

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR E DA P53 EM CISTOS DENTÍGEROS, QUERATOCISTOS E
AMELOBLASTOMAS UNICÍSTICOS.**

GLAUBER MEIRA LIMA

Fortaleza - Ceará
2003

Glauber Meira Lima

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR E DA P53 EM CISTOS DENTÍGEROS, QUERATOCISTOS E
AMELOBLASTOMAS UNICÍSTICOS.**

Dissertação submetida á Coordenação do Curso
de Pós-Graduação Patologia Tropical, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Barem
Rabenhorst

FORTALEZA
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

L698a Lima, Glauber Meira
**Análise imunohistoquímica de marcadores de proliferação celular e da p53 em cistos dentígeros, queratocistos e ameloblastomas unicísticos / Glauber Meira Lima. – Fortaleza, 2003.
79f. – il.**

Orientadores: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst e Prof. Renato Luiz Maia Nogueira.

1. Cistos Odontogênicos 2. Tumores Odontogênicos 3. Boca - Imunohistoquímica 4. Boca - Proliferação celular 5. Boca - Genes supressores tumorais I. Título

CDD 616.992314

Glauber Meira Lima

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR E DA P53 EM CISTOS DENTÍGEROS, QUERATOCISTOS E
AMELOBLASTOMAS UNICÍSTICOS.

Dissertação submetida á Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia
Tropical, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestra em Patologia.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Eveline Turatti

Prof Dr^a. Márcia Valeria Pitombeira Ferreira

Prof. Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto

Prof Dr^a. Silvia helena Barem Rabenhost (Orientadora)

Aos meus pais e irmãos que sempre
me apoiaram e incentivaram
durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

É muito difícil, no final de uma longa viagem, lembrar de todas as paisagens, assim como é nesta hora, pois normalmente esquecemos de algumas pessoas, e é freqüente serem da maior importância. Entretanto, tentarei realizar esta complicada tarefa de nomear, agradecendo sinceramente, as pessoas e instituições que sem elas, esse trabalho não teria sido realizado.

À minha mestra e também orientadora Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst, não só pelo incentivo e dedicação, mas pela disponibilidade, paciência e companheirismo, possibilitando um excelente relacionamento científico e pessoal, sou muito grato e espero que nosso trabalho continue.

Ao meu co-orientador e grande amigo Dr. Renato Luiz Maia Nogueira, figura humana ímpar, a quem tenho enorme admiração por sua capacidade profissional e ética. Agradeço do fundo do coração todo o apoio, não só neste trabalho, mas também na disciplina de Patologia Bucal.

Ao Prof. Dr. Mário James dos Anjos da Silva, por confiar em meu trabalho, sempre acreditando no meu potencial (às vezes até mais que eu mesmo), fez-me compreender e gostar de estudar Patologia Bucal. És um grande amigo e desejo muita sorte e felicidade na nova fase de sua vida.

À Prfa. Ana Paula Nunes Negreiros, pelo apoio e companheirismo durante esses anos. Sua confiança em meu trabalho, na disciplina de patologia Bucal, tem sido de fundamental importância para que eu possa desempenhar um bom papel nesta instituição. Meu muito obrigado por tudo.

À minha namorada e companheira Julieta Cunha Martins, de quem recebi todo apoio e incentivo, principalmente nos momentos difíceis. Sua presença foi fundamental e este trabalho é um pouquinho seu também. Desculpe pelos momentos de estresse, um beijão e muito obrigado.

À todo o Corpo Docente e à Coordenação do Mestrado em Patologia, e ao Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio técnico e científico.

Ao Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará (IPCC), instituição de alto valor social, onde muitas vidas são salvas, e espaço de grande valor científico e aprendizado prático, meu obrigado á direção por permitir que parte do material desta pesquisa fosse coletado nos arquivos de seu laboratório de Patologia.

Ao Dr. Pedro Teixeira, por abrir todas as portas dentro do serviço de odontologia do IPCC. Seu incentivo e apoio foram de fundamental importância durante este período que trabalhamos juntos. Espero que continue com sua dedicação e empenho no combate ao câncer bucal em nosso estado.

À todos os Cirurgiões Dentistas do IPCC, Dra. Fátima, Dra. Rejane, Dr. Leitão, Dr. Aguiar e Dra. Regina que muito me ajudaram, e a Zelinha que, sempre de bom humor, trazia alegria mesmo em dias difíceis, meu muito obrigado.

À Dra. Débora, pelos ensinamentos e pelo incentivo durante o período em que trabalhamos juntos.

À todos os funcionários do departamento DPML, especialmente à Paula, quem sempre nos ajudou e cobrou pelas “publicações” e dissertação, meu muito obrigado.

Aos amigos Mário Henrique e Raquel pela ajuda e paciência durante as baterias de imunohistoquímica, e pelo companheirismo durante estes meses de trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade de Fortaleza, instituição do mais alto valor educativo e científico, por permitir que parte do material desta pesquisa fosse coletado nos arquivos de seu laboratório de Patologia.

À Dra. Roberta Barroso Cavalcante, pelo incentivo e por abrir as portas do laboratório de Patologia Bucal da UNIFOR para coleta de material, meu muito obrigado.

Ao Centro Integrado de Diagnóstico Oral, instituição de alta credibilidade na realização de exames complementares, por permitir que parte do material desta pesquisa fosse coletado nos arquivos de seu laboratório de Patologia.

Aos colegas de turma do mestrado, pela ótima convivência durante estes anos, principalmente a Dra. Aline Sales pelo companheirismo e por abrir as portas do CIDO para coleta de material, meu muito obrigado.

