apresentaram alguma sintomatologia. Destes, sete pacientes relataram dor e aumento de volume concomitantemente (46,7%) e, apenas três (20%), exsudação purulenta. Em quinze pacientes (50%), a lesão foi descoberta em exame imaginológico de rotina, especialmente para documentação ortodôntica ou avaliação de terceiros molares para exodontia. Os dados referentes à sintomatologia clínica dos pacientes estão descritos na Figura 2.

Figura 2. Manifestações clínicas identificadas nos paciente com CO. Salvador, Bahia, 2006.





Vinte e dois pacientes (73, 33%) tinham apenas um CO. Daqueles que apresentavam mais de uma lesão (n=8), cinco tinham o diagnóstico da SCBCN e, no total, nove lesões. Três pacientes tinham dois COs e não apresentaram outras características clínicas da SCBCN.

Trinta e uma lesões (83,8%) acometeram a região posterior de mandíbula. Destas, dezoito localizavam-se em corpo e ramo de mandíbula, oito envolviam apenas o corpo mandibular, três estendiam-se do corpo ao côndilo e duas acometiam apenas o ramo mandibular (Tabela 2).

Das catorze lesões que recidivaram (37,84%), doze localizavam-se na região posterior de mandíbula, entretanto não foi possível demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre a localização anatômica da lesão nesta região e recorrência (Teste Exato de Fisher,  $p= 0,5927$ )

A análise das radiografias panorâmicas demonstrou que 70,2% (n=26) das lesões apresentavam-se como uma radiotransparência unilocular de margens bem definidas, quatorze localizavam-se na região periapical (37,9%), dezenove (51,3%) distorciam o canal mandibular e onze (29,7%) deslocavam uma unidade dentária adjacente. Outros padrões imaginológicos observados estão descritos na Tabela 3 e representados na Figura 3.

Trinta e quatro lesões (91,9%) foram removidas através de enucleação cirúrgica seguida de curetagem óssea e, em três, a enucleação sem curetagem óssea foi a conduta terapêutica de escolha.

Das catorzes lesões que recidivaram (37,8%), treze haviam sido removidas através de enucleação seguida de curetagem óssea, entretanto não foi possível demonstrar associação estatisticamente significativa entre esta forma de tratamento e recorrências (Teste Exato de Fisher,  $p= 0,6838$ ).

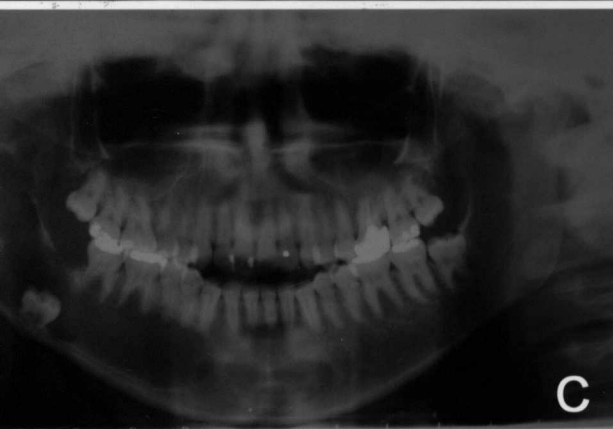
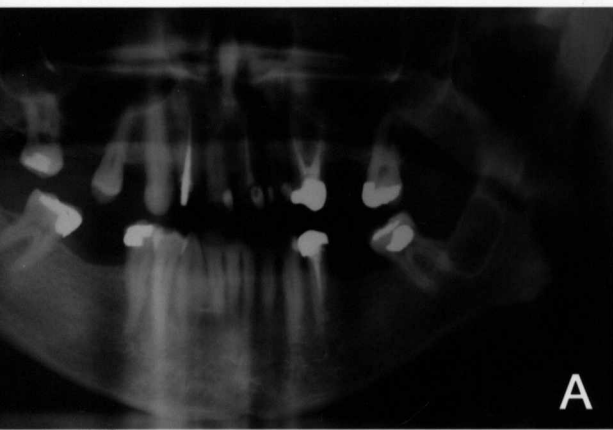
Tabela 2. Localização anatômica dos COs. Salvador, Bahia, 2006.

<i>Localização Anatômica</i>	<i>Número de Lesões (n=37)</i>	<i>%</i>
Sínfise e Parasínfise	3	8,1
Região anterior de maxila	0	0
Região posterior de maxila (Incluindo a Tuberosidade Maxilar)	3	8,1
Corpo mandíbula	8	21,7
Ramo Mandibular	2	5,4
Côndilo	0	0
Processo Coronóide	0	0
Corpo e Ramo mandíbula	18	48,6
Corpo, Ramo e Processo Coronóide	0	0
Corpo, Ramo e Côndilo	0	0
Corpo, Ramo, Processo Coronóide e Côndilo	3	8,1

Tabela 3. Padrões imaginológicos das lesões de COs. Salvador, Bahia, 2006.

Padrão Imaginológico	n	%
Unilocular	26	70,3
Multilocular	6	16,2
Multilobular	5	13,5
Margens definidas	26	70,3
Margens indefinidas	11	29,7
Sem relação com dentes	10	27,0
Lateralmente a uma raiz dentária	5	13,5
Região Periapical	14	37,9
Envolvendo a coroa dentária	8	21,6
Deslocando unidade (s) dentárias	11	29,7
Reabsorvendo raiz (es)	3	8,1
Distorcendo o canal mandibular	19	51,3

Figura 3. Aspectos imaginológicos exibidos pelo CO. (A) e (B) Áreas radiolúcidas uniloculares em ramo e corpo mandibulares, à esquerda, respectivamente. (C) extensa área radiolúcida multilocular e multilobular envolvendo o corpo, ramo e processo coronóide da mandíbula, à direita, associada a unidade dentária não irrompida, (D) Área radiolúcida multilocular envolvendo a sínfise e parasínfise, bilateralmente, reabsorvendo raízes dos dentes envolvidos. (E) Múltiplas áreas radiolúcidas uniloculares envolvendo ossos gnáticos de paciente sindrômico. (F) Áreas radiolúcidas multiloculares reabsorvendo e deslocando raízes de unidades dentárias irrompidas. Salvador, Bahia, 2006.



### 5.3 Análise morfológica

Para a revisão morfológica dos casos foram considerados os parâmetros definidos pela OMS (1992) para o diagnóstico de CO. Apenas os casos paraceratinizados foram incluídos na amostra, uma vez que a variante ortoceratinizada é considerada como uma entidade patológica distinta (THOSARPORN et al., 2004; PHILIPSEN, 2005).

Morfológicamente, 89,2% (n=33) das lesões de CO mostravam um epitélio de revestimento cístico predominantemente atrófico, com até oito camadas de células. Em 40,5% (n=15), havia acantose em áreas isoladas do epitélio cístico. Brotos epiteliais a partir da membrana basal, foram observados em 35,1% (n=13) dos casos e cistos satélites em 73,0% (n=27). Em apenas um CO observou-se atipias de células escamosas de significado indeterminado. Estes aspectos histomorfológicos estão ilustrados nas Figuras 4, 5 e 6.

A coloração pelo PAS permitiu uma melhor visualização da membrana basal do epitélio. Em 75,6% (n=28) dos casos, áreas de desprendimento do tecido conjuntivo foram frequentes, sendo que em 100% (n=28) destes, a membrana basal estava ligada ao epitélio cístico (Figura 7).

A presença de inflamação na cápsula cística foi evidente em 70,3% (n=26) casos (Figura 6). Qualitativamente, o processo inflamatório predominante era do tipo mononuclear (n=20) e discreto (n= 12).

As principais características histomorfológicas observadas nos casos estudados estão resumidamente descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Principais características histomorfológicas das lesões de CO. Salvador, Bahia, 2006.

<i>Características Histomorfológicas</i>	<i>Ceratocisto Odontogênico</i>	
	n	%
Epitélio atrófico (até oito camadas)	33	89,2%
Epitélio com mais de oito camadas	4	10,8%
Céulas Basais em paliçada	30	81,2%
Atipia de células escamosas de significado indeterminado	1	2,7%
Superfície Corrugada	36	97,3%
Acantose	15	40,5%
Brotos Epiteliais	13	35,1%
Cistos Satélites	27	73,0%
Ausência de Inflamação	11	29,7%
Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear	20	54,0%
Infiltrado inflamatório discreto	12	32,4%
Infiltrado inflamatório moderado	9	24,32%
Infiltrado inflamatório intenso	5	13,51%
Membrana Basal descontínua	28	75,6%

#### 5.4 Associação entre aspectos clínicos, imaginológicos e morfológicos

Dos pacientes que relataram sinais e sintomas (n=15), sete apresentaram dor e aumento de volume concomitantemente. A análise das nove lesões que acometeram estes indivíduos demonstrou a presença de um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e misto em sete e duas lesões, respectivamente. Quanto a intensidade, em quatro lesões o infiltrado mostrou-se discreto, moderado em três e, em duas, intenso.

Das lesões que apresentaram cistos satélites (n=27), catorze (51,85%) correspondiam à recidivas e, nove (33,3%), aos casos associados a SCBCN. O teste exato de Fisher demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de cistos satélites e recidivas ( $p=0,0033$ ) e entre cistos satélites e a SCBCN ( $p=0,0377$ ).

Das vinte e seis lesões de aspecto imaginológico unilocular, vinte e uma (80,8%) apresentaram processo inflamatório, sendo este predominantemente mononuclear em dezenove COs.

Em todos os casos cujo aspecto multilocular foi observado (n=6; 16,2%), a presença de cistos satélites foi evidente. Dezenove lesões distorciam o canal mandibular (51,3%) e, destas, catorze (73,7%) apresentavam processo inflamatório na cápsula cística. Outros padrões imaginológicos e histomorfológicos foram comparados através do Teste exato de Fisher e os resultados estatísticos estão compilados na Tabela 5.



Tabela 5. Correlação entre aspectos imaginológicos e histomorfológicos. Salvador, Bahia, 2006.

<i>Parâmetros</i>	<i>Inflamação</i>			<i>Cistos Satélites</i>		
	n	%	p*	n	%	p*
<i>Imaginológicos</i>						
Unilocular	21	80,77	<b>0,0418</b>	18	69,2	0,3606
Multilocular	2	33,3	0,1300	6	100	<b>0,0167</b>
Região Posterior de Mandíbula	22	80,0	0,2360	24	77,42	0,1857
Região Periapical	8	72,7	0,5799	2	25,0	0,1102
Distorcendo canal mandibular	14	73,7	0,4571	17	89,5	<b>0,0243</b>

\*Teste exato de Fisher, nível de significância 0,05

#### 5.4 Análise imuno-histoquímica

##### Ki-67

Em trinta e seis lesões (97,3%) observou-se imunomarcagem para o Ki-67, sendo esta predominante nas camadas supra-basais do epitélio (Figura 8) e, em uma lesão, todas as células foram negativas para este anticorpo.

Após a contagem manual do total de células imunomarcadas para o Ki-67 e negativas, no total de campos considerados, observou-se que em 48,65% (n=18) das lesões esta imunomarcagem correspondia ao escore +1, destas quatro estavam associadas a pacientes portadores da SCBCN. Cinco COs de pacientes sindrômicos exibiram imunomarcagem compatível com o escore +2 (Tabela 6).

Os escores médios obtidos para cada caso, individualmente, bem como o número total de células contadas estão explicitados no Quadro 1, Anexo B.

Tabela 6. Distribuição do número de lesões marcadas para o Ki-67, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.

<i>Escore</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
-	5	13,5
+1	18	48,65
+2	13	35,13
+3	1	2,72

Nota: Das cinco lesões classificadas como negativas para o Ki-67, quatro apresentavam menos de 5% de células imunomarcadas.

Comparando-se a distribuição deste anticorpo entre as camadas, basal e supra-basais, observou-se uma predominância de imunomarcação em células do estrato intermediário do epitélio cístico (Figura 8), independente do escore, sendo que esta diferença de imunomarcação entre os compartimentos considerados, basal e supra-basal, mostrou-se estatisticamente significativa (Tabela 7; *Mann-Whitney*,  $p < 0,0001$ ).

Tabela 7. Ki-67. Diferença entre a imunomarcação basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>Ki-67</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
Células Basais	49,4±44	
Positivas		$p < 0,0001$
Células Supra-basais	154,6±127,6	
Positivas		

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Entre os grupos de lesões associadas a SCBCN e CO considerados esporádicos não se observou diferença estatisticamente significativa na imunomarcação supra-basal para o Ki-67 (Tabela 8; *Mann-Whitney*,  $p =$

0,7013). Qualitativamente, entretanto, foi possível constatar, nos COs de pacientes síndrômicos, uma distribuição mais superficial das células epiteliais imunomarcadas para o Ki-67.

Tabela 8. Ki-67. Diferença entre a imunomarcção de COs associados à SCBCN e COs esporádicos. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>Ki-67</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
COs associado a SCBCN (n=9)	150,3±76,3	p=0,7013
COs Esporádicos (n=28)	156,7±141,4	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Comparando-se a expressão do anticorpo anti-Ki-67, entre lesões primárias e recorrentes, não foi possível constatar diferença estatística entre estes grupos (Tabela 9; *Mann-Whitney*,  $p=0,5591$ ).

Tabela 9. Ki-67. Diferença entre a imunomarcção de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>Ki-67</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
CO Primários (n=23)	235,5±222,2	p=0,5591
CO Recorrentes (n=14)	177,6±124,8	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Em quatro casos estudados, avaliou-se a imunomarcção do Ki-67 da lesão primária e recorrente, uma vez que ambos fragmentos cirúrgicos foram incluídos na amostra. Apesar de não ter sido possível comparar, estatisticamente, a expressão deste anticorpo na amostra pareada,

especialmente pela amostra reduzida (n=4), observou-se, uma média de imunomarcção superior nos casos recorrentes (Tabela 10).

Tabela 10. Ki-67. Médias de imunomarcção entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>Ki-67</i>
	Média±DP
CO Primários	59±23,1
CO Recorrentes	121,8±82,2

### p53

Em trinta e quatro lesões (91,9%) observou-se imunomarcção para a proteína p53, nas camadas epiteliais basal e supra-basal (Figura 9), em geral de fraca intensidade quando comparada ao controle positivo de CEC de boca, exceto quando associada a SCBCN. Três lesões foram negativas para este anticorpo.

Após a contagem manual do total de células marcadas e negativas, no total de campos considerados, observou-se que em 51,35% (n=19) das lesões esta imunomarcção correspondia ao escore +3. (Tabela 11), destas, cinco estavam associadas a SCBCN.

Os escores médios obtidos para cada caso, individualmente, bem como o número total de células contadas estão explicitados no Quadro 2, Anexo B.

Tabela 11. Distribuição do número de lesões marcadas para a proteína p53, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.

<i>Escore</i> s	<i>n</i>	%
-	3	8,11
+1	4	10,81
+2	11	29,73
+3	19	51,35

Comparando-se a distribuição do anticorpo anti-p53 entre as camadas, basal e supra-basais, observou-se uma predominância de imunomarcacão em células do estrato intermediário do epitélio cístico (Figura 9), sendo que esta diferença de imunomarcacão entre os compartimentos considerados, basal e supra-basal, mostrou-se estatisticamente significativa (Tabela 12; Mann-Whitney,  $p < 0,0001$ )

Tabela 12. p53. Diferença entre a imunomarcacão basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>p53</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
Células Basais Positivas	205,8±116,2	p<0,0001
Células Supra-basais Positivas	357,0±165,3	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Entre os grupos de lesões associadas à SCBCN e ao CO esporádicos não se observou diferença estatisticamente significativa na imunomarcacão supra-basal para o p53 (Tabela 13; Mann-Whitney,  $p = 0,3195$ ). Qualitativamente, entretanto, foi possível constatar que, no epitélio cístico de

pacientes síndrômicos, a imunomarcção para o p53 mostrou-se mais intensa e envolvia toda a espessura do epitélio cístico (Figura 9).

Tabela 13. p53. Diferença entre a imunomarcção de CO associado à SCBCN e CO esporádicos. Salvador, Bahia, 2006.

	p53	p
	Média±DP	
COs associado a SCBCN (n=9)	150,3±76,3	p=0,3195
COs Esporádicos (n=23)	156,7±141,4	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Comparando-se lesões primárias e recorrentes, não foi possível constatar diferença estatística significativa na imunomarcção para o p53 (Tabela 14; Mann-Whitney, p= 0,9847).