RESUMO

A identificação da atividade proliferativa em cistos e tumores odontogênicos tem sido apontada como um importante ponto na avaliação do comportamento biológico entre diferentes lesões. O Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA) e o Ki-67 são os marcadores moleculares mais utilizados na detecção de células proliferantes. Mutações no gene supressor tumoral p53 podem produzir proteínas mais estáveis, porém com alterações funcionais de fundamental importância relacionadas à indução da apoptose ou à inibição mitótica. A maior estabilidade da p53 mutada possibilita sua detecção imunohistoquímica e esta técnica tem sido utilizada para avaliação do comportamento biológico de lesões neoplásicas e císticas. O Cisto Dentífero (CD), Queratocisto Odontogênico (QO) e o Ameloblastoma Unicístico (AU) são lesões benignas originárias de distúrbios na formação do dente. Apesar das semelhanças clínicas e radiográficas, estas lesões possuem um distinto comportamento biológico, sendo o QO e o AU as lesões mais agressivas e que podem recidivar quando submetidos a tratamento conservador. O presente trabalho teve por objetivo estudar, por imunohistoquímica, a expressão das proteínas PCNA, Ki-67 e p53 mutada em quinze QOs, dez CDs e cinco AUs. A média da percentagem de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ documentadas no forro epitelial dos Queratocistos (46,4 e 13,7%) foi significativamente maior que a dos Cistos Dentíferos (26,2 e 7,9%). Os AUs apresentaram média de marcação para o PCNA (35,9%) estatisticamente semelhante a observada nos QOs (P=0.136), mas, com relação ao Ki-67 (24,4%), os AUs tiveram maior índice de marcação. Apesar de ambos marcadores serem utilizados na detecção de proliferação celular foi observada uma maior média de células marcadas para o PCNA em todas amostras. Trinta e três por cento dos casos de Queratocistos apresentaram positividade para a p53. Apenas um caso de Cisto dentífero foi positivo. Não houve detecção em nenhum caso de Ameloblastoma Unicístico. Apesar da detecção da proteína p53 por imunohistoquímica ser considerada a variante mutada, o caráter clínico benigno destas lesões sugere uma maior estabilidade desta proteína na sua função de reparo.

Palavras Chave: imunohistoquímica, PCNA; Ki-67, p53; Queratocisto Odontogênico; Cisto Dentífero; Ameloblastoma Unicístico.

ABSTRACT

The identification of the proliferative activity in cysts and tumors has been pointed as an important aspect in the evaluation of the biological behavior among different lesions. The proliferating cells nuclear antigen (PCNA) and the Ki-67 are the most used molecular markers in detection of proliferating cells. Mutations in p53 tumor suppressor gene can produce more stable protein, however with loss of function. The greater stability mutation p53 allows its immunohistochemical detection and this technique has been used in evaluation of biological behavior of neoplastic and cystic lesions. The dentigerous cysts (CD), odontogenic keratocyst (QO) and the unicystic ameloblastoma (AU) are benign lesions that have its origin in disturbs in the tooth formation. Despite the clinical and radiographic similarity, these lesions have a distinct biological behavior. Between them, QO and AU are the most aggressive lesions and can recur when submitted to conservative treatment. The present work has the objective of studying, through immunohistochemical, the expression of PCNA, Ki-67 and p53 in 15 QOs, 10 CDs and 5 AUs. The average of the percentage of PCNA+ and Ki 67+ cells contained in QOs (46,4 and 13, 7%) was significantly higher than the CD (26,2 and 7,9%). The AUs presented the labeling index for the PCNA (35,9%) statistically similar to that observed in QOs ($P=0.136$), however, compared to Ki-67 (24,4%), the AUs had a bigger labeling index. Although both markers have been used in detection of cell proliferation, a larger average of marked cells for the PCNA it was observed in all the samples. Thirty three percent of the keratocyst cases presented a positivity for the p53. Only one case of dentigerous cysts was positive. It wasn't any case of unicystic ameloblastoma. Although the detection of the protein p53 for immunohistochemical be considered a mutated variation, the benign clinical behavior of these lesions suggest a larger stability of this protein in its repair function.

Keywords: immunohistochemical; PCNA; Ki-67; p53; odontogenic keratocyst; dentigerous cysts; unicystic ameloblastoma.

SUMÁRIO

1- LISTA DE ABREVIATURAS	13
2- INTRODUÇÃO	14
2.1- Aspectos gerais	14
2.1.1 – Cisto dentífero	14
2.1.2 – Ameloblastoma	18
2.1.2.1 – Ameloblastoma Unicístico	18
2.1.3 – Queratocisto Odontogênico	22
2.2- Proliferação celular	29
2.2.1 – PCNA	31
2.2.2 – Ki-67	32
2.2.3 – Estudos avaliando os marcadores de proliferação celular em cistos odontogênicos e ameloblastomas	34
2.3- p53	36
3- OBJETIVOS	42
4- MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1- Análise imunohistoquímica	44
4.2- Análise estatística	44
5- RESULTADOS	45
6- DISCUSSÃO	50
6.1- Considerações gerais	50
6.2- Marcadores de proliferação celular	51
6.2.1 – Cistos Odontogênicos	51
6.2.2 – Queratocisto Odontogênico	52
6.2.3 – Inflamação	53

6.2.4 – Queratocistos associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular	54
6.2.5 – Queratocistos x Cistos Dentígeros	57
6.2.6 – Ameloblastoma Unicístico	57
6.2.7 – Queratocisto x Ameloblastoma Unicístico	59
6.3- p53	60
7- CONCLUSÃO	63
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNORs = Regiões Organizadoras Nucleolares;

ASM = Ameloblastoma Sólido Multicístico;

AU = Ameloblastoma Unicístico;

CD = Cisto Dentífero;

CR = Cisto Radicular;

HE = Hematixilina e Eosina;

PCNA = Antígeno Nuclear de Células Proliferantes;

QO = Queratocisto Odontogênico;

SCNB = Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular.

INTRODUÇÃO

O Cisto Dentífero (CD), Queratocisto Odontogênico (QO) e o Ameloblastoma Unicístico (AU) são lesões benignas originárias de distúrbios na formação do dente. Estas, segundo a Organização mundial de Saúde, pertencem a dois grupos de lesões odontogênicas, sendo o AU classificado como um tumor benigno e as outras duas como cistos de desenvolvimento.

Além da origem, estas lesões possuem aspectos clínicos e radiográficos comuns, pois geralmente manifestam-se como lesões nodulares, assintomáticas, que podem atingir grandes dimensões provocando assimetria facial. Radiograficamente podem ser observadas, na maioria dos casos, áreas radiolúcidas uniloculares associadas a um dente incluso.

Apesar das semelhanças, estas lesões possuem um distinto comportamento clínico, sendo o QO e o AU as lesões de mais agressivas e que podem recidivar quando submetidos a tratamento conservador. Os CDs são lesões menos agressivas, mas também têm grande importância por ser o mais comum cisto de desenvolvimento e também há relatos da transformação destas lesões em ameloblastomas (Gardner & Corio, 1984).

Em virtude destas características, estudos têm sido realizados para uma melhor caracterização e compreensão do comportamento biológico destas lesões (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Lobardi *et al.*, 1995; El Murtadi *et al.*, 1996; Lo Muzio *et al.*, 1999; Piattelli *et al.*, 2002). Neste sentido, análises clínicas, histopatológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas têm contribuído de forma importante como pode ser verificado no texto que se segue.

2.1- Aspectos Gerais

2.1.1-Cisto Dentífero

O Cisto Dentífero (CD), também chamado de cisto folicular, é um cisto de desenvolvimento que se origina da separação do folículo da coroa de um dente incluso (Cawson *et al.*, 1997; Everson & Scully, 1995; Reichart & Philipsen, 2000). Benn *et al.* (1996), defendem a existência de dois tipos de CD, sendo um de desenvolvimento e outro de

natureza inflamatória. Neste último, a causa da separação do epitélio reduzido do esmalte da coroa dental seria o exsudato inflamatório de uma lesão periapical em um dente decíduo não vital. É o segundo tipo mais comum de cisto odontogênico, compreendendo cerca de 20% de todos os cistos dos maxilares (Neville *et al.*, 1995). Bodner (2002), realizou um estudo para avaliar a frequência das lesões císticas em crianças e observou que o CD foi o cisto mais prevalente, representando 45% do total dos casos estudados.

Embora os CDs possam envolver qualquer dente incluso, os mais acometidos são os terceiros molares inferiores e os caninos superiores. A incidência mais elevada ocorre durante a 2ª e 3ª década de vida, sendo notada uma ligeira predileção pelo sexo masculino (Regezi & Siculba, 1999). Geralmente a lesão é única, mas casos de lesões múltiplas já foram documentados como o relatado por Sands & Tocchio (1998), onde os autores diagnosticaram quatro CD em um mesmo paciente.

Bento *et al.* (1996), realizaram um estudo epidemiológico sobre cistos odontogênicos no qual foram catalogadas 446 lesões. O CD foi a segunda entidade patológica de maior frequência representando 21,5% do total, com predominância pelo sexo masculino (60,4%) e prevalências nas três primeiras décadas de vida. As localizações mais frequentes foram a região anterior da maxila e posterior da mandíbula.

Esta lesão, em geral, é assintomática, sendo a ausência do dente acometido o único indício da possível formação do CD. São lesões que podem aumentar consideravelmente de tamanho, nestes casos levando a expansão óssea de forma indolor na região afetada. Radiograficamente apresentam-se como radiotransparência unilocular associada a uma coroa de um dente incluso (Cawson *et al.*, 1997; Tsukamoto *et al.*, 2001).

Sob o ponto de vista microscópico é observada uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso arranjado frouxamente e com quantidade considerável de glicosaminoglicanos e mucopolissacarídeos (Everson & Scully, 1995; Regezi & Siculba, 1999). Pequenas ilhas de epitélio odontogênico inativo podem estar presentes na cápsula fibrosa (Everson & Scully, 1995). O forro epitelial estratificado pavimentoso tende a ter duas a quatro camadas de espessura e a junção entre os tecidos epitelial e conjuntivo é geralmente de superfície plana (Reichart & Philipsen, 2000). Nos casos em que há inflamação crônica ou infecção secundária, uma hiperplasia do epitélio pode ser notada. Os CD de longa duração podem conter áreas de queratinização ou de alterações pré-malignas do seu revestimento epitelial (Sapp *et al.*, 1997). (figuras 1, 2, 3, 4 e 5)

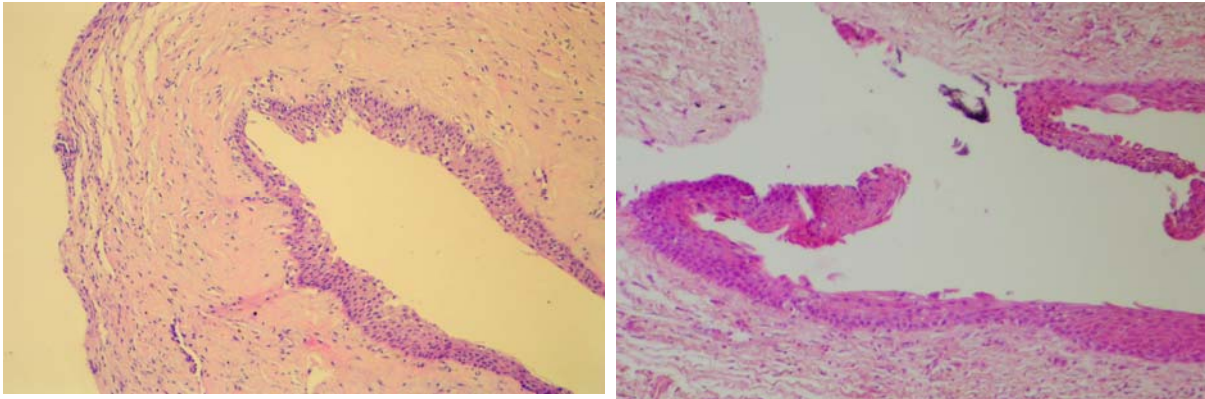


Figura 1 e 2 – HE (40x), Forro epitelial estratificado circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo denso. Uma parte do epitélio desprende-se e está no interior do lúmen cístico.

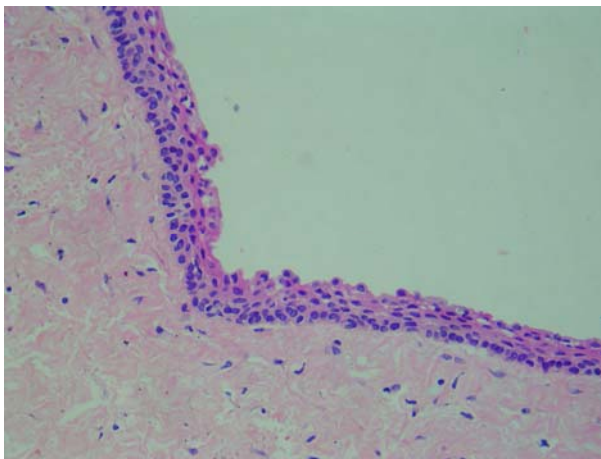


Figura 3 – HE (100x), Revestimento apresentando um epitélio escamoso fino, sem formação de projeções, e uma cápsula de tecido conjuntivo denso.