Tabela 14. p53. Diferença entre a imunomarcção de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.

	p53	p
	Média±DP	
CO Primários (n=23)	557,2±284,4	p=0,9847
CO Recorrentes (n=14)	561,8±318,7	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

A comparação estatística da imunomarcção para a proteína p53, nos quatro casos pareados (lesão primária e recorrente), não foi possível pelo tamanho amostral reduzido (n=4). A média de células marcadas, nos casos recorrentes, entretanto, mostrou-se discretamente superior (Tabela 15).

Tabela 15. p53. Médias de imunomarcção entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006.

	p53
	Média±DP
CO Primários	402,8±248,1
CO Recorrentes	468,3±261,3

### p63

O p63 mostrou-se intensamente expresso em todas as lesões estudadas (n=37; 100%), tanto no compartimento celular basal quanto nos supra-basais. (Figura 10).

Após a contagem manual do total de células marcadas e negativas, no total de campos considerados, observou-se que em 100% das lesões (n=37) esta imunomarcção correspondia ao escore +3. (Tabela 16)

Os escores médios obtidos para cada caso, individualmente, bem como o número total de células contadas estão explicitados no Quadro 3, Anexo B.

Tabela 16. Distribuição do número de lesões marcadas para o p63, por escore médio. Salvador, Bahia, 2006.

Escores	n	%
-	0	0
+1	0	0
+2	0	0
+3	37	100%

A diferença na distribuição da imunomarcção do anticorpo anti-p63 entre as camadas, basal e supra-basais mostrou-se estatisticamente significativa (Tabela 17; *Mann-Whitney*,  $p < 0,0001$ ) entretanto, entre os grupos de lesões associadas à SCBCN e aos COs esporádicos, não se

observou diferença na detecção deste anticorpo (Tabela18; *Mann-Whitney*,  $p=0,2427$ )

Tabela 17. p63. Diferença entre a imunomarcção basal e supra-basal. Salvador, Bahia, 2006.

	p63	p
	Média±DP	
Células Basais	371,8±138,4	
Positivas		$p < 0,0001$
Células Supra-basais	585,1±214,8	
Positivas		

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Tabela 18. p63. Diferença entre a imunomarcção de CO associado à SCBCN e CO esporádicos. Salvador, Bahia, 2006.

	p63	p
	Média±DP	
COs associado a	627,1±190	
SCBCN (n=9)		$p=0,2427$
COs Esporádicos (n=28)	571,6±223,7	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

A imunomarcção para o p63 foi comparado entre lesões primárias e recorrentes e não foi possível, entretanto, constatar diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. (Tabela 19; *Mann-Whitney*,  $p= 0,9127$ ).



Tabela 19. p63. Diferença entre a imunomarcação de COs primários e recorrentes. Salvador, Bahia, 2006.

	p63	p
	Média±DP	
CO Primários (n=23)	1008,0±311,6	p=0,9127
CO Recorrentes (n=14)	971,0±303,3	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

A análise pareada de quatro lesões, primárias e recorrentes, não foi possível pelo tamanho reduzido da amostra. Entretanto-se, a média de imunomarcação para este anticorpo, nas lesões recorrentes, mostrou-se superior (Tabela 20).

Tabela 20. p63. Médias de imunomarcação entre casos primários e recorrentes pareados. Salvador, Bahia, 2006.

	p63
	Média±DP
CO Primários	860,3±293,6
CO Recorrentes	928,5±357,4

### Laminina

Para a avaliação da laminina foram utilizadas vinte lesões de CO. Todas exibiram imunomarcação para este anticorpo, variando de discreta (n= 3; 15%), moderada (n= 5; 25%) a intensa (n= 12; 60%) (Figuras 11 e 12).

Em duas lesões (10%) observou-se que a laminina expressava-se na MB predominantemente de forma descontínua, enquanto em dezoito COs (90%) esta marcação foi predominantemente contínua (Figuras 11 e 12).

## 5.5 Associação entre os marcadores de proliferação celular

As trinta e sete lesões avaliadas foram comparadas quanto ao total de células marcadas para as proteínas Ki-67, p53 e p63 e observou-se uma associação estatisticamente significativa entre estes marcadores nos COs avaliados (*Kruskal-Wallis, comparações pelo método de Dunn;  $p < 0,05$* )

## 5.6 Associação histomorfológica e imuno-histoquímica

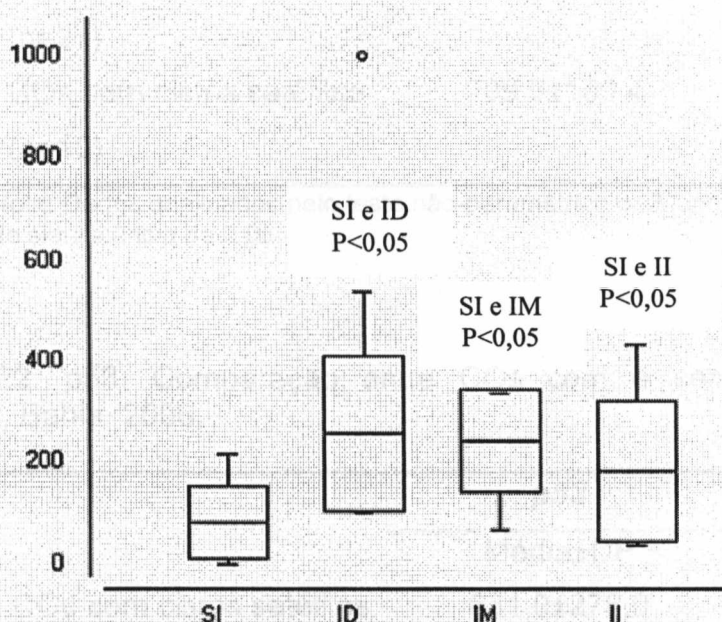
A análise qualitativa das lesões demonstrou, em áreas de processo inflamatório, um aumento localizado apenas na expressão da proteína Ki-67.

Das vinte e seis lesões que apresentavam inflamação, treze (50%) obtiveram os escores +2 ou +3 para o Ki-67, enquanto no grupo de COs sem inflamação, nenhuma lesão obteve o escore +3 e, apenas uma, +2. O processo inflamatório não pareceu interferir na expressão das proteínas p53 e p63 (Figuras 8, 9 e 10).

Os grupos de COs com processo inflamatório de diferentes intensidades (discreto, moderado e intenso) foram comparados quanto a imunoexpressão do Ki-67, p53 e p63.

Os casos que exibiam inflamação discreta, moderada e intensa apresentaram um aumento na expressão do Ki-67 estatisticamente significativa, quando comparados aos casos livres de processo inflamatório (*Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ; Figura 13*). Esta diferença não foi observada para o p53 (*Kruskal-Wallis,  $p = 0,2252$* ) e p63 (*Kruskal-Wallis,  $p = 0,1040$* ).

Figura 13. Box-Plot. Comparação da imunoposição do Ki-67 em COs sem inflamação e segundo a intensidade do processo inflamatório. Salvador, Bahia, 2006.



Nota: SI= Sem Inflamação; ID=Inflamação Discreta; IM=Inflamação Moderada; II=Inflamação Intensa

Cistos satélites foram observados em vinte e sete lesões (90%). A distribuição da imunomarcagem para as proteínas Ki-67, p53 e p63, nas células dos cistos satélites, foi semelhante a do epitélio cístico, predominando a marcação de células mais próximas à luz cística. Estatisticamente, não houve correlação entre a presença de cistos satélites e a maior expressão para o Ki-67, p53 e p63 (Tabelas 21, 22 e 23).

Tabela 21. Ki-67. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>Ki-67</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
COs com cistos satélites (n=27)	214,3±197,5	p=0,7775
COs sem cistos satélites (n=10)	209,5±180,4	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Tabela 22. p53. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>p53</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
COs com cistos satélites (n=25)	631,0±278,0	p=0,1059
COs sem cistos satélites (n=9)	453,1±229,9	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Tabela 23. p63. Comparação entre COs com e sem cistos satélites. Salvador, Bahia, 2006.

	<i>p63</i>	<i>p</i>
	Média±DP	
COs com cistos satélites (n=27)	970,2,0±259,4	p=0,7068
COs sem cistos satélites (n=10)	1058,5±413,4	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

A imunomarcção para a laminina mostrou-se predominantemente contnua (n=18; 90%), inclusive em reas de acantose e desprendimento epitelial (Figuras 11 e 12).

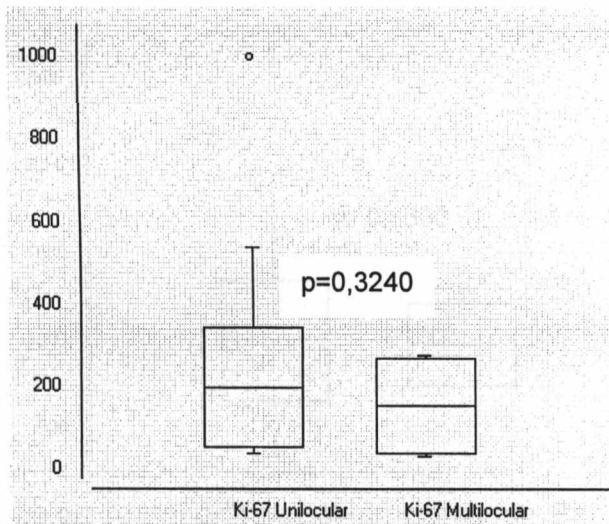
Das lesões cuja expresso da laminina foi predominantemente contnua, a marcao para esta proteina esmaeceu em regies de processo inflamatrio, especialmente quando o mesmo mostrava-se intenso (Figura 12).

### 5.7 Associaes clnica, imaginolgica e imuno-histoqumica

As expresso das proteinas Ki-67, p53 e p63 foi comparada entre as localizaes anatmicas em regio posterior de mandbula (Corpo e Ramo) e demais localizaes (Snfise/Parasnfise e Regio posterior de maxila). O Teste de Mann-Whitney no demonstrou diferena na imunomarcção destas proteinas, nos sítios anatmicos considerados (Ki-67,  $p= 0,5051$ ; p53,  $p= 0,6292$ ; p63,  $p=08987$ ).

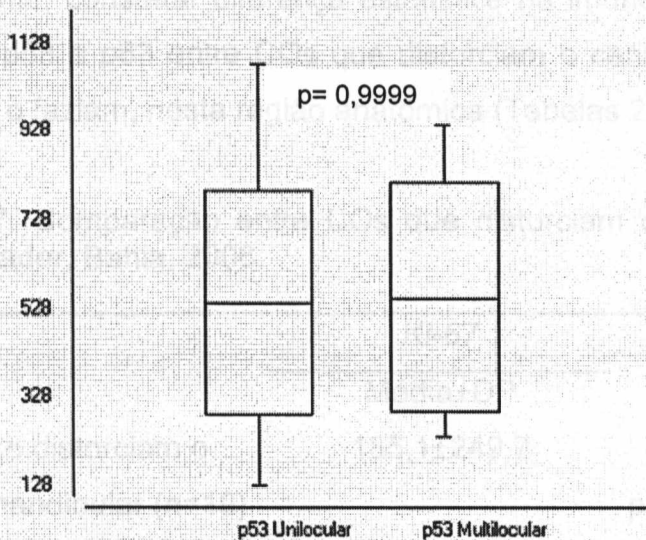
Em relao a caractersticas imaginolgicas, comparando-se as leses de aspectos unilocular e multilocular, no foi possvel constatar diferena de imunomarcção para as proteinas Ki-67, p53 e p63 (Figuras 14, 15 e 16)

Figura 14. Box-Plot. Diferença na imunomarcacão para o Ki-67 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006.



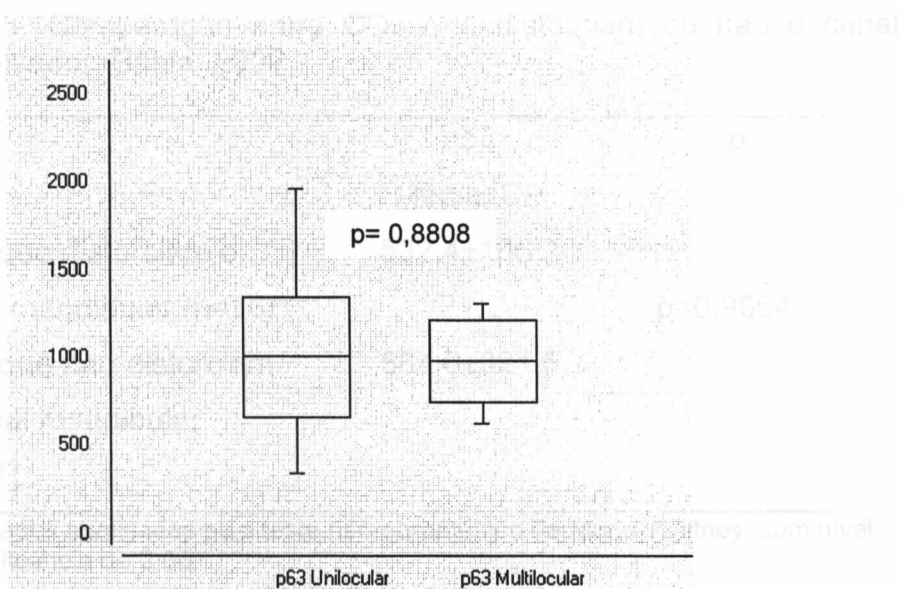
Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Figura 15. Box-Plot. Diferença na imunomarcacão para o p53 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006.



Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Figura 16 Box-Plot. Diferença na imunomarcagem para o p63 entre lesões de aspecto imagiológico uni e multilocular. Salvador, Bahia, 2006.



Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Das trinta e uma lesões que acometeram a região posterior de mandíbula, dezenove (51,3%) distorciam o canal mandibular. Não foi possível, entretanto, constatar diferença estatística na imunoexpressão das proteínas Ki-67, p53 e p63 entre COs que distorciam o canal mandibular e aqueles que não o faziam, nesta região anatômica (Tabelas 24, 25 e 26).

Tabela 24. Ki-67. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.

	Ki-67	p
	Média±DP	
COs que distorciam o canal mandibular (n=19)	185,1±249,7	p=0,8989
COs que não distorciam o canal mandibular (n=12)	249,7±287,0	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Tabela 25. p53. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.

	p53	p
	Média±DP	
COs que distorciam o canal mandibular (n=16)	532,4±196,2	p=0,9064
COs que não distorciam o canal mandibular (n=11)	564,6±321,5	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Tabela 26. p63. Comparação entre COs que distorciam ou não o canal mandibular. Salvador, Bahia, 2006.

	p63	p
	Média±DP	
COs que distorciam o canal mandibular (n=16)	975,6±254,1	p=0,7303
COs que não distorciam o canal mandibular (n=11)	1031,3±373,3	

Nota: Dados analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.



Figura 4. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) Lesão cística exibindo epitélio de revestimento atrófico, cápsula pouco densa e ausência de inflamação (H/E, 40x); (B) Epitélio cístico de superfície corrugada e placa de acantose (seta), (H/E, 40x); (C) Epitélio cístico exibindo placas de acantose (H/E, 100x); (D), (E) e (F) Células basais dispostas em paliçada e algumas células suprabasais exibindo edema intracelular, em áreas de desprendimento epitelial ((D), H/E, 100x; (E) e (F), H/E, 200x) Salvador, Bahia, 2006.