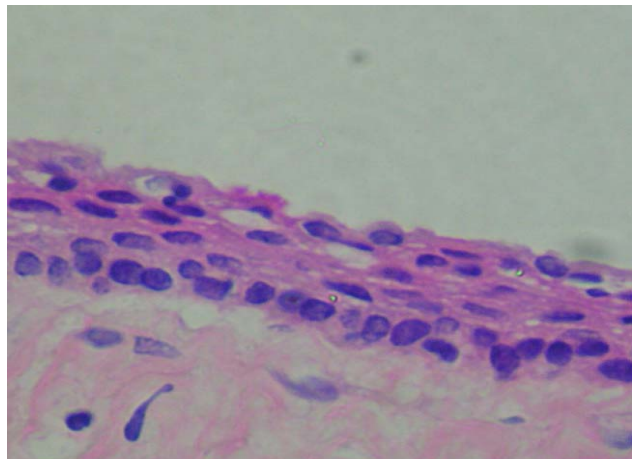


Figura 4 – HE (400x), Revestimento epitelial estratificado com células basais cúbicas e suprabasais pavimentosas.

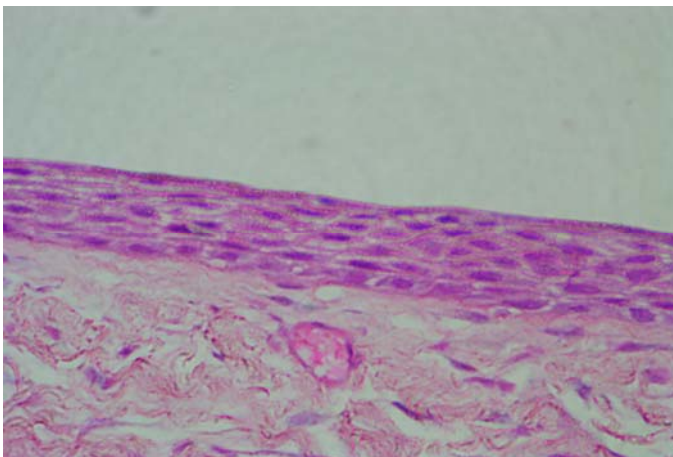


Figura 5 – HE (400x), Revestimento consiste de epitélio estratificado relativamente plano, sem células inflamatórias no tecido conjuntivo subjacente.

Ocasionalmente observam-se células mucosas no revestimento epitelial deste cisto. Este achado tem sido referido como metaplasia de células mucosas (Galvão & Souza, 2000).

Apesar de ser uma lesão benigna e geralmente assintomática, os CDs devem ser tratados, pois possuem crescimento contínuo, podendo comprometer estruturas nobres adjacentes. A maioria dos CDs é tratada através da enucleação cirúrgica com exodontia do dente associado. Em lesões de grandes dimensões, a enucleação pode ser precedida por uma marsupialização na tentativa de diminuir o tamanho da lesão, possibilitando um melhor restabelecimento da área acometida pela lesão e evitando complicações como fraturas patológicas e traumatismos a estruturas nobres (Sapp *et al.*, 1997; Regezi & Siculba, 1999; Parizotto *et al.*, 2001). A preservação do dente envolvido pela lesão é descrita em vários trabalhos, principalmente em crianças, devido à força eruptiva e à evolução mais rápida do reparo ósseo. O tracionamento ortodôntico pode auxiliar no posicionamento dental, possibilitando o restabelecimento estético e funcional (Murakami *et al.*, 1995; Fortin *et al.*, 1997; Martínez-Pérez & Varela-Morales, 2001).

As complicações potenciais de um CD não tratado são de significado considerável. Relatos literários documentaram a transformação do forro epitelial do CD em tumor benigno, como o ameloblastoma (Gardner & Corio, 1984; Piattelli *et al.*, 2002), neoplasias malignas (Roofe *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2000) e casos de metástases de carcinomas em CD (Manganaro *et al.*, 1997). Holmund *et al.* (1991), relatam três casos de ameloblastoma sólido intraósseos que se desenvolveram em locais onde previamente havia sido realizada remoção de lesão cística odontogênica: dois Cistos Radiculares e um Cisto Dentígero. Silveira *et al.* (1993), destacam em seu trabalho a importância de submeter todos os suspeitos CD ou lesões unicísticas ao diagnóstico histopatológico, pois assim poderia ser descartado algum componente ou mudança ameloblástica em fase inicial.

Vários autores (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Ogden *et al.*, 1992) em estudos para avaliar a capacidade de proliferação celular de cistos e tumores odontogênicos, mostraram em seus trabalhos que o CD apresenta comportamento biológico semelhante ao de outros cistos odontogênicos como o cisto radicular. Foi observado também que o CD apresenta menor índice de proliferação celular que o Ameloblastoma Sólido, Ameloblastoma Unicístico e o Queratocisto.

2.1.2-Ameloblastoma:

O Ameloblastoma é uma neoplasia odontogênica benigna que tem morfologia semelhante ao germe dentário em desenvolvimento na fase de capuz. Esta lesão tem maior potencial de crescimento e acomete principalmente adultos de meia idade, com predileção pela região posterior de mandíbula (Barbachan, 1985; Fonseca *et al.*, 1986; Reichart *et al.*, 1995; Sassi *et al.*, 2001). Dentre os tumores odontogênicos, que são lesões raras, os ameloblastomas representam 30,7% dos casos (Santos *et al.*, 2001).

Baseado principalmente no comportamento clínico e prognóstico, três tipos de ameloblastomas podem ser distinguidos: 1- o “convencional ou clássico”, intra-ósseo, sólido ou multicístico (ASM); 2- o ameloblastoma unicístico (AU) ou cistogênico; e 3- ameloblastoma periférico. Philipsen & Reichart (1998), relatam que o ameloblastoma desmoplásico, descrito atualmente como “clássico ou convencional”, pode vir a ser qualificado como um quarto subtipo de ameloblastoma pelo seu comportamento biológico, aspecto radiográfico e histopatológicos únicos.

2.1.2.1-Ameloblastoma Unicístico

Ainda hoje há muita discussão e controvérsia sobre a etiopatogênese do AU sendo que as principais hipóteses são: 1- transformação ameloblástica do epitélio reduzido de esmalte e subsequente desenvolvimento cístico; 2- degenerações cística e subsequente fusão, formando um cisto único, em ameloblastomas sólidos; 3- transformação ameloblástica do revestimento epitelial de um cisto odontogênico (Gardner & Corio, 1984; Holmlund *et al.*, 1991; Piattelli *et al.*, 2002).

Dentre os cistos odontogênicos, os que têm maior potencial de transformação ameloblástica são o CD e o QO (Donato *et al.*, 1996; Sapp *et al.*, 1997; Piattelli *et al.*, 2002). Além destes, outros cistos odontogênicos são também relatados na literatura como no caso publicado por Lee, (1970) onde observou evidências de um ameloblastoma associado ao forro de um cisto residual de origem radicular.

O AU ocorre geralmente em paciente na faixa etária dos 16 aos 20 anos, podendo, no entanto, ser observado também em pacientes mais jovens. Esta lesão compreende 10 a

15% de todos os ameloblastomas intraósseos (Neville *et al.*, 1995). O principal sinal clínico é a expansão da área acometida sem sintomatologia significativa, o que torna mais comum seu achado em radiografias de rotina. A localização mais comum é a mandíbula mostrando significativa predominância pela região de corpo e ramo (Regezi & Siculba, 1999; Li *et al.*, 2000; Rosenstein *et al.*, 2001; Al-Khateeb *et al.*, 2003). Azoubel *et al.* (1997), relataram um caso de AU na região anterior da mandíbula, onde a principal queixa da paciente era dor local provocada pela compressão direta do nervo mentoniano.

O aspecto radiográfico é o de uma lesão radiotransparente, geralmente, unilocular bem delimitada, mas, em algumas ocasiões, as margens podem estar festonadas e apresentar loculações (Roos *et al.*, 1994; Donato *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2001; Al-Khateeb *et al.*, 2003). Dentes impactados são freqüentemente associados ao AU (52 a 86%) dificultando o diagnóstico diferencial com o CD. O terceiro molar mandibular é o dente impactado mais comumente associado a este tumor (Reichart & Philipsen, 1998; Li *et al.*, 2000; Al-Khateeb *et al.*, 2003). Roos *et al.* (1994), documentaram que 43% dos casos de AU provocavam reabsorção radicular nos dentes que margeavam as lesões.

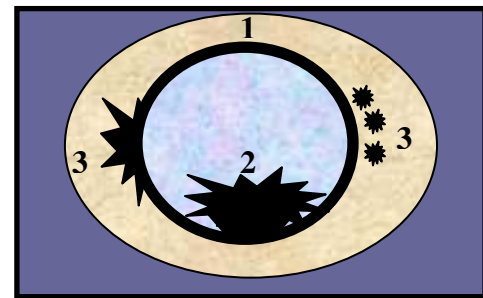
Em uma visão histopatológica, é observado que a lesão possui uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, denso, uniforme, rodeando um lúmen cheio de líquido. O revestimento epitelial é geralmente de espessura uniforme e tem uma camada basal de células em paliçada, ligeiramente hipercromática, apresentando polarização invertida no seu núcleo. As camadas seguintes mostram-se dispostas frouxamente e lembram o retículo estrelado do órgão do esmalte (Araújo & Araújo, 1984; Sapp *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). (figura 6, 7 e 8)

Os AU são classificados de acordo com Philipsen e Reichart (1998) em lesões do grupo 1, quando a lesão limita-se ao forro epitelial; grupo 1,2- caracterizado por um ou mais nódulos tumorais que se projetam do limite epitelial para a luz do cisto; grupo 1,3- quando ocorre invasão da cápsula cística por células tumorais; e grupo 1,2,3- quando há projeção para a luz e para a cápsula. (tabela 1)

Tabela 1 – Subtipos histológicos do AU

Grupo	Interpretação
1	Simples AU
1,2	Simples e intraluminal AU
1,3	Simples e intramural AU
1,2,3	Simples, intramural e intraluminal AU

Figura 6- Esquema do AU



- ⇨ Cavidade cística.
- ⇨ Forro epitelial.
- ⇨ Cápsula.

* Tabela e figura adaptadas de Philipsen & Reichart (1998).

Com relação às variantes histopatológicas é relatado na literatura que aproximadamente dois terços dos AU apresentam invasão ameloblastomatosa na cápsula cística, e que, a maior parte destas, é representada por lesões não associadas a impacção dental. Já as lesões com proliferação intraluminal são duas vezes mais freqüentes em lesões relacionadas a um dente incluso (Philipsen & Reichart, 1998). Roos *et al.* (1994), avaliaram histopatologicamente trinta AU e destes, onze apresentavam invasão da cápsula, quatro casos mostravam proliferação intramural e em quinze espécies o tumor limitava-se ao forro epitelial.

A biópsia incisional pré-operatória é um passo importante para se estabelecer o correto diagnóstico do AU, visto que os dados clínicos e imagiológicos não são suficientes. Após a sua remoção cirúrgica da lesão, é necessário um estudo em cortes seriados da peça completa, pois a biópsia incisional pode não ser representativa quanto à classificação do AU.

Os AUs são facilmente diagnosticados quando seu revestimento epitelial apresenta características tipicamente ameloblásticas. Há, entretanto, na literatura casos de AU cujo limitante apresentou metaplasia escamosa e o epitélio possuía várias camadas de células escamosas não queratinizadas. Nestes casos, a diferenciação de cistos odontogênicos, como o Cisto Residual e Cisto Dentífero, torna-se problemática (Roos *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 2001).