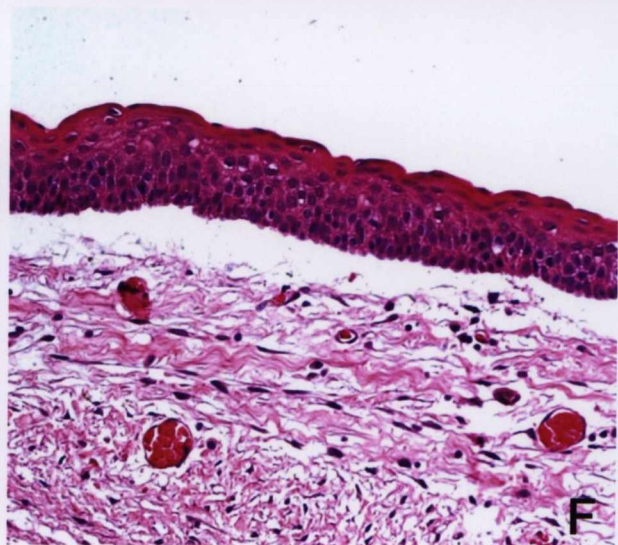
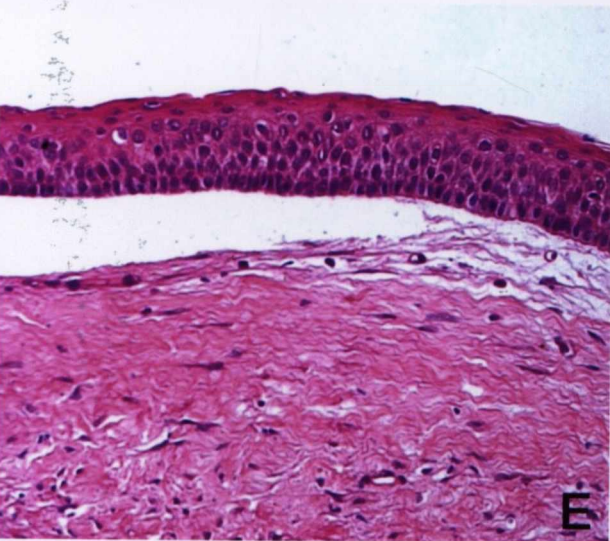
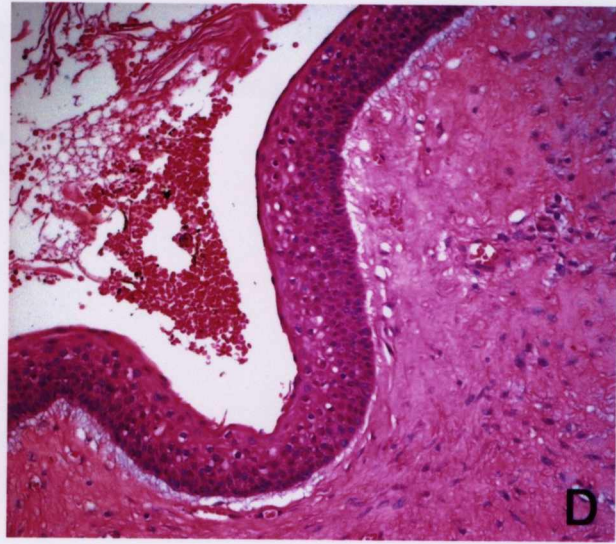
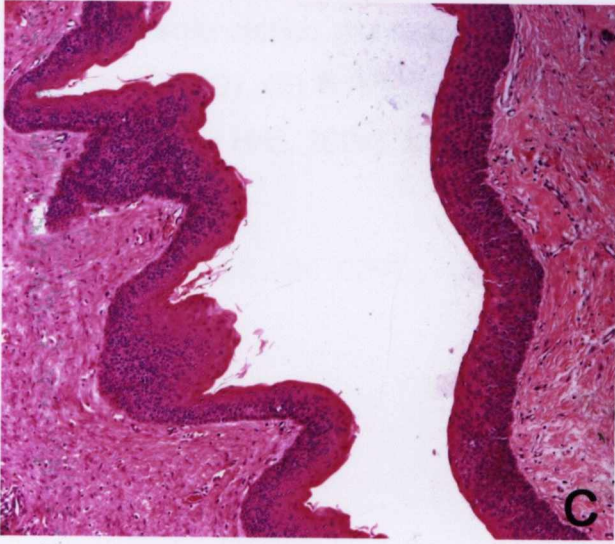
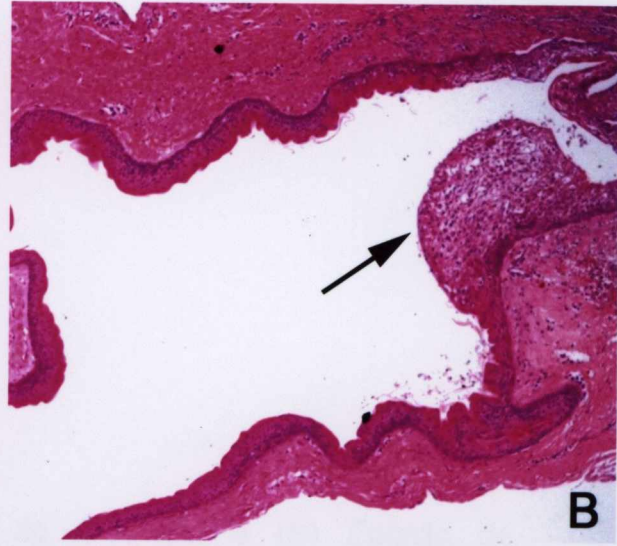


Figura 5. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) e (B) Epitélio de revestimento cístico exibindo proliferação de células basais “em broto” (H/E, 100x); (C), (D), (E) e (F) Cistos satélites na cápsula da lesão ((C) e (D) H/E 40x; (E) e (F) H/E, 100x). Salvador, Bahia, 2006.



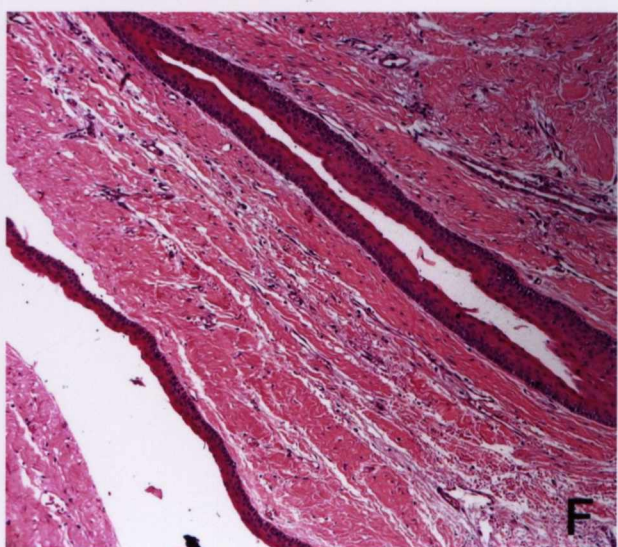
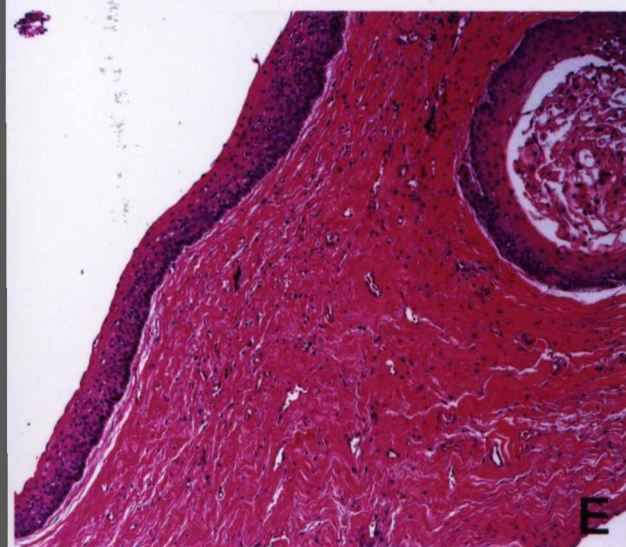
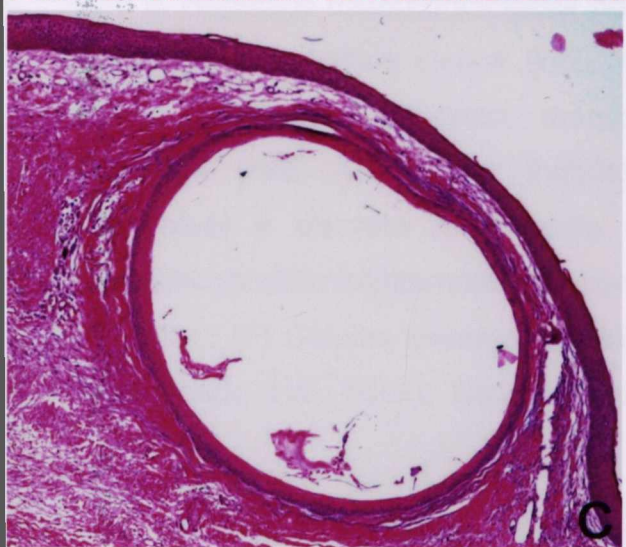
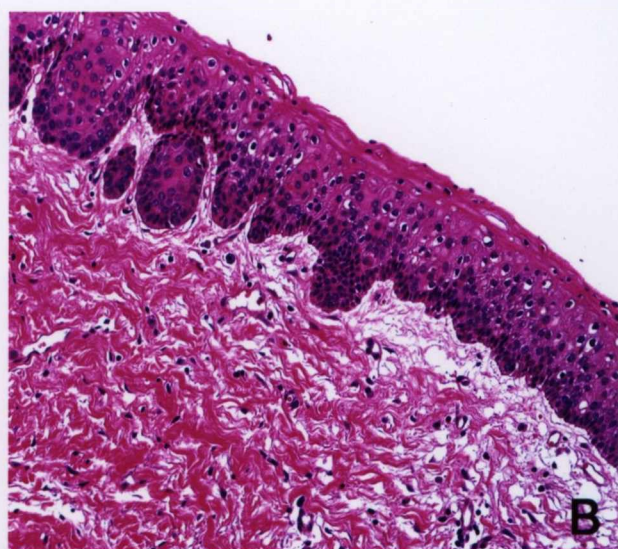
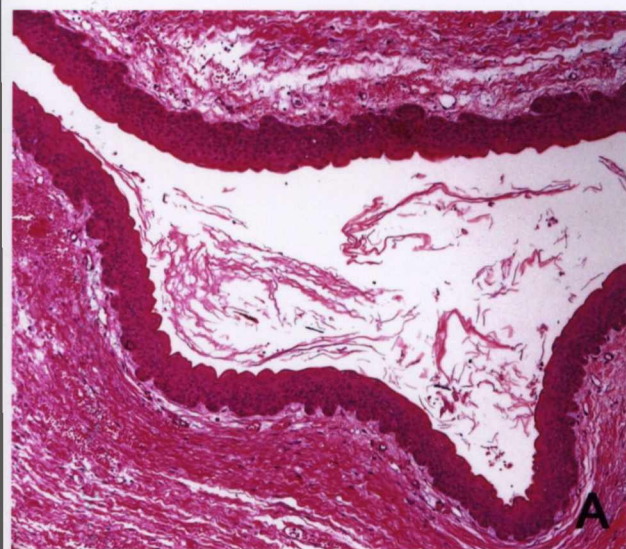


Figura 6. Aspectos histomorfológicos do CO. (A) e (B) Ausência de processo inflamatório na cápsula cística (H/E, 400x e 200x, respectivamente); (C) Infiltrado inflamatório discreto, mononuclear e áreas de hiperemia e hemorragia (H/E, 100x); (D) Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e discreto na cápsula cística (H/E, 200x); (E) Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e intenso na cápsula cística (H/E, 200x); (F) Células escamosas exibindo discretas atipias de significado indeterminado (H/E, 400x). Salvador, Bahia, 2006.



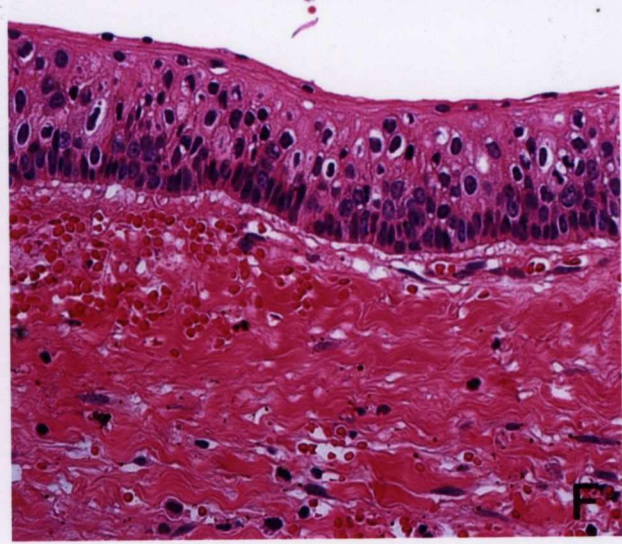
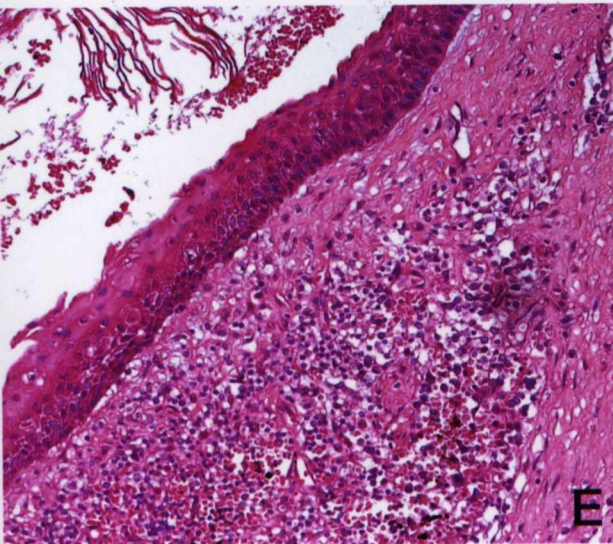
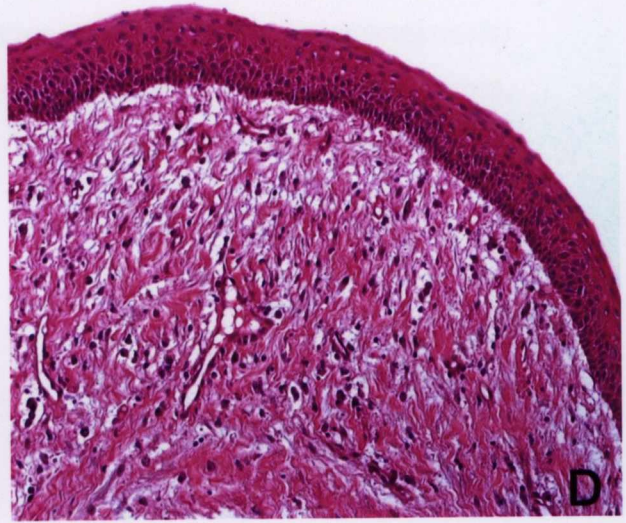
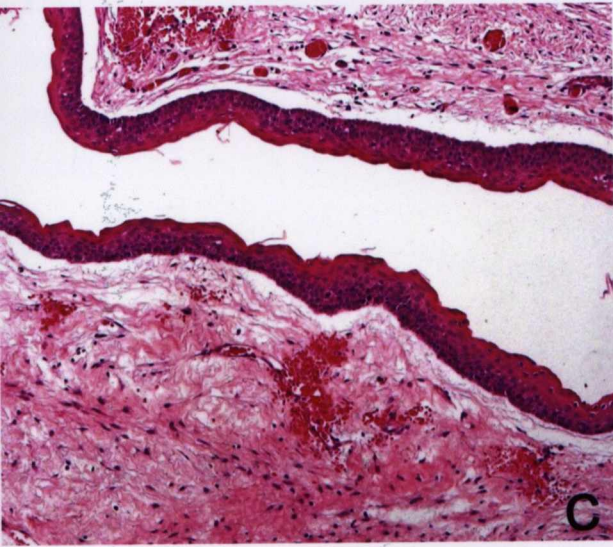
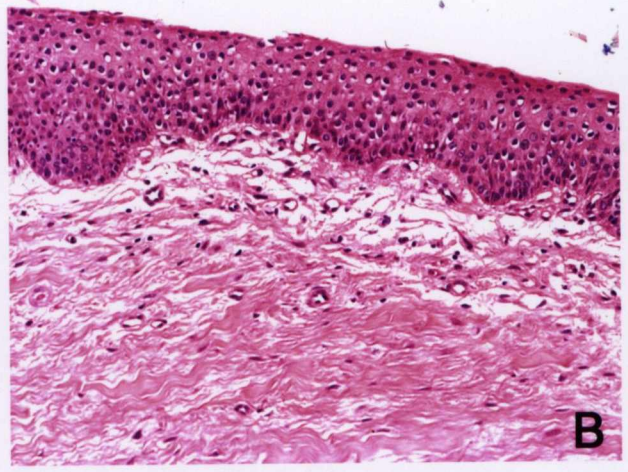
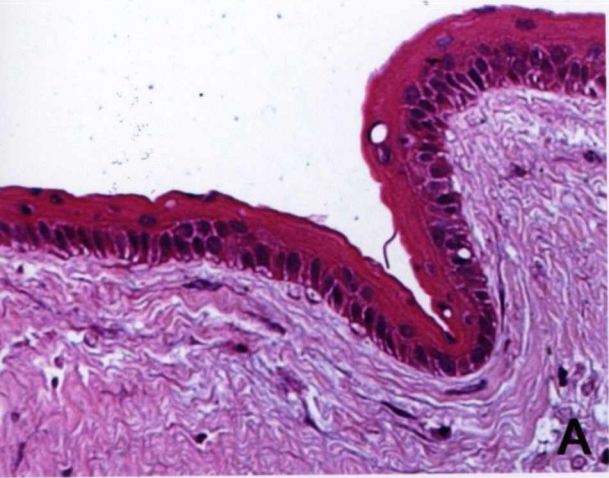


Figura 7. Aspectos histomorfológicos do CO. (A), (B), (C) e (D) Membrana basal PAS positiva ligada ao epitélio cístico em áreas de desprendimento epitelial (PAS, 200x, 400x, 200x e 200x, respectivamente). Salvador, Bahia, 2006.