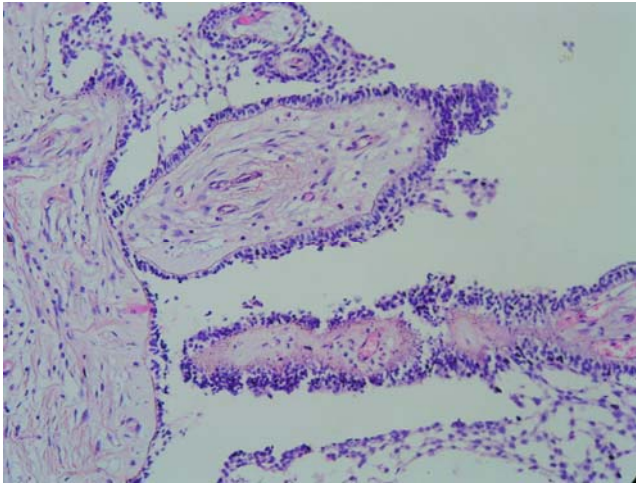


Figura 7 – HE (40x), O cisto é limitado por epitélio ameloblástico.

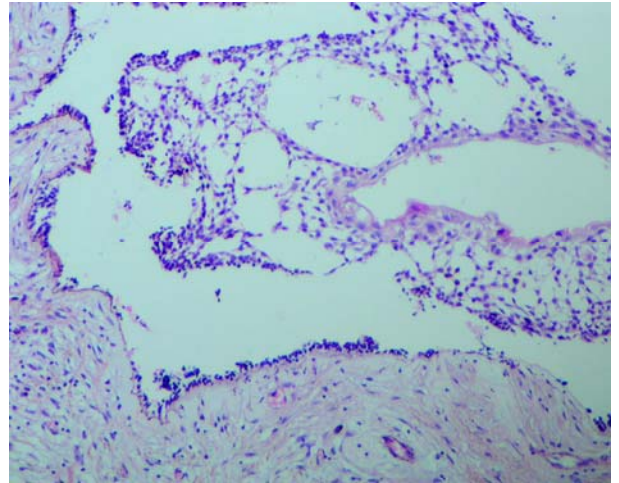


Figura 8 – HE (40x), As células epiteliais acima da camada basal são dispostas frouxamente e lembram o retículo estrelado.

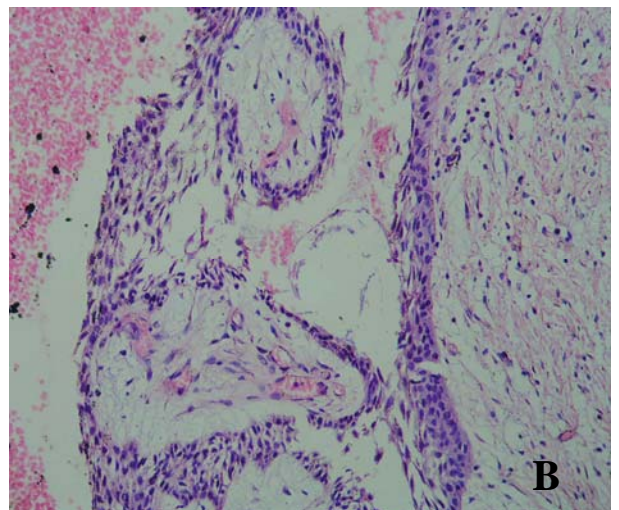
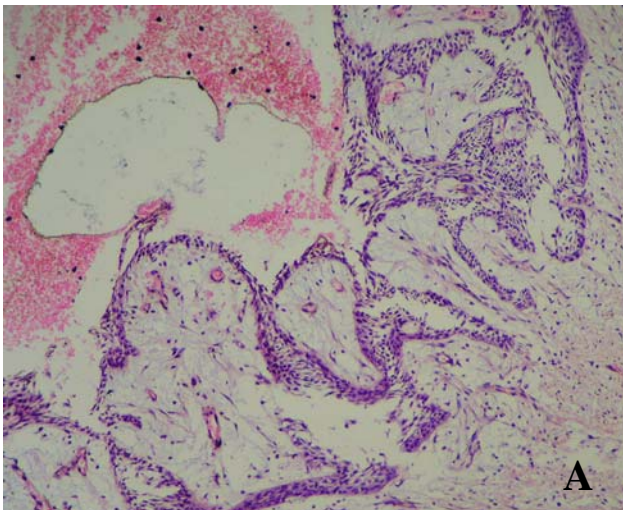


Figura 9 – (A) HE – 40x, Proliferação intraluminal de epitélio ameloblástico, que se assemelha a um ameloblastoma do tipo plexiforme. (B) HE - 100x, Maior aumento da projeção intraluminal (Subtipo intraluminal).

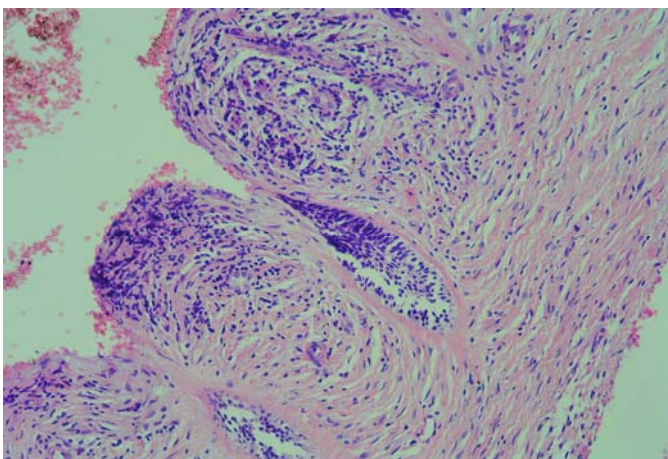


Figura 10 – HE (100x), Ilhas de epitélio ameloblástico infiltrando a cápsula cística (Subtipo intramural).

Coleman *et al.* (2001) e Altini *et al.* (2000), relatam em seus estudos que a caretina (proteína de 29 kDa que possui ligação com o cálcio) é expressa somente em Ameloblastomas indicando que ela pode ser considerada um marcador específico para tecidos ameloblásticos, não sendo notada nos cistos odontogênicos como o Queratocisto Odontogênico, o Cisto Residual e o Cisto Dentífero. As áreas de epitélio não específico e com características ameloblásticas mostram marcação positiva para a caretina.