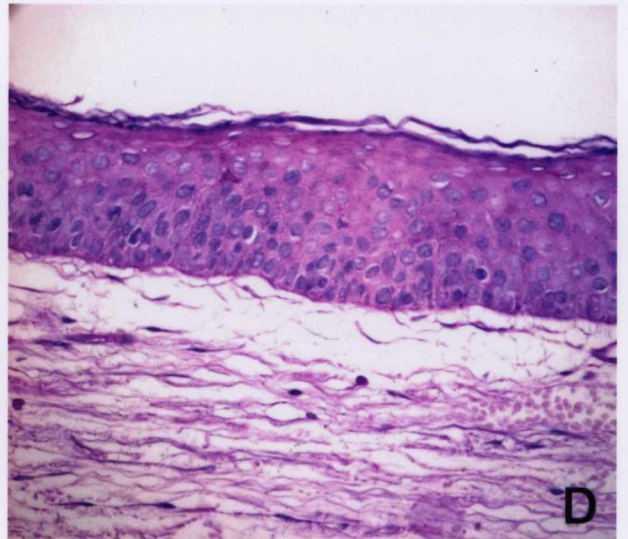
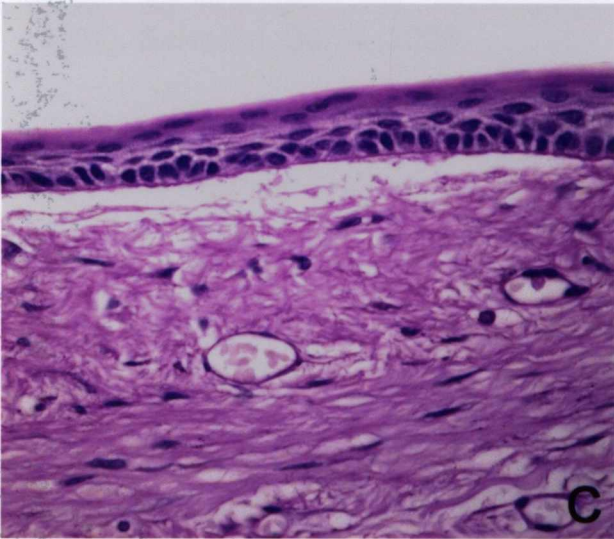
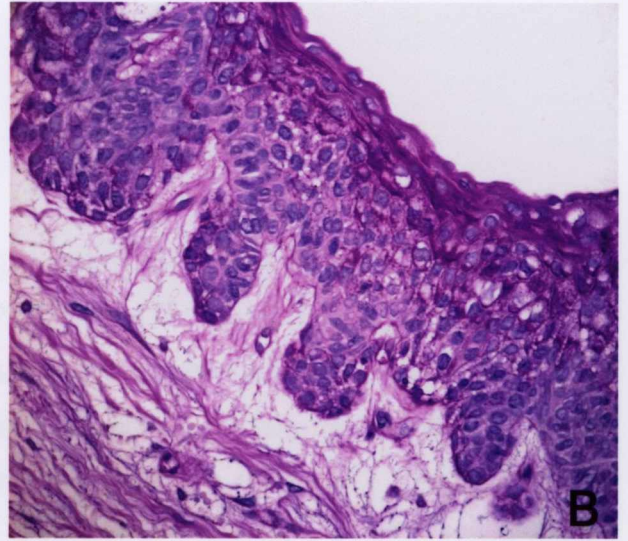
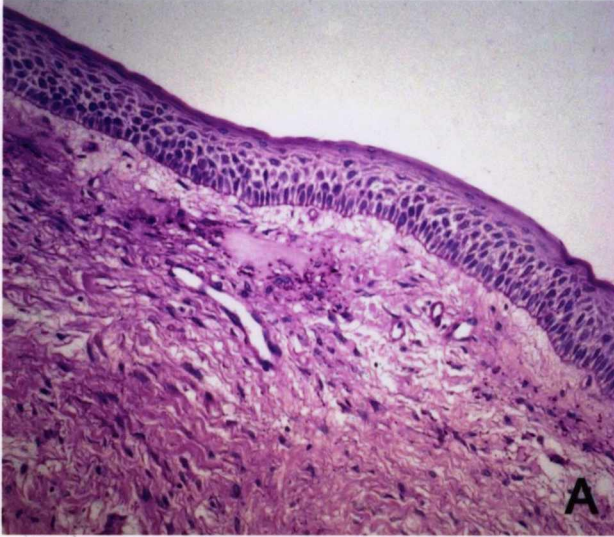




Figura 8. Imunomarcção para o anticorpo anti-Ki-67. (A) Epitélio cístico exibindo menos de 5% de células marcadas (HRP EnVision™, 400x). (B), (C) e (D) Epitélio cístico exibindo, predominantemente, marcação supra-basal e escore +1 (HRP EnVision™, 400x); (E), (F) e (G) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +2 (HRP EnVision™, 400x); (H) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +3 (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006.

Nota: Escore +1 (6 a 25% de células positivas); Escore +2 (26 a 50% de células positivas); Escore + 3 (> 51% de células positivas).

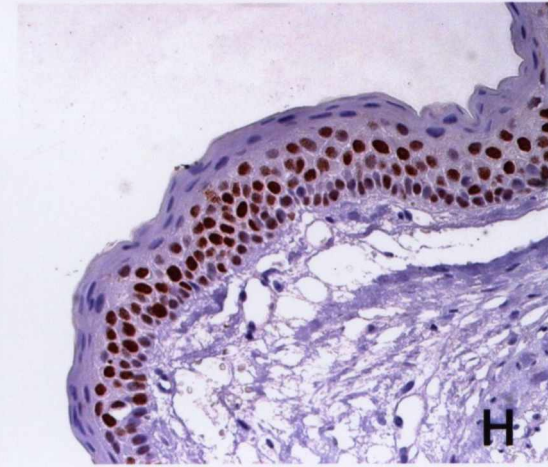
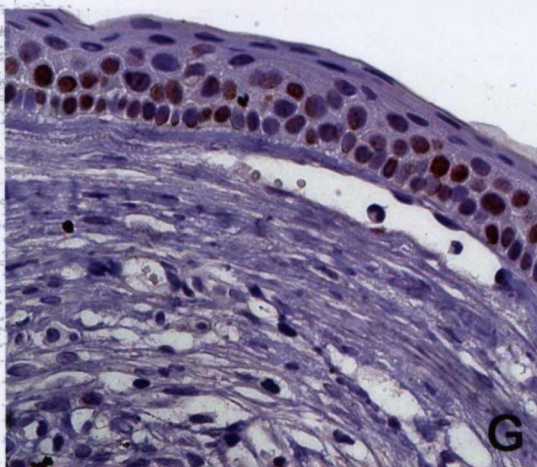
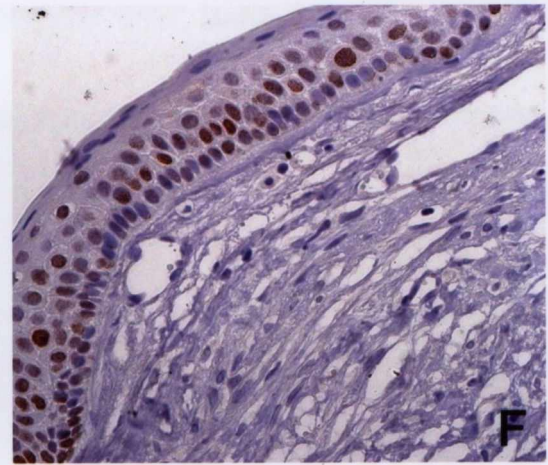
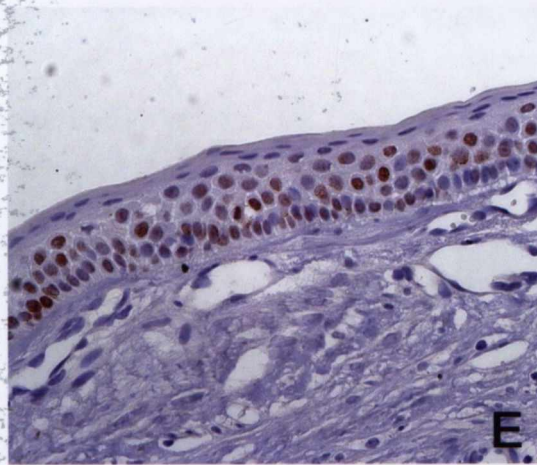
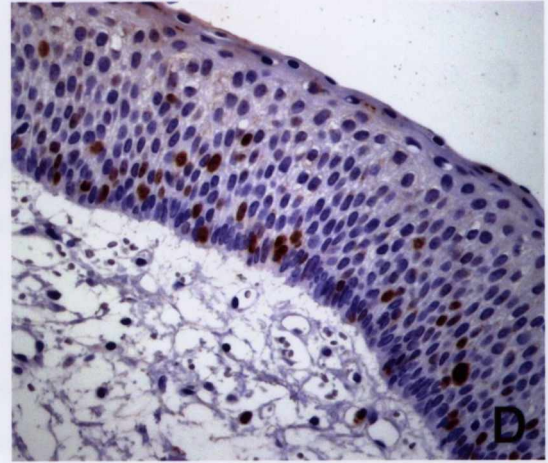
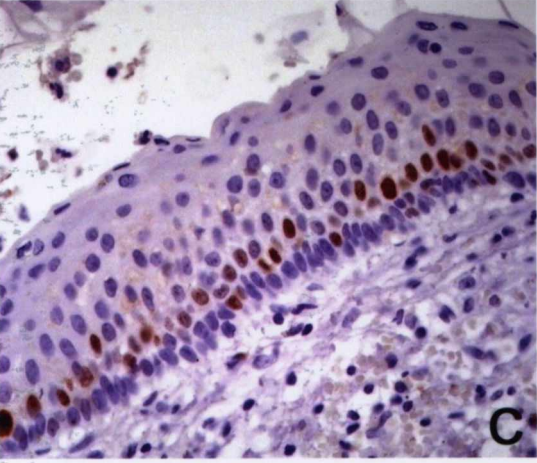
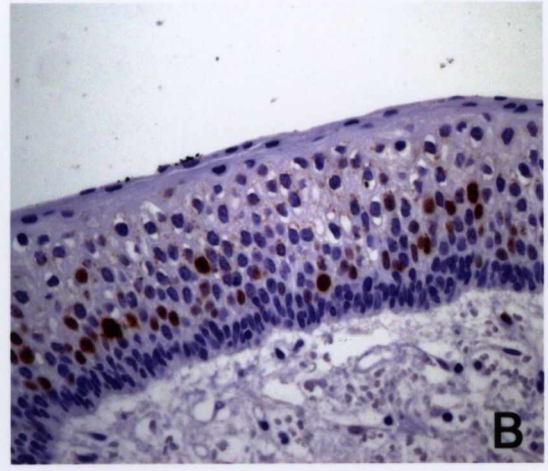
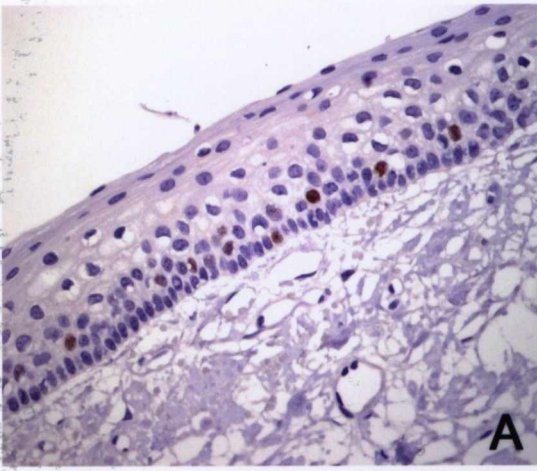


Figura 9. Imunomarcção para o anticorpo anti-p53. (A) Epitélio cístico exibindo menos de 5% de células imunomarcadas (HRP EnVision™, 400x). (B) e (C) Epitélio cístico exibindo, predominantemente, marcação supra-basal e escore +1 (HRP EnVision™, 400x); (D) e (E) Epitélio cístico exibindo predominantemente marcação supra-basal e escore +2 (HRP EnVision™, 400x); (F), (G) e (H) Epitélio cístico exibindo escore de marcação +3 (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006. Salvador, Bahia, 2006.

Nota: Escore +1 (6 a 25% de células positivas); Escore +2 (26 a 50% de células positivas); Escore + 3 (> 51% de células positivas)



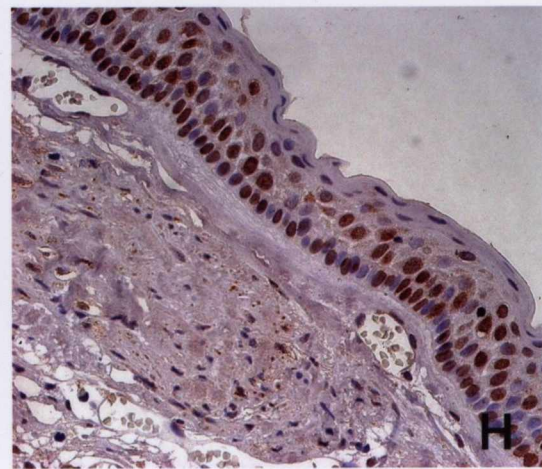
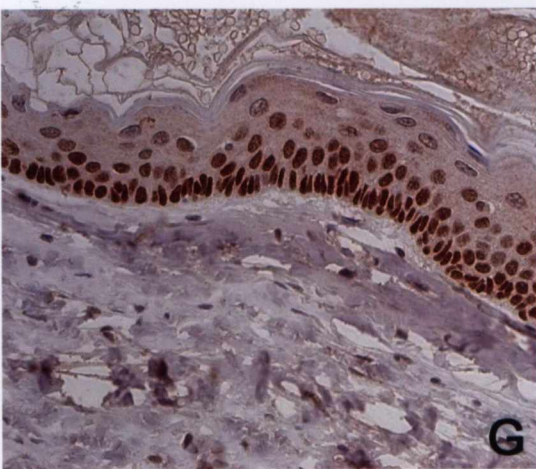
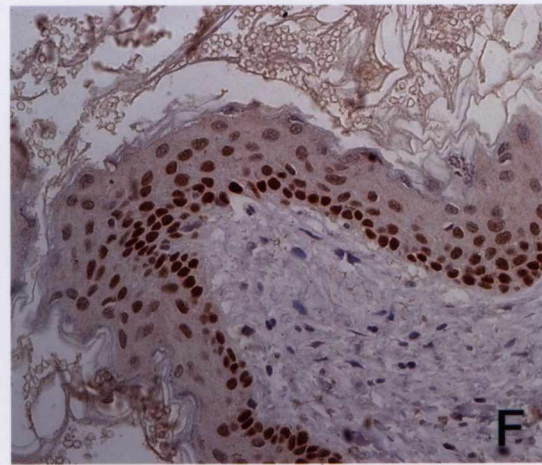
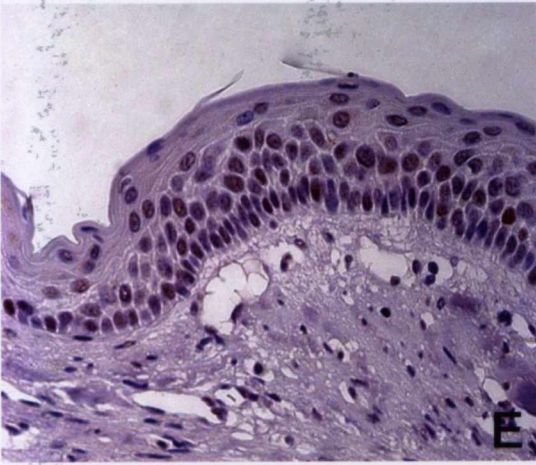
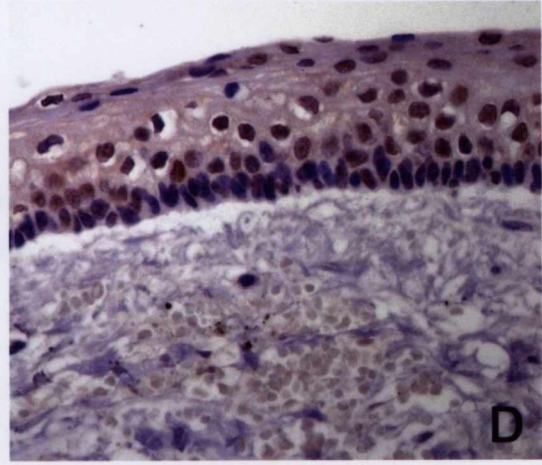
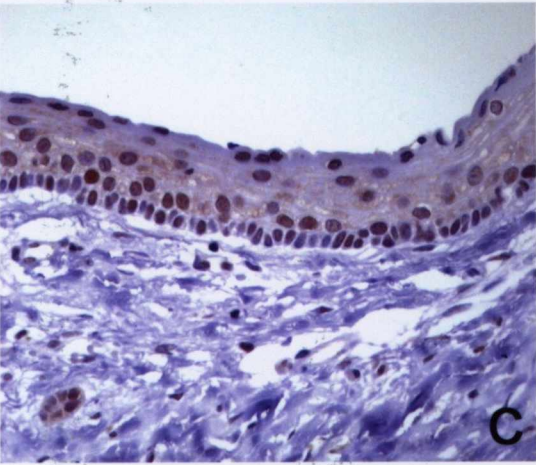
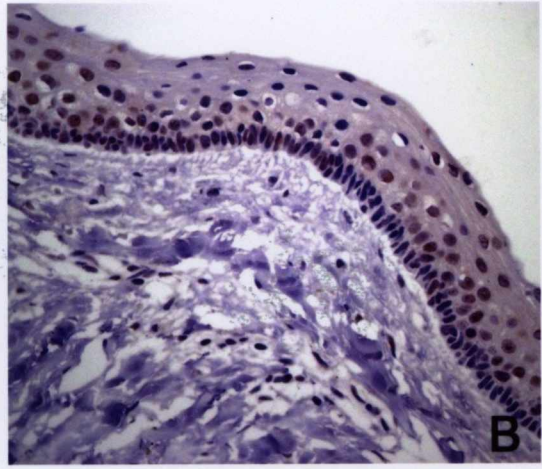
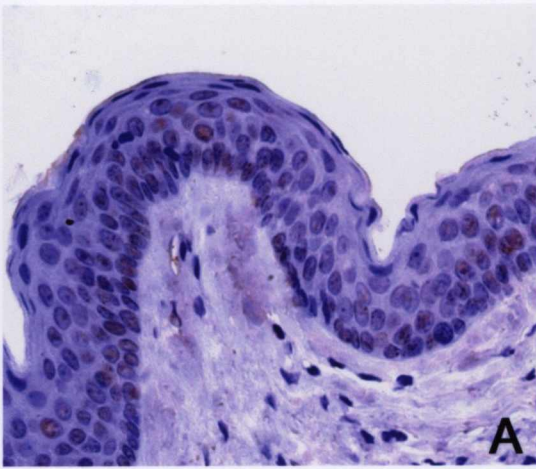