O tratamento do AU depende do padrão histopatológico. Quando está presente um padrão intraluminal ou luminal, é geralmente empregado a enucleação cirúrgica. (figura 9) Se a lesão contiver um componente mural que se estende até o nível de contato com o osso, será necessário fazer uma ressecção marginal para garantir total remoção da lesão (Regezi & Siculba, 1999; Li *et al.*, 2000; Rosenstein *et al.*, 2001; Piattelli *et al.*, 2002). (figura 10)

Nakamura *et al.* (2002), relataram que a marsupialização prévia e a enucleação são manobras efetivas para a redução do tamanho dos ameloblastomas císticos. Os autores realizaram a marsupialização em 31 pacientes, sendo 19 unicísticos e 12 ameloblastomas multicísticos. Os resultados foram tidos como efetivos ou extremamente efetivos (quatro lesões foram tratadas, com êxito, somente com marsupialização) em 74,2% dos casos e apenas em oito lesões não foi documentado diminuição em suas dimensões. Donato *et al.* (1996), documentaram um caso de Ameloblastoma originado em um CD onde o tratamento realizado foi a marsupialização, que proporcionou redução da lesão, seguida de enucleação.

2.1.3-Queratocisto Odontogênico

O QO é um cisto de desenvolvimento que acomete unicamente o complexo maxilomandibular e corresponde de 5,4 a 18,7% de todos os cistos odontogênicos (tabela 2). É uma lesão derivada dos restos funcionais da lâmina dentária ou de hamartias basocelulares (Regezi & Siculba, 1999; Ézsias, 2001). O comportamento biológico dessa lesão se assemelha a um neoplasma benigno (Ahlfords *et al.*, 1984; Zachariades *et al.*, 1985; Sapp *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Shear, 2002a). Seu crescimento pode estar relacionado com fatores

inerentes do epitélio e/ou de atividade enzimática da cápsula cística, além do gradiente de pressão osmótica (Scharffetter *et al.*, 1989).

Tabela 2. Frequência de QOs em vários estudos.

Autores	Total de cistos odontogênicos	QO	%
Barnnon <i>et al.</i> (1976)	2972	312	10.5
Ahlfors <i>et al.</i> (1984)	5914	319	5.4
Woolgar <i>et al.</i> (1987)	243	16	6.6
Kondell <i>et al.</i> (1988)	531	29	5.4
Silva <i>et al.</i> (2001)	1917	172	9
Ledesma-Montes <i>et al.</i> (2000)	304	57	18.7
Total	11881	905	7.6

Os QOs podem ser encontrados em pacientes de qualquer idade, porém 60% dos casos ocorrem na 2^a, 3^a e 4^a década de vida (Neville *et al.*, 1995). Alguns estudos, como o realizado por Stoelinga *et al.* (2001), mostram que esta lesão pode apresentar maior frequência em duas faixas etárias, entre a 2^a e a 4^a e entre a 6^a e a 8^a década de vida. Lesões diagnosticadas em crianças são, com frequência, associadas à Síndrome Nevóide dos Carcinomas Basocelulares (Neville *et al.*, 1995).

O QO se desenvolve praticamente em qualquer ponto dos maxilares, sendo que em 2/3 dos casos acomete a mandíbula, preferencialmente na região de corpo e ramo (Barnnon & Colonel, 1976; Zachariades *et al.*, 1985; Woolgar *et al.*, 1987; El-Hajj & Anneroth, 1996; Hsun-Tau, 1998; Regezi & Siculba, 1999; Ali & Baughman, 2003). Hsun-Tau (1998), avaliou 70 casos de QOs, destes, 48 (68,5%) foram encontrados na mandíbula, dos quais 35 ocorreram na região posterior e 9 acometem a região anterior e posterior, e 37 pacientes apresentavam 46 lesões associadas a dentes inclusos. Ahlfords *et al.* (1984), observaram 319 QOs em 255 pacientes, a maioria das lesões acometia a mandíbula (75%) e destas, 95% ocorriam em região posterior aos caninos.

Lesões de pequenas dimensões são frequentemente assintomáticas, sendo somente diagnosticada com um exame radiográfico de rotina. O QO tem um notável potencial de crescimento, invadindo inicialmente os espaços medulares no sentido antero-posterior. A expansão óssea ocorre em lesões de grandes dimensões. A infecção secundária pode provocar dor, tumefação e, em alguns casos, drenagem (Barnnon & Colonel, 1976; Zachariades *et al.*, 1985; Woolgar *et al.*, 1987; Hsun-Tau, 1998; Gil *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2001).

Radiograficamente apresenta-se como uma radiotransparência bem circunscrita com margens regulares e limites radiopacos delgados, multiloculações podem estar presentes e tendem a ser vistas em lesões maiores (Barnnon & Colonel, 1976; Gil *et al.*, 2000; Ézsias, 2001). Em 25 a 40% dos cistos, um dente incluso mostra-se envolvido na lesão (Neville *et al.*, 1995). Outros achados incluem deslocamento dental, mobilidade dental, reabsorção radicular, divergência radicular e extrusão dental (Ahlforde *et al.*, 1984).

Na microscopia convencional, o QO, freqüentemente, revela um forro estreito, uniforme e corrugado, do tipo pavimentoso estratificado paraceratinizado com seis a dez camadas de espessura. A camada basal é composta de células colunares ou cúbicas, dispostas em paliçada, polarizada, muitas vezes com hipercromatismo e a interface epitélio/conjuntivo é plana. A cápsula conjuntiva bem vascularizada, fina e friável, em geral, é livre de inflamação (Barnno & Colonel, 1976; El-Hajj & Anneroth, 1996; Regezi & Siculba, 1999). (figuras 11, 12, 13, 14, e 15) Outras características que podem ser observadas incluem revestimento formado por focos de epitélio ortoceratinizado, cristas epiteliais, restos de epitélio odontogênico, formação de cistos satélites na cápsula cística, além da presença de infiltrado inflamatório de ocasional a intenso (Barnnon & Colonel, 1976; Sapp *et al.*, 1997). (figura 16) Formatora *et al.* (2001), relataram um caso de metaplasia cartilaginosa na cápsula de um QO.

Os QOs são lesões que podem apresentar aspectos clínico-radiográficos indistinguíveis de outros cistos e tumores odontogênicos, tais como o cisto dentígero (CD), cisto radicular (CR), ameloblastoma unicístico e o cisto odontogênico ortoceratinizado (Barnnon & Colonel, 1976; Ahlforde *et al.*, 1984; Souza *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2001; Regezi, 2002); sendo necessário uma avaliação histopatológica, além de dados clínicos e imagiológicos para estabelecimento do diagnóstico definitivo e avaliação da correta conduta terapêutica. Barnnon & Colonel (1976), relataram que o diagnóstico clínico de 167 QOs só foi correto em 2 casos, sendo as lesões mais confundidas o CD (42 casos), cisto residual (32 casos) e ameloblastoma (16 casos).

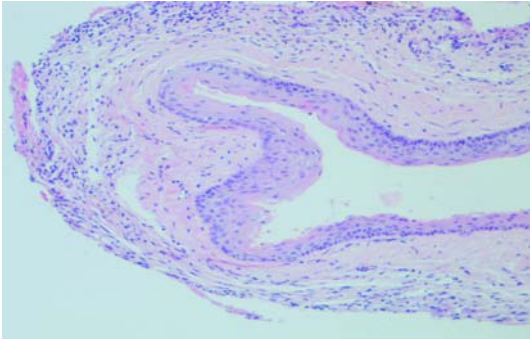


Figura 11 – HE (40x), Limitante epitelial fino, circundado por cápsula de tecido conjuntivo.

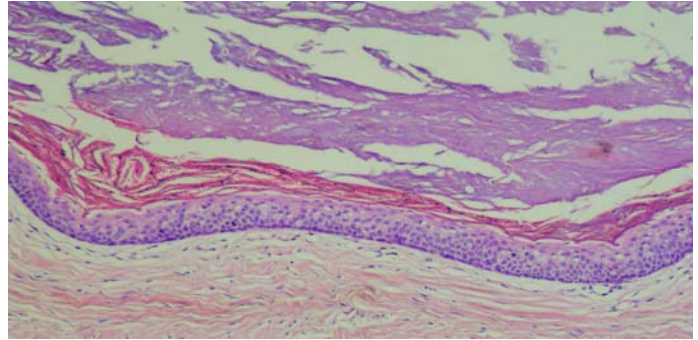


Figura 12 – HE (40x), Forro epitelial estratificado sem projeções epiteliais. Lúmen do cisto preenchido por queratina descamada.

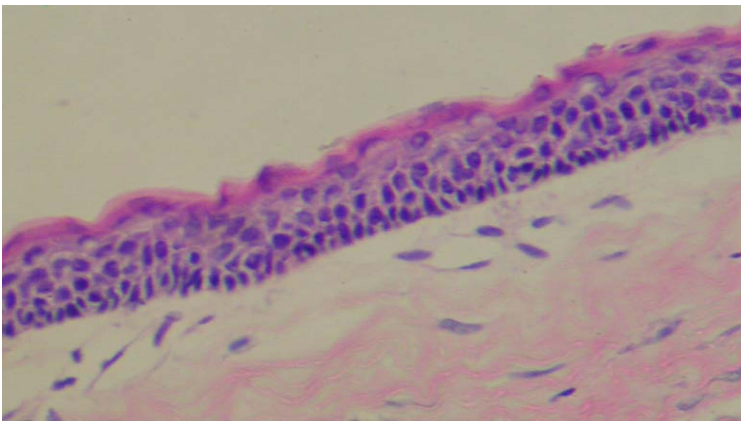


Figura 13 – HE (100x), O limitante epitelial é fino, mostrando uma superfície paraceratinizada com aparência corrugada ou “ondulada”.

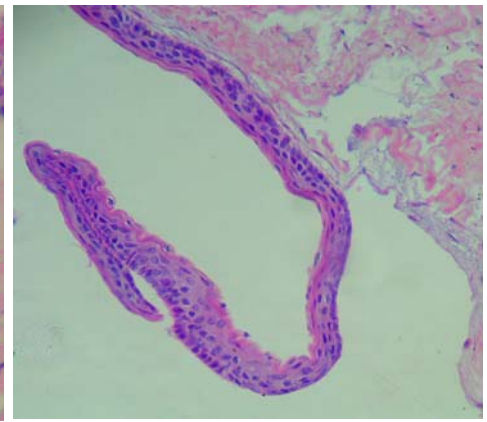


Figura 14 – HE (40x), A ligação epitélio/conjuntivo é fraca, e muitas vezes leva à separação dos dois tecidos.

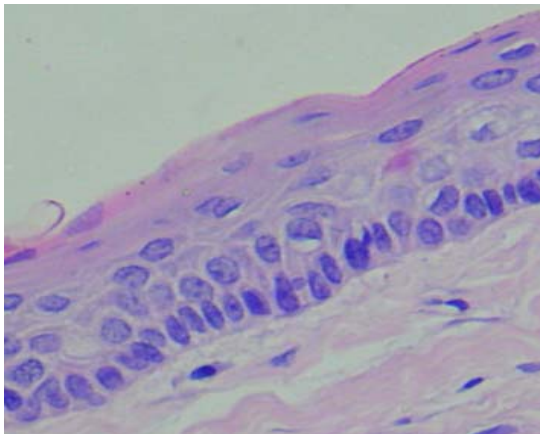


Figura 15 – HE (400x), A camada basal do epitélio é composta por células colunares, em paliçadas e hiper Cromáticas.

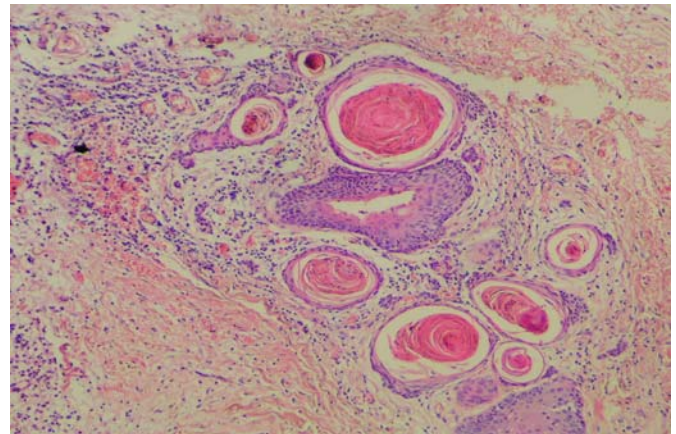


Figura 16 – HE (40x), Múltiplos cistos satélites numa área de espessamento