Figura 10. Imunomarcção para o anticorpo anti-p63. (A) até (H) Epitélios císticos exibindo escore +3 (HRP EnVision™, 400x). Salvador, Bahia, 2006.



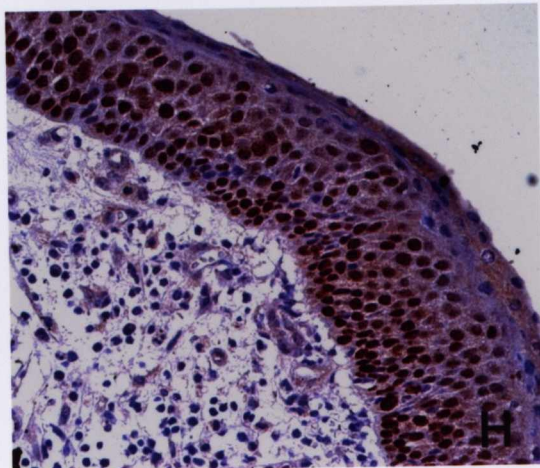
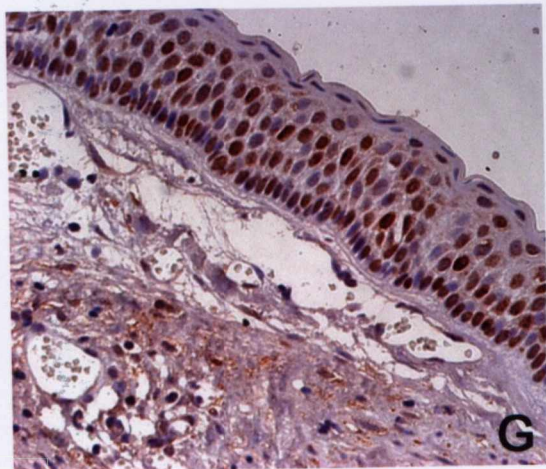
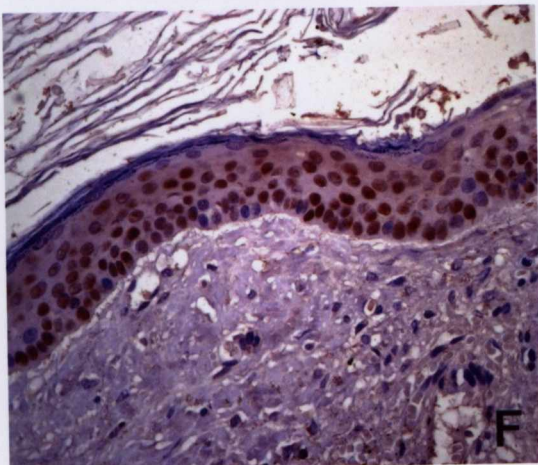
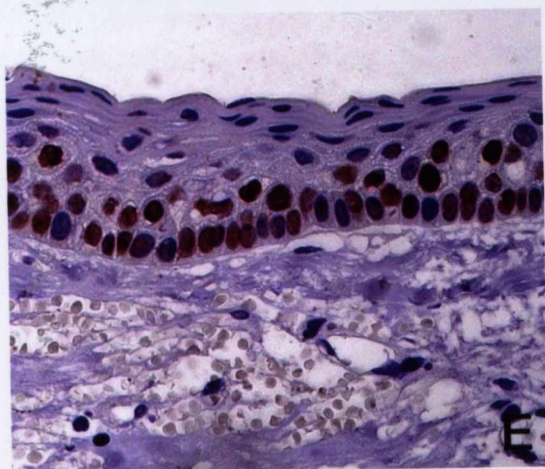
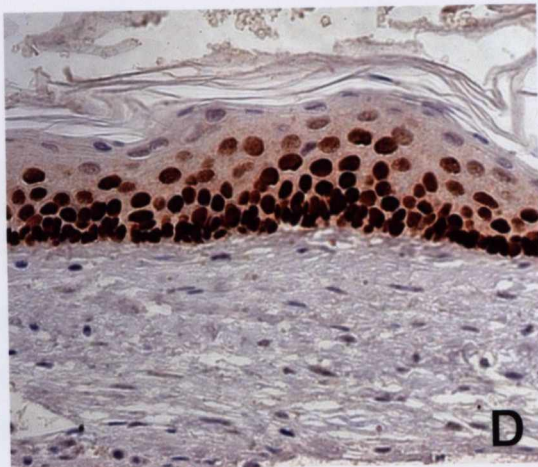
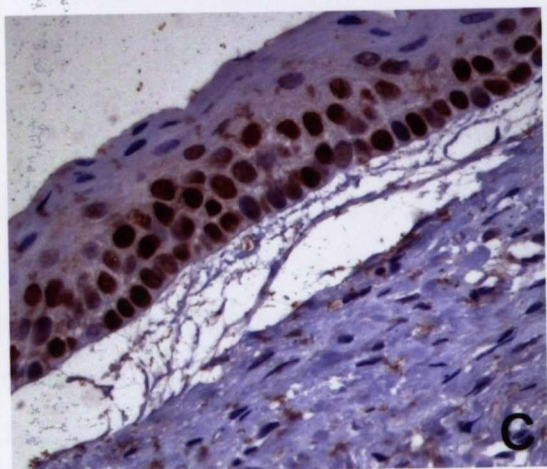
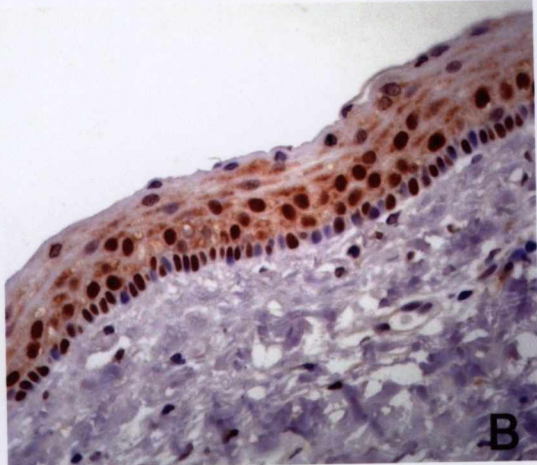
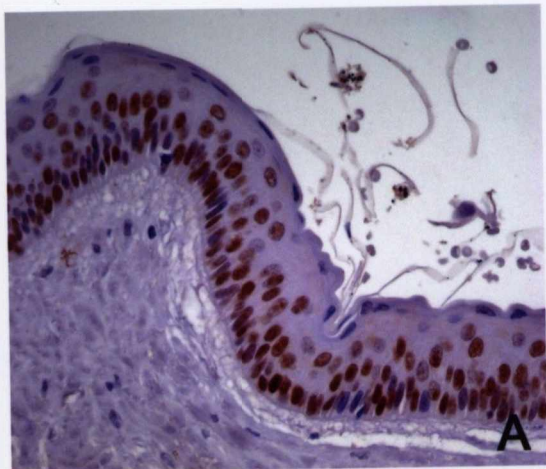
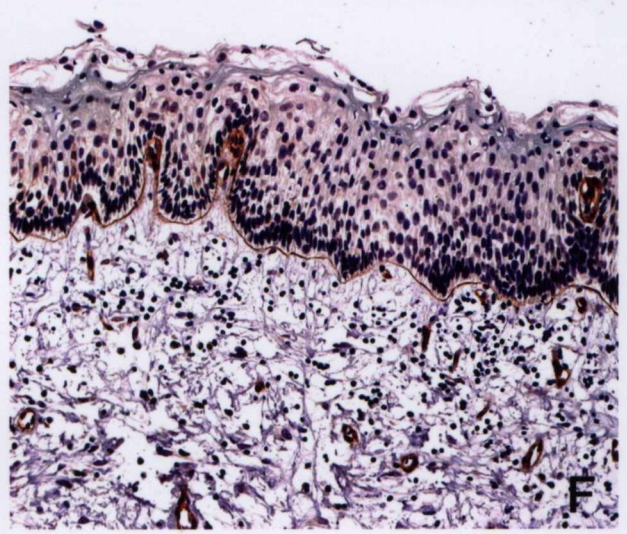
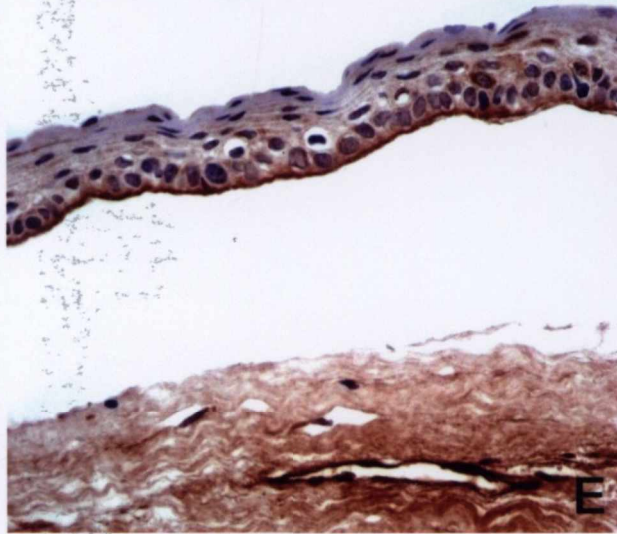
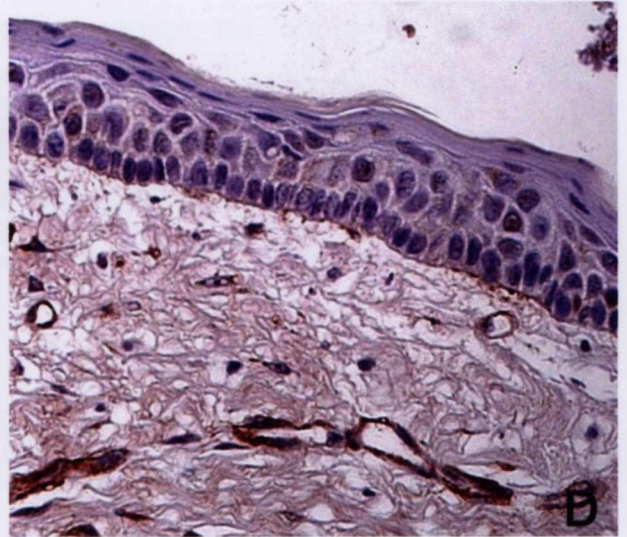
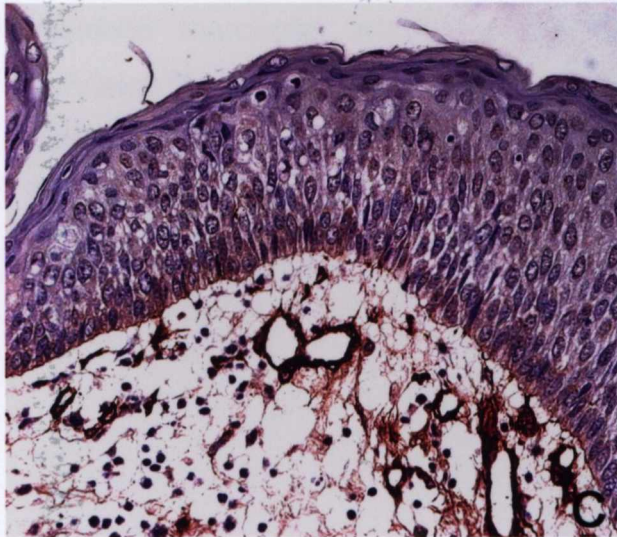
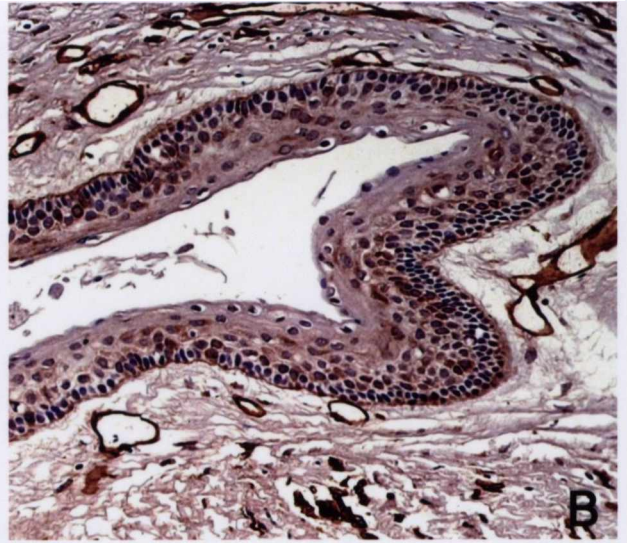
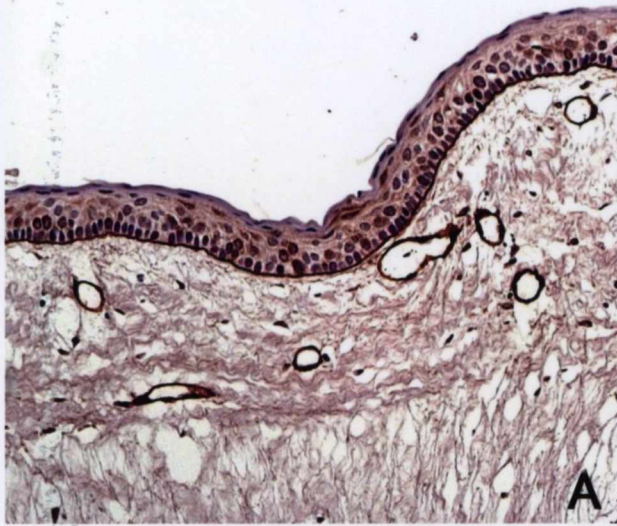


Figura 11. Imunomarcacão para o anticorpo anti- laminina. (A) MB exibindo marcao contínua e intensa (HRP EnVision™, 200x); (B) MB exibindo marcao moderada e contínua (HRP EnVision™, 200x); (C) e (D) MB exibindo marcao discreta e contínua (HRP EnVision™, 400x); (E) MB ligada ao epitelo de revestimento cístico, exibindo marcao intensa e contínua em área de desprendimento epitelial (HRP EnVision™, 400x); (F) MB exibindo marcao discreta e contínua, circundando os "brotos" epiteliais (HRP EnVision™, 200x). Salvador, Bahia, 2006.







## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Perfil epidemiológico, características clínicas e imaginológicas

Estudos epidemiológicos retrospectivos, em populações distintas, têm demonstrado características clínicas e imaginológicas peculiares em pacientes com CO.

Em relação a idade, a quarta (ODA et al., 2000; MORGAN et al., 2005) e terceira décadas de vida (STOELINGA, 2001; CHIRAPATHOMSAKUL et al., 2006; MAURETTE, JORGE, MORAES, 2006) corresponderam a faixa etária de maior prevalência do CO. Neste estudo, dez pacientes (33,3%) tinham entre dez e vinte anos de idade, refletindo uma maior incidência e prevalência do CO em indivíduos jovens.

A inclusão de cinco pacientes com a SCBCN pode ter colaborado para uma faixa etária menor nesta amostra, uma vez que estes pacientes são diagnosticados ainda na infância quanto à presença de CO. Além disso, para a classificação dos pacientes em faixas etárias, levou-se em consideração a idade do primeiro diagnóstico, inclusive para os catorze casos de recidivas.

Alguns autores excluem pacientes síndrômicos das amostras de CO por considerarem que, nestes indivíduos, esta patologia assume características biológicas distintas e, inclusive, um comportamento clínico mais agressivo (STOELINGA, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; AMORIM et al., 2004; KOLAR et al., 2006).

Entretanto, estudos genéticos têm demonstrado que pacientes que manifestam CO esporádico podem ser portadores de mutações no gene *PTCH* (BARRETO et al., 2002, SHEAR et al., 2002b) e muitos poderiam expressar um fenótipo síndrômico mais discreto, já que, apesar da penetrância completa, a mutação neste gene pode ser manifestada com uma

expressividade variável, corroborando para os estudos que indicam um comportamento neoplásico para o CO (SHEAR, 2002b; SHEAR, 2002c; AULUCK, PAI, 2003; SHEAR, 2003). Dessa forma, os COs de pacientes sindrômicos, nesta amostra, não foram avaliados separadamente.

Nesta amostra, homens foram acometidos em 53,3% (n=16) dos casos e mulheres em 46,7% (n=14). Apesar de Oda et al. (2000), Myoung et al. (2001), Morgan et al. (2005) e Chirapathomsakul et al. (2006) relatarem uma predileção para o gênero masculino, Stoelinga (2001) e Massey (2005), ressaltaram uma equivalência entre homens e mulheres, como observado neste estudo.

Segundo Stoelinga (2001), o CO é mais comum em pessoas de pele branca. Entretanto, o perfil racial da população de Salvador, composta predominantemente por negros, provavelmente contribuiu para uma amostra composta especialmente por melanodermas (n=18).

Em acordo com a literatura (MYOUNG et al., 2001; STOELINGA, 2001; MASSEY, 2005; MORGAN et al., 2005; CHIRAPATHOMSAKUL et al., 2006), a região posterior de mandíbula foi preferencialmente acometida (n=31) e, oito e catorze lesões estavam associadas a coroa de dentes e região periapical, respectivamente, provavelmente pela presença de restos embrionários da lâmina dentária nestes sítios anatômicos.

Na região posterior de mandíbula, doze lesões recidivaram. Apesar de Myoung et al. (2001) descreverem uma relação estatisticamente significativa entre este sítio anatômico e recidivas, não foi possível determiná-la nos pacientes desta amostra (p=0,5927).

Phillipsen (2005) considera que, na maioria dos casos, as lesões de CO são assintomáticas e descobertas em exames imagiológicos de rotina. Nesta amostra, quinze pacientes (n=50%) apresentaram algum sinal e/ou

sintoma, sendo que a dor e aumento de volume, concomitantemente (n=7), representaram aspectos clínicos importantes, também observados por El-Hajj, Anneroth (1996), e colaboraram para a investigação diagnóstica nestes pacientes, especialmente através de radiografias panorâmicas.

Apesar do CO assumir diversos padrões radiográficos, a radiolucência unilocular, com margens bem definidas é a mais comum (STOELINGA, 2001; CHIRAPATHOMSAKUL et al., 2006; GIULIANI et al., 2006). Das trinta e sete lesões avaliadas, vinte e seis (70,2%) assumiam esta característica, a qual não distingue o CO de outros cistos e tumores odontogênicos, dificultando o diagnóstico imaginológico diferencial.

Nesta investigação, em dez lesões (27%), não havia associação do CO com unidades dentárias, sendo que três e onze lesões reabsorviam raízes e deslocavam unidades dentárias, respectivamente. Expansão óssea, por aposição, não foi identificada em nenhum dos casos estudados. Estas características ratificam os estudos de Myoung et al. (2001) e Stoelinga (2001).

Forssell et al. (1988) e Chirapathomsakul et al. (2006) ressaltaram que CO com aparência imaginológica multilocular têm uma maior tendência a recidiva que a variante unilocular, especialmente pela maior dificuldade de remoção do CO. Entretanto, nesta amostra, não foi possível estabelecer uma associação entre estas variáveis, pelo tamanho reduzido de lesões com aparência multilocular (n=6).

O tratamento do CO ainda permanece em discussão, especialmente pelo seu comportamento localmente agressivo. Pogrel, Jordan (2004), Stoelinga (2001) e Maurette, Jorge, Moraes (2006) ressaltaram que protocolos terapêuticos conservadores, tais como enucleação, curetagem e marsupialização, contribuem para a preservação de estruturas anatômicas, tecidos moles e unidades dentárias.

A enucleação cirúrgica seguida de curetagem óssea foi a conduta terapêutica em trinta e quatro lesões (91,9%), uma vez que este é o protocolo do Serviço de Cirurgia Buco-maxilo-facial da FOUFBA. Além disso, os pacientes acometidos com CO são, em sua maioria, adultos jovens e os tratamentos conservadores reduzem a morbidade, a necessidade de reconstruções ósseas e favorecem a reinserção social mais rapidamente.

Os índices de recidiva são variáveis entre os estudos, especialmente pela diversidade de técnicas cirúrgicas adotadas, além de diferentes períodos de proervação. No estudo de Stoelinga et al. (2001), onze por cento dos COs recidivaram (n=9). Já El-Hajj, Anneroth (1996) estudaram, retrospectivamente, sessenta e dois pacientes com CO, dos quais dezenove (30,5%) exibiram recidivas. Ambos trabalhos ressaltaram que a maioria das lesões recidivantes ocorreram em um período de até cinco anos

Neste estudo, catorze pacientes (46,67%), cursaram com recidiva especialmente em região posterior de mandíbula, em um tempo médio entre doze e vinte e quatro meses (n=8), após intervenção cirúrgica. Cabe ressaltar que as lesões dos cinco pacientes sindrômicos incluídos nesta amostra eram COs primários e, portanto, não contribuíram para este índice.

Para Shear (2002b), Auluck, Pai (2003), Shear (2003), a presença de CO, múltiplos ou não, pode estar associada à expressividade variável da SCBCN e, dessa forma, pacientes com CO recorrentes devem ser investigados quanto a presença da síndrome, mesmo na ausência de outras características clínicas, especialmente através de estudos genéticos.

A maioria das recidivas parece ocorrer nos primeiros cinco anos após a primeira intervenção cirúrgica (PARTRIDGE, TOWERS, 1987; STOELINGA, 2001). Assim, o controle anual, por tempo indeterminado, através de radiografias panorâmicas tem especial valor, uma vez que permite o

diagnóstico precoce de lesões recidivantes, além de contribuir para estudos longitudinais, escassos na literatura.

Os pacientes desta amostra permanecem em acompanhamento nos ambulatórios de Radiologia e Cirurgia Buco-maxilo-facial da FOUFBA, em períodos de seis meses e a perda de seguimento está sendo evitada através de contato telefônico com os pacientes, além da adoção de horários flexíveis para o comparecimento dos mesmos e gratuidade nos exames de imagem.

Diversos fatores podem estar associados às frequentes recidivas observadas em pacientes com CO. Dentre estes destacam-se: a cápsula friável, favorecendo áreas de desprendimento epitelial, e dificultando a remoção completa da lesão (FORSELL et al., 1988) e favorecendo a proliferação dos remanescentes epiteliais, a presença de cistos satélites (FORSELL et al. 1988; STOELINGA, 2001) e dificuldades de acesso a lesão durante o procedimento cirúrgico (STOELINGA, 2001; SHEAR, 2002b; KIM et al., 2003; CHIRAPATHOMSAKUL et al., 2006).

## 6.2 Histomorfologia e associação a aspectos clínicos e imaginológicos

As características histopatológicas típicas do CO estão bem documentadas na literatura e incluem um epitélio atrófico, paraceratinizado, cujas células da camada basal dispõem-se em paliçada, podendo exibir núcleos hipercromáticos (SHEAR, 2002; PHILIPSEN, 2005).

Alguns autores, como Partridge, Towers (1987), El-Hajj, Anneroth (1996), Stoelinga et al. (2001), Chirapathomsakul et al. (2006) e Foschini et al. (2006), incluíram em seus trabalhos o cisto odontogênico ortoceratinizado como uma variante do CO, cujos comportamentos clínico e biológico mostram-se menos agressivos, com poucas recidivas e menor potencial proliferativo do epitélio cístico. Desta forma, os resultados destes trabalhos

devem ser vistos de forma crítica e cuidadosa, uma vez que podem subestimar o real potencial agressivo do CO.

Todas as lesões incluídas nesta amostra foram revisadas quanto a sua histomorfologia, presença de infiltrado inflamatório, brotos epiteliais e cistos satélites, além da avaliação da membrana basal quanto a sua continuidade e ligação ao epitélio ou matriz extracelular, através da coloração pelo PAS.

Em apenas um CO foi possível identificar atipias de células escamosas. Kramer, Pindborg, Shear (1992) e Philipsen (2005) ressaltaram a necessidade de se avaliar a presença de displasia no epitélio de revestimento do CO, uma vez que a presença da mesma pode refletir um comportamento clínico distinto. Neste caso, entretanto, o paciente encontra-se em proervação, sem sinais de recidivas e, clinicamente, não manifesta características clínicas peculiares dos portadores da SCBCN.

Apesar de Ahlfors et al. (1984) considerarem a presença de cistos satélites mais comum em CO de pacientes síndrômicos, esta característica foi observada em catorze lesões (50%) de pacientes não síndrômicos.

O estudo estatístico através do teste de Fisher demonstrou uma relação estatisticamente significativa entre a presença de cistos satélites e recidivas, corroborando com os estudos de Stoelinga (2001) e Agaram et al. (2004) que sugeriram que estes microcistos capsulares poderiam representar uma possível invasão local da lesão e contribuiriam para um maior número de recidivas.

Neste estudo, observou-se uma associação estatística entre as lesões que exibiam padrão imagiológico multilocular e que distorciam o canal mandibular com a presença de cistos satélites ( $p=0,0167$  e  $p=0,0243$ , respectivamente). Estes parâmetros não foram comparados por nenhum dos autores consultados, mas cabe ressaltar, mais uma vez, que Forssel et al.

(1988) e Chirapathomsakul et al. (2006) afirmaram que CO com aparência imagiológica multilocular têm uma maior tendência a recidiva e, portanto, este critério deve ser avaliado quando do planejamento cirúrgico.

Na amostra avaliada, observou-se a presença de processo inflamatório em vinte e seis lesões (70,3%), sendo predominantemente mononuclear em vinte (54%) e discreto em doze (32,4%) destas. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por El-Hajj, Anneroth (1996) e Kaplan e Hirshberg (2004), os quais ressaltaram que a inflamação representa um achado histomorfológico frequente em CO, a qual pode decorrer da perfuração da cortical óssea, comunicação com o ligamento periodontal e infecções odontogênicas.

É importante ressaltar que o microambiente inflamatório parece colaborar com alterações morfológicas no epitélio de revestimento cístico, em especial para a acantose (DE PAULA et al., 2000; STOELINGA, 2001; KAPLAN, HIRSHBERG, 2004; CAMPOS et al., 2005), característica esta descrita em quinze COs (40,5%) desta amostra.

Dentre as as características histomorfológicas do CO, as áreas de desprendimento epitelial são típicas e refletem algum distúrbio envolvendo a matriz extracelular, em especial a MB. Em vinte e oito lesões (75,7%) analisadas neste estudo esta característica foi frequente e a coloração pelo PAS evidenciou que a MB encontrava-se ligada ao epitélio cístico, refletindo a importância desta estrutura na manutenção da morfologia, diferenciação e polarização epitelial (ALBERTS et al., 1997).

### 6.3 Aspectos imuno-histoquímicos e associação a histomorfologia

A identificação de proteínas teciduais através de imuno-histoquímica representa uma importante ferramenta para estudos de diversas patologias, especialmente quando é possível preservar os pacientes e correlacionar os



marcadores biológicos utilizados, com características clínicas e imaginológicas das lesões.

Alguns autores sugerem que o comportamento clínico do CO pode estar relacionado ao potencial proliferativo do seu epitélio de revestimento (LI et al., 1995; LO MUZIO et al., 1999). A identificação da via Shh na etiopatogenia desta patologia indica que a proliferação celular realmente representa um dos principais mecanismos envolvidos no comportamento distinto do CO e na sua etiopatogenia.

Estudos comparativos entre esta patologia e outros cistos de natureza odontogênica, tais como dentígero e radicular, têm demonstrado um maior potencial proliferativo no epitélio do CO (LI et al., 1994; LI et al., 1995; THOSAPORN et al. 2004) e comparável ao ameloblastoma (THOSAPORN et al., 2004) sendo que este critério é utilizado como um indicador de agressividade em diversas patologias, em especial neoplasias (SHEAR, 2002a; SARAÇOGLU et al., 2005).

Uma das estratégias amplamente utilizada por diversos autores para avaliar a fração de crescimento celular em CO é identificação da proteína Ki-67 no epitélio de revestimento cístico (LI et al., 1994; LI et al. 1995; LO MUZIO et al., 1999; DE PAULA et al., 2000; KAPLAN, HIRSHBERG, 2004), contribuindo para uma melhor compreensão da proliferação celular nesta patologia.

Como marcador de proliferação celular, o Ki-67 mostra-se superior ao PCNA, especialmente por não sofrer tanta influência de fatores exógenos e endógenos, sua expressão estar limitada a fases específicas do ciclo celular e meia-vida em torno de uma hora, permitindo detectar apenas células ciclizantes (BROWN, GATTER, 1990). Ao contrário, o PCNA tem meia-vida de dez horas e, dessa forma, é possível observar células que já saíram do ciclo celular (ARISAWA et al., 1999).



A distribuição de células imunomarcadas para este anticorpo, nas lesões estudadas, foi predominantemente suprabasal. Nas lesões dos pacientes síndrômicos, envolvia toda a espessura do epitélio cístico. Estes resultados sugerem uma desregulação do ciclo celular e contribuem para os estudos que indicam a presença de um compartimento proliferativo suprabasal no CO (LI et al., 1994; LI et al. 1995; LO MUZIO et al., 1999; KIM et al., 2003; KAPLAN, HIRSHBERG, 2004; KICHI et al., 2005).

Apesar da distribuição da proteína Ki-67 no epitélio cístico de pacientes síndrômicos ser mais uniforme, não se observou diferença estatisticamente significativa na imunomarcagem deste anticorpo, entre as lesões associadas a SCBCN e esporádicas ( $p= 0,7013$ ). Este resultado corrobora com os trabalhos de Li et al. (1995).

Kolar et al. (2006), utilizando o PCNA como marcador de proliferação celular, também não constataram diferença na expressão deste anticorpo entre os COs esporádicos e associados a SCBCN, ao contrário de Lo Muzio et al. (1999) que ressaltaram que a maior expressão de marcadores de proliferação celular em pacientes síndrômicos reflete um comportamento mais agressivo, especialmente pela maior tendência a recorrência.

Dessa forma, são necessários estudos com grupos maiores de pacientes síndrômicos, além da associação com outros marcadores de proliferação, tais como IPO-38 (THOSAPORN et al. 2004) e técnicas moleculares, na tentativa de melhor entender a proliferação celular em COs.

Associando-se características histomorfológicas e imuno-histoquímicas, a marcação para o Ki-67, nos cistos satélites, foi semelhante a do epitélio cístico, corroborando com os resultados de Li et al. (1995).

Segundo Kaplan, Hirshberg (2004), Saracoğlu et al. (2005), o processo inflamatório na cápsula cística parece influenciar, localmente, a proliferação de células do epitélio de CO, sem alterar, no entanto, a fração de crescimento da lesão, uma vez que a atividade proliferativa em CO parece ser irregular e independente da inflamação (KAPLAN, HIRSHBERG, 2004). Para De Paula et al. (2000), entretanto, citocinas e fatores de crescimento disponíveis no exsudato inflamatório poderiam favorecer a proliferação das células do epitélio do CO.

Neste estudo, comparando-se os COs que exibiam inflamação discreta, moderada ou intensa, com o grupo de lesões sem inflamação, observou-se uma associação entre a imunomarcagem mais acentuada para o Ki-67 e a presença de processo inflamatório na cápsula cística, independente da intensidade ( $p < 0,05$ ), resultados semelhantes aos de De Paula et al. (2000).

Ainda não há um consenso sobre a influência da inflamação na proliferação celular. Os trabalhos que investigaram estas questões utilizaram metodologias distintas. Kaplan, Hirshberg (2004) quantificaram as células inflamatórias associando estas ao número de células epiteliais ciclizantes, em cada campo analisado, permitindo constatar um aumento localizado na expressão do Ki-67 em áreas de inflamação, sem afetar a atividade proliferativa das lesões como um todo.

De Paula et al. (2000), por sua vez, avaliaram a imunomarcagem para o Ki-67 e PCNA por milímetro de membrana basal, não considerando o total de células por campo. Esta estratégia, porém, não permite avaliar o índice proliferativo da lesão, parâmetro este utilizado pela maioria dos estudos (KAPLAN, HIRSHBERG, 2004).

Neste trabalho, as lesões que exibiam inflamação discreta, moderada e intensa foram comparadas com outras livres de inflamação, segundo a quantidade de células imuno-marcadas para os anticorpos Ki-67, p53 e p63.

Apesar da associação entre o processo inflamatório e proliferação celular não ter sido realizada por campo, como proposto por Kaplan, Hirshberg (2004), a metodologia adotada neste trabalho permitiu avaliar a qualidade e intensidade da inflamação, bem como estabelecer os índices de proliferação celular em cada CO avaliado

Ainda em relação a atividade proliferativa no epitélio de revestimento do CO, alguns autores investigaram a expressão da proteína p53 (OGDEN et al., 1992; LOMBARDI et al., 1995; SLOOTWEG, 1995; LI et al., 1996; KICHI et al., 2005). O mecanismo biológico associado à expressão desta proteína no epitélio do CO ainda não está definido, entretanto o comportamento agressivo e a alta taxa de recidiva podem ser relacionados a esta imunexpressão (LOMBARDI et al., 1995).

Neste trabalho, trinta e quatro lesões (91,9%) foram positivas para a proteína p53 e o escore +3 o mais frequente (n=19; 51,35%). Não houve diferença significativa na imunomarcagem para esta proteína entre as nove lesões associadas a SCBCN e COs esporádicos (p=0,3195), bem como entre lesões primárias e recorrentes (p=0,9847), corroborando com os resultados de Lombardi et al. (1995), Li et al. (1996) e Piattelli et al. (2001).

O percentual de CO positivos para a p53, neste trabalho, foi superior aos de de Ogden et al. (1992), Lombardi et al. (1995) e Piattelli et al. (2001). A utilização do Sistema EnVision™ para realização da técnica imunohistoquímica pode ter contribuído para este resultado, uma vez que o mesmo possui uma alta sensibilidade e tem como característica amplificar a imunomarcagem, segundo informações do fabricante (*Dako, Corporation, Carpinteria, USA*). Além disso, apenas COs paraceratinizados foram incluídos neste estudo, ao contrário dos demais autores supracitados que consideraram a variante ortoceratinizada em suas amostras

A maioria das células positivas para o anticorpo anti-p53 encontravam-se nas camadas supra-basais do epitélio cístico, conforme demonstrado por Lombardi et al. (1995), Slootweg (1995), Li et al. (1996), Piattelli et al. (2001), Kichi et al. (2005) e Kolar et al. (2006). Apesar de, quantitativamente, não se observar diferença de imunomarcagem entre COs associados a SCBCN e esporádicos, a marcação no primeiro grupo mostrou-se mais intensa e a distribuição entre as camadas epiteliais mais homogênea, corroborando com os resultados de Lo Muzio et al. (2002).

O anticorpo utilizado neste trabalho (anti-p53; Clone DO-7, DAKO, Glostrup, Dynamarca) reconhece tanto a forma selvagem quanto a mutada da proteína p53 e a imuno-deteção desta parece estar relacionada a uma estabilização e acúmulo da sua forma mutada, refletindo uma regulação do ciclo celular em favor da proliferação (SLOOTWEG, 1995; PIATTELLI et al., 2001; SHEAR, 2002b). Isto pode justificar a associação estatística entre a expressão da p53, Ki-67 e p63 encontrada neste estudo ( $p < 0,05$ ).

Apesar do acúmulo da p53 sugerir uma mutação neste gene, alguns estudos vem demonstrando a presença da forma selvagem desta proteína em processos reativos e fisiológicos e, portanto, outros mecanismos podem estar relacionados à estabilização e deteção imuno-histoquímica da p53 selvagem (SHEAR, 2002b).

Para Slootweg (1995), a deteção desta proteína em COs, em sua forma mutada ou selvagem, sugere um distúrbio genético na regulação da proliferação celular e estudos moleculares devem ser conduzidos, na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos de participação do gene p53 na etiopatogenia do CO.

Li et al. (1996) sequenciaram os éxons de cinco a dez do gene p53 de pacientes com CO e não encontraram nenhuma anormalidade nas bandas detectadas por PCR e na análise do sequenciamento do DNA, entretanto,

apenas duas lesões foram analisadas, sendo necessário estudos com amostras maiores e que abordem outras regiões deste gene envolvidas em processos neoplásicos humanos.

Nesta amostra, não houve associação entre a presença de cistos satélites, processo inflamatório e a maior detecção da proteína p53, corroborando com os resultados de Lombardi et al. (1995). Na série de doze casos estudada por Ogden et al. (1992), os casos que não expressaram imuno-marcação para a p53 exibiam cistos satélites, enquanto que estes achados estavam ausentes nos casos com imunopositividade para a proteína. Estes achados, entretanto, podem ser em função "do acaso", especialmente pela amostra de apenas doze lesões destes autores.

Trabalhos que utilizam o anticorpo anti-p63 em lesões de natureza odontogênica são escassos na literatura e apenas dois investigam a expressão desta proteína em CO, sendo que ambos apresentam casuística menor quando comparada a este trabalho e incluíram a variante ortoceratinizada, reconhecida como uma patologia distinta e menos agressiva (THOSARPORN et al., 2004; PHILIPSEN, 2005).

Em todos os trinta e sete casos de CO estudados, a imunomarcação para a p63 foi intensa e as lesões exibiam escore +3. Além disso, todas as camadas do epitélio cístico estavam envolvidas, sendo a expressão desta proteína independente de aspectos clínicos investigados, tais como a recorrência ( $p=0,9127$ ) e associação com a SCBCN ( $p=0,2427$ ).

Em 2005, Lo Muzio et al. (2005) publicaram o primeiro trabalho que descreveu a imunomarcação da proteína p63 em CO, sem considerar, entretanto, parâmetros clínicos e imaginológicos e incluindo a variante ortoceratinizada.

Estes autores observaram uma intensa positividade nas células do epitélio deste cisto, incluindo as células mais superficiais e em 64% dos casos, esta marcação mostrou-se intensa em até 50% das células do epitélio cístico.

Apesar dos resultados similares, a percentagem de células marcadas, em cada caso, mostrou-se superior na amostra deste estudo, provavelmente pela não inclusão de casos ortoceratinizados, nesta amostra,, além da utilização do Sistema EnVision™.

Em 1998, Li et al. descreveram pela primeira vez a proteína p63, ressaltando a existência de diferentes isoformas, TAp63 e  $\Delta$ Np63, com funções distintas. Conforme descrito na revisão da literatura, as isoformas que possuem um domínio de transativação, TAp63, favorecem a apoptose, enquanto as  $\Delta$ Np63 são anti-apoptóticas, estão expressas em células imaturas e aquelas com capacidade proliferativa evidente, propriedades importantes na tumorigênese.

Segundo informações do fabricante (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), o clone 4A4, utilizado nas reações imuno-histoquímicas deste trabalho, reconhecem tanto as isoformas TAp63 quanto  $\Delta$ Np63. Entretanto, Nylander, Coates, Hall (2002) verificaram que este clone marca apenas as isoformas não-transativadas, em epitélios escamos estratificados.

Para Nylander, Coates, Hall (2002) e Barbieri, Pietenpol (2005), ainda é questionável se as formas transativadas da p63 são expressas em seres humanos, uma vez que as mesmas são raramente identificadas em células epiteliais e outros tecidos humanos. Parsa et al. (1999) e De Laurenzi et al. (2000) identificaram em ceratinócitos humanos apenas RNA correspondente a proteína  $\Delta$ Np63, através de Northern blot, corroborando para esta hipótese.

Parsa et al. (1999) e Barbieri, Pietenpol (2005) ressaltaram que a expressão das isoformas  $\Delta$ Np63 parece estar restrita ao epitélio estratificado escamoso. Esta proteína parece ser importante no desenvolvimento embriológico deste epitélio, além de participar na manutenção de uma população de células-tronco na camada basal.

Desta forma, os resultados deste trabalho podem refletir o acúmulo da isoforma  $\Delta$ Np63 nos ceratinócitos, favorecendo uma regulação do ciclo celular em favor da proliferação, uma vez que esta proteína expressa-se não somente em ceratinócitos ciclizantes, mas também naqueles cuja capacidade proliferativa mostra-se evidente, conforme demonstrado por Parsa et al. (1999), utilizando dupla marcação para as proteínas Ki-67 e p63.

Ao mesmo tempo, a imunomarcação para a proteína p63 pode refletir a imaturidade das células epiteliais nesta lesão, especialmente em camadas supra-basais do epitélio cístico, favorecendo a tumorigênese e reforçando a hipótese neoplásica para o CO e de existência de um compartimento proliferativo supra-basal neste epitélio, uma vez que a expressão desta proteína decresce durante a diferenciação de ceratinócitos (PARSA et al., 1999; DE LAURENZI et al., 2000; MORGUNKOVA, 2005)

Kumamoto, Ohki, Ooya (2005) avaliaram a expressão das formas não transativadas da p63 em germes dentários, ameloblastomas e carcinomas ameloblástico e sugeriram que a detecção desta proteína pode estar relacionada à transformação maligna de células do epitélio odontogênico. Esta hipótese deve ser melhor investigada em CO, especialmente através de estudos genéticos mais específicos, uma vez que diversos autores, como Shear (2002a) e Phillipsen (2005) consideram esta patologia uma verdadeira neoplasia, apesar de ainda não ter sido demonstrada a proliferação clonal de ceratinócitos e existirem poucos estudos que abordam alterações genéticas nos casos de COs, especialmente esporádicos.

Ao lado dos trabalhos que ressaltam um maior potencial proliferativo no epitélio de revestimento do CO, poucos estudos referem-se a ME, sendo que a mesma desempenha importantes funções biológicas, inclusive interferindo na proliferação celular (ALBERTS et al., 1997; ENBRING, KLEINMAN, 2003).

A fim de avaliar o comportamento da MB em CO, foi realizada a avaliação imuno-histoquímica para a laminina, uma vez que esta corresponde a glicoproteína mais abundante desta estrutura, além de inter-relacionar, estruturalmente e bioquimicamente, diversos outros componentes como integrinas e colágeno IV (EKBLUM, LONAI, TALTS, 2003).

Das vinte lesões avaliadas, todas exibiram positividade para a laminina, sendo intensa em doze (60%) destas. Estes resultados divergem daqueles obtidos por Oliveira et al. (2002) e Amorim et al. (2004) que observaram descontinuidade para esta proteína em todos os casos de CO estudados e corroboram com os resultados de Poomsawat, Punyasingh, Weerapradist (2006).

Os COs desta amostra que exibiram descontinuidade para a laminina apresentavam processo inflamatório intenso, predominantemente mononuclear, próximo ao epitélio cístico. Para Oliveira et al. (2002), enzimas proteolíticas e outros mediadores químicos presentes no microambiente inflamatório parecem contribuir para o remodelamento da MB nas áreas de atividade inflamatória, justificando estas áreas de descontinuidade.

Os resultados deste trabalho sugerem que a expressão da laminina na MB é normal e provavelmente não interfere nas funções dos ceratinócitos do epitélio do CO, tais como proliferação celular. Entretanto, mais estudos envolvendo outros componentes da MB, como colágeno IV, integrinas, devem ser conduzidos, na tentativa de melhor esclarecer a participação da MB na etiopatogenia do CO e comportamento celular.



#### 6.4 Associação entre aspectos imuno-histoquímicos, clínicos e imaginológicos

Poucos estudos associam a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e p53 com características clínicas e imaginológicas do CO. Em relação a p63, há apenas um estudo disponível na literatura que ressalta uma maior expressão desta proteína em CO recorrente, sem discutir outros aspectos importantes, tais como localização da lesão, características imaginológicas e relação com unidades dentárias.

Nesta amostra, não foi possível demonstrar associação estatística entre a imunoexpressão das proteínas Ki-67, p53 e p63 e o envolvimento da região posterior de mandíbula ( $p=0,5051$ ;  $p=0,6292$ ;  $p=0,8987$ , respectivamente).

No trabalho de Kim et al. (2003), a expressão da proteína Ki-67 mostrou-se mais evidente em lesões de aspecto imaginológico multilocular. Esta diferença não foi constatada nesta amostra e investigações com maior número de pacientes devem ser realizadas, uma vez que COs que exibem este padrão imaginológico parecem ter um comportamento clínico mais agressivo (STOELINGA, 2001).

Neste trabalho, foi possível comparar, através de exame imuno-histoquímico, as lesões primárias e recorrentes de quatro indivíduos. Pode-se constatar que os CO recorrentes, destes pacientes, apresentaram uma média de imunomarcagem para as proteínas Ki-67, p53 e p63 maior que as lesões primárias, apesar de não ser possível avaliar a real associação entre estas variáveis, especialmente pelo tamanho amostral reduzido deste grupo. Forsell et al. (1998), entretanto, sugeriram uma possível associação entre a expressão do Ki-67 e COs recidivantes.

Comparando-se os grupos de lesões primárias (n=23) e recidivas (n=14), como amostras independentes, não foi possível detectar diferença estatística entre estes, para os marcadores Ki-67, p53 e p63 (Ki-67,  $p=0,5591$ ; p53,  $p=0,9847$ ; p63,  $p=0,2427$ ). Li et al. (1995) e Lombardi et al. (1995) também não observaram esta associação, para as proteínas Ki-67 e p53, respectivamente. Para Li et al. (1995) a remoção incompleta da lesão, mais que o potencial proliferativo do epitélio cístico, poderia contribuir para as altas taxas de recidiva do CO.

Recentemente, Foschini et al. (2006) compararam lesões primárias e recidivas e observaram uma distribuição mais homogênea e superficial da proteína p63 no segundo grupo.

Apesar desta amostra não demonstrar diferença estatística entre CO primários e recorrentes, para a p63, este aspecto deve ser investigado em amostras maiores, uma vez que pode indicar uma maior tendência a recorrência das lesões. O acompanhamento dos pacientes desta amostra poderá fornecer subsídios importantes na validação do p63 em CO como um marcador de recidivas, permitindo um melhor planejamento cirúrgico e preservação dos pacientes.

## 6.5 Perspectivas Futuras

A partir dos resultados obtidos com este estudo, foi possível demonstrar a presença de um compartimento proliferativo supra-basal no epitélio de revestimento do CO, refletindo um provável distúrbio no ciclo celular. Além disso, os resultados da proteína p63 sugerem que os ceratinócitos, nesta patologia, poderiam apresentar um fenótipo de célula imatura, favorecendo a tumorigênese.

Dessa forma, os estudos futuros serão conduzidos na tentativa de estabelecer o perfil de expressão genética e de proteínas no CO,

especialmente aqueles relacionados com o ciclo celular, a partir de amostras congeladas, associando os resultados com aspectos clínicos e imaginológicos.

Ao mesmo tempo, esta lesão será comparada, do ponto de vista molecular, com o Ameloblastoma, uma neoplasia benigna cuja a etiopatogenia também está relacionada à presença de remanescentes da lâmina dentária, na tentativa de obter subsídios que demonstrem que o CO é uma verdadeira neoplasia.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir:

- Os COs, nesta amostra, acometeram principalmente adultos jovens, melanodermas, com discreta predileção para o sexo masculino (1.5: 1). A maioria das lesões acometeu a região posterior da mandíbular e exibiam aspecto imagiológico unilocular, de margens definidas. Quando presentes, dor e aumento de volume corresponderam as principais manifestações clínicas e o protocolo terapêutico de escolha foi a enucleação cirúrgica seguida de curetagem óssea;
- Não se observou diferença de marcação das proteínas Ki-67, p53 e p63 entre as lesões de aspecto imagiológico uni ou multilocular (Ki-67,  $p= 0, 3240$ ; p53,  $p= 0, 9999$ ; p63,  $p=0, 8808$ );
- Não foi possível identificar associação estatisticamente significativa entre a localização anatômica e protocolo terapêutico com recidivas ( $p= 0, 5927$  e  $p= 0, 6838$ , respectivamente);
- A análise da marcação para o PAS revelou que em áreas de desprendimento epitelial, a MB encontrava-se ligada ao epitélio cístico;
- A presença de cistos satélites foi um achado histomorfológico frequente e observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença destes e recidivas ( $p= 0, 0033$ ),
- Observou-se uma associação estatística entre o aspecto imagiológico multilocular e distorção do canal mandibular com a presença de cistos satélites ( $p= 0, 0167$  e  $p= 0, 0243$ , respectivamente);

- As células imunomarcadas para as proteínas Ki-67 e p53 localizavam-se, predominantemente, nas camadas supra-basais, enquanto a p63 expressou-se em todas as camadas epiteliais, refletindo a presença de um compartimento proliferativo supra-basal no epitélio de revestimento cístico desta patologia;
- O processo inflamatório, independente de intensidade, interferiu somente na expressão da proteína Ki-67 ( $p < 0,05$ );
- Não foi possível constatar diferença estatística entre a imunomarcção para as proteínas Ki-67, p53 e p63, entre CO primários e recorrentes (Ki-67,  $p = 0,5591$ ; p53,  $p = 0,9847$ ; p63,  $p = 0,9127$ ) e entre CO esporádicos e associados a SCBCN (Ki-67,  $p = 0,7013$ ; p53,  $p = 0,3197$ ; p63,  $p = 0,2427$ );
- Todos os COs avaliados quanto a expressão da laminina exibiram imunomarcção para este anticorpo, predominantemente contínua ( $n=18$ ) e intensa ( $n=12$ ), inclusive em áreas de desprendimento epitelial e acantose. Em áreas de infiltrado inflamatório intenso, observou-se o esmaecimento desta marcação;

## REFERÊNCIAS

- AGARAM, N P et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch Pathol Lab Med**, v. 128, p. 313-317, 2004.
- AHLFORS, E.; LARSSON, A.; SJOGREN, S. The odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 42, n. 1, p. 10-19, 1984.
- ALBERTS, B et al. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. Cap. 19 : Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular, p. 949-1009.
- AMORIM, R et al. Immunohistochemical assesment of extracelular matrix components in Syndrome and non-Syndrome odontogenic keratocysts. **Oral Dis**, v. 10, n. 5, p. 265-270, Sep, 2004.
- ARISAWA, EAL et al. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67- Breve Revisão. **Rev Facul Odonto S J Campos**, v. 2, n. 1, 1999.
- AULUCK, A; PAI, KM. Treatment of recurrent odontogenic keratocyst: A Known but forgotten point. Letter to the Editor. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.44, n. 1, p. 74-75, 2005.
- BARBIERE, CE; PIETENPOL, JA. p63 and epithelial biology. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 6, p. 695-706, 2005.
- BARRETO, DC et al. *PTCH* gene mutations in odontogenic keratocyst. **J Dent Res**, v. 79, p. 1418-1422, 2000.
- BARRETO, DC et al. Immunolocalization of *PTCH* protein in odontogenic cysts and tumors. **J Dent Res**, v. 81, n. 11, p. 757-760, Nov. 2002.
- BLANAS, N et al. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, p. 553-558, 2000.
- BOUTET, N et al. Spectrum of *PTCH1* mutation in French patients with Gorlin Syndrome. **J Investig Dermatol**, v. 121, n. 3, p. 478-481, Sep. 2003.
- BROWN, DC; GATTER, KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, Dec. 1990.

- BULLWINKEL J et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. **J Cell Physiol**, v. 206, n.3, p. 624-635, 2005.
- CAMPOS, J L et al. Alterações morfológicas decorrentes do processo inflamatório no epitélio de queratocisto. **Rev Bras Patol Oral**, v. 4, n.1, 2005.
- CELLI, J; DUFJF, P; HAMEL, BC. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. **Cell**, v. 99, p. 143, 1999.
- CHEN, YK.; HSUE, SS.; LIN, LM. Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. **Oral dis**, v. 9, n. 5, p. 235-240, Sep. 2003.
- CHIRAPATHOMSAKUL, D et al. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n.1, 2006.
- COURBONE, MT et al. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. **Develop**, v. 131, n. 12, p. 2875-2885, 2004.
- DE LAURENZI, V et al. p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. **Biochem Biophys Res**, v. 273, p. 342-346, 2000.
- DE PAULA, AMB.; CARVALHAIS, JN.; DOMINGUES, JN, BARRETO, DC; MESQUITA, RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst. **J Oral Pathol Med** v. 29, p. 477-482, 2000.
- EKBLON, P; LONAI, P; TALTS, J F. Expression and biological role of laminin-1. **Matrix Biol**, v. 22, p. 35-47, 2003.
- EL-HAJJ, G; ANNEROTH, G. Odontogenic keratocysts- a retrospective clinical and histologic study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 25, p. 124-129, 1996.
- ENGBRING, JA; KLEINMAN, KH. The basement membrane matrix in malignancy. **J Pathol**, v. 200, p. 465-470, 2003.
- FARNDON, PA; DEL MASTRO, RG; EVANS, DG; KILPATRICK, MW. Location of gene for Gorlin syndrome. **Lancet**, v. 339, p. 581-582, 1992.
- FORSSELL, K et al. Recurrence of Keratocysts. A long-term follow-up study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 17, p. 25-28, 1988.



FOSCHINI, MP et al. High  $\Delta N$  p63 isoform expression favours recurrences in odontogenic keratocyst-odontogenic keratocyst tumour, **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 7, p. 673-675, 2006.

FREITAS, R A; SERAFIM, FMA. Regiões organizadoras nucleolares (AgNORS) em cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos. **RPG**, v. 5, p. 202-205, 1998.

GERDES, J et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol**, v. 138, n.4, 1991.

GIULIANI, M et al. Conservative Management of a large Odontogenic Keratocyst: Report of a case and review of the literature. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p. 308-316, 2006.

GIVANT-HORWITZ, V; DAVIDSON, B; REICH, R. Laminin-induced signaling in tumor cells. **Cancer Lett**, v. 223, p.1-10, 2005.

GOMEZ, RS, MARCO, L. Possible molecular approach to the treatment of odontogenic keratocyst. Letter to the editor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, p. 527-528, 2005.

HALL, P A et al. Expression of the p53 homologue p63alpha and deltaNp63alpha in normal and neoplastic cells. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 153-160, 2000.

HARDCASTLE, Z et al. The SHH signaling pathway in early tooth development. **Cell Mol Biol**, v. 45, n.5, p.567-568, 1999.

HEIKINHEIMO, K et al. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. **J Dent Res**, v. 81, n. 8, p. 525-530, 2002.

HENLEY, J et al. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. **Histopathol**, v. 47, p 582-587, 2005.

KOLAR, Z et al. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 35, p. 75-80, 2006.

KAPLAN, I; HIRSHBERG, A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. **Oral Oncol**, v. 40, p. 985-991, 2004.

KARIYA, Y; MIYAZAKI, K. The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. **Exp Cell Res**, v. 297, p. 508-520, 2004.

KICHI, E et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 34, p. 280-286, 2005.

KIM, DK et al. Comparative Ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without an impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. **Yonsei Medical J**, v. 44, n. 5, p. 841-846, 2003.

KIMI, K et al. Immunohistochemical analysis of cell-cycle-and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 30, p. 434-442, 2000.

KLEINMAN, H K; KLEBE, R; MARTIN G R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. **J Cell Biol**, v. 88, p. 473-475, 1981.

KRAMER, IRH; PINDBORG, JJ; SHEAR, M. Histologic typing of odontogenic tumours. Berlin, Spring Verlag, 1992.

KOSTER, MI et al. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. **Genes Develop**, v. 18, n. 2, p. 126-131, Jan 2004.

KUMAMOTO, H K; OHKI, K; OOYA, K. Expression of p63 and p73 in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, v. 34, p.220-226, 2005.

KUMAR, V; ABBAS, A K; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease**. Elsevier Inc , 1580p., 2004.

LANE, DP. Worrying about p53. **Curr Biol**, v. 2, p. 581-583, 1992.

LENCH, NJ et al. Investigation of chromosome 9q22.3-q31 DNA marker loss in Odontogenic Keratocysts. **Oral Oncol Eur J Cancer**, v. 32B, n. 3, p. 202-206, 1996.

LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, v. 6, p. 453-456, 1991.

Li, TJ et al. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaws cyst epithelium. **J Oral Pathol Med**, v. 23, p. 184-189, 1994.

LI, TJ; BROWNE, RM.; MATTHEWS, JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocyst: a comparative immunohistochemical study of ki-67 in simple, recurrent and basal cell nevus syndrome (BCNS)-associated lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 5, p. 221-226, May. 1995

LI, TJ et al. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. **J Oral Pathol Med**, v. 25, n. 5, p. 249-255, May. 1996.

LI, T et al. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. **J Clin Pathol Mol Pathol**, v. 50, p. 21-27, 1997.

LI, S et al. The Role of Laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. **Develop Cell**, v. 4, p. 613-624, 2003.

LITTLE, NA; JOCHEMSEN, AG. p63. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, p. 6-9, 2002.

LOMBARDI, T et al. p53 Immunohistochemistry of odontogenic keratocysts in relation to recurrence, basal-cell budding and basal-cell naevus syndrome. **Arch Oral Biol**, v. 40, n. 12, p. 1081-1084, 1995.

LO MUZIO, L et al. Expression of Cell Cycle and Apoptosis-related Proteins in Sporadic Odontogenic Keratocysts and Odontogenic Keratocysts associated with the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. **J Dent Res**, v. 78, n. 7, p. 1345-1353, 1999.

LO MUZIO, L et al. P63 expression in odontogenic cysts. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 6, p. 668-673, 2005.

MALINDA, KM; KLEINMAMN, HK. The Laminins. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 9, p. 957-959, 1996.

MASSEY, D. Potential pitfalls in diagnostic oral pathology: a review for the general surgical pathologist. **Adv Anat Pathol**, v. 12, p. 332-349, 2005.

MAURETTE, PE; JORGE, J; MORAES, M. Conservative treatment protocol of odontogenic keratocyst: a preliminary study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p. 379-383, 2006.

McCORMICK, D et al. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. **Histopathology**, v. 22, p. 355-360, 1993.

McGRATH, JAA et al. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. **Human Mol Genetics**, v. 10, p. 221-229, 2001.

MELINO, G et al. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. **Trends Biochem Science**, v. 28, n. 12, p. 663-670, Dec. 2003.

MILLS, AA. P63: Oncogene or tumor suppressor? **Curr Opin Genet Develop**, v. 16, p. 1-7, 2006.

MORGAN, TA et al. A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 63, p. 635-639, 2005.

MORGUNKOVA, AA. The p53 gene family: Control of cell proliferation and development programs. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 9, p. 955-971, 2005.

MYOUNG, H et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, p.328-333, 2001.

NARASIMHAM, PA et al. Molecular Analysis to Demonstrate That Odontogenic Keratocysts Are Neoplastic. **Arch Pathol Lab Med**, n. 128, p. 313-317, 2004.

NYLANDER, K; COATES, PJ; HALL, PA. Differential expression of p63 isoforms in normal tissue and neoplastic cells. **J Pathol**, v.198, p.417-427, 2002.

ODA, D et al. Odontogenic keratocyst: the northwestern USA experience. **J Contemp Dental Pract**, v. 1, n. 2, p. 60-74, Feb. 2000.

OGDEN, GR et al. p53 protein in odontogenic cysts: Increased expression in some odontogenic keratocyst. **J Clin Pathol**, v. 45, p. 1007-1010, 1992.

OLIVEIRA, MDC et al. Estudo imuno-histoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos. **Pesq Odontol Br**, v. 16, n.2, p. 157-162, 2002.

PARSA, R et al. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 113, p. 1099-1105, 1999.

PARTRIDGE, M; TOWERS, J. F. The primordial cyst (Odontogenic Keratocyst): its tumour like characteristics and behaviour. **Brit J Oral Maxillofa Surg**, v. 25, n. 4, p. 271-279, 1987.

PASTORINO, L et al. Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome in infants: improving diagnosis. **Child Care, Health Develop**, v. 31, n. 3, p. 351-354, 2005.

PELLEGRINI, G et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. **PNAS**, v. 98, n. 6, p. 3156-3161, March. 2001.

PHILIPSEN, H P. Keratocyst odontogenic tumour. *In: WHO Classification of tumours. Head and Neck tumours*, IARC press, 430p., Lyon, 2005.

PIATTELLI, A et al. p53 expression in odontogenic cysts. **J Endodontics**, v. 27, n. 7, p. 459-461, 2001.

POGREL, MA; JORDAN, RCK. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, p. 651-655, 2004.

POGREL, AM. Treatment of keratocysts: The case for decompression and marsupialization. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, p. 1667-1673, 2005.

POOMSAWAT, S; PUNYASINGH, J; WEERAPRADIST, W. Expression of basement membrane components in odontogenic cysts. **Oral Dis**, v. 12, p. 290-296, 2006.

RABENHORST, SH; BRINI, RC; SCHIMITT, FCL. Marcadores de proliferação celular. **Rev Bras Patol Clín**, v. 29, n. 1, p. 24-28, jan/mar. 1993.

SANTOS, JN. Expressão imuno-histoquímica de citoqueratinas, CD1a, S-100, p53, p21, PCNA e Ki-67 em Queilite Actínica. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 105p, São Paulo, 2000.

SARAÇOGLU, U et al. Mib-1 expression in odontogenic epithelial rests, epithelium of healthy oral mucosa and epithelium of selected odontogenic cysts: An Immunohistochemical study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 334, p. 432-435, 2005.

SBISA, E et al. Connecting p63 to cellular proliferation: The example of the Adenosine Deaminase target gene. **Cell Cycle**, v. 5, n. 2, p. 205-212, 2006.

SCHARFFETER , K et al. Proliferation Kinetics-study of the growth of keratocysts. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 17, p. 226-233, 1989.

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. **Oral Oncol**, v. 38, p. 219-226, 2002a.

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

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. **Oral Oncol**, v. 38, p. 407-415, 2002c.

SHEAR, M. Odontogenic Keratocyst: natural history and immunohistochemicstry. **Oral Maxillofac Surg Clin N Am**, v. 15, p. 362-377, 2003.

SHIN, D M et al. p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. **Cancer Epidemiol Biom Prevent**, v. 10, p. 603-609, 2001.

SLOOTWEG, P J. p53 and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesion. An Immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**, v. 24, p. 393-397, 1995.

STOELINGA, PJW. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v30, p. 14-25, 2001.

TERRANOVA, VP et al. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. **Cancer Res**, v. 42, n. 6, p. 2265-2269, 1982.

THOSAPORN, W et al. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst and ameloblastoma. **Oral Dis**, v. 10, p. 22-26, 2004.

TIMPL, R et al. Laminin-A Glycoprotein from Basement Membranes. **J Biol Chem**, v. 254, n. 19, p. 9933-9937, 1979

TSUJITA-KYUTOKU, M et al. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. **J Cutan Pathol**, v. 30, n. 1, p. 11-17, Jan. 2003.

VERHEIJEN et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. **J Cell Science**, v. 92, p. 123-130, 1989.

VINCEK, V; KNOWLES, J; LI, J; NASSIRI, M. Expression of p63 mRNA isoformas in normal human tissue. **Anticancer Res**, v. 23, n. 5<sup>A</sup>, p. 3945-3948, Sep-Oct. 2003).

ZHANG, L et al. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. **Oral Oncol**, v. 41, p. 1-11, 2005.

YANG, A et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Mol Cell**, v. 2, p. 305-316, 1998.

YANG, A et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**, v. 398, p. 714-718, 1999.

YANG, A et al. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends Genet**, v. 18, p. 90-95, 2002.

WAHLGREN et al. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 32, p. 1000-107, 2003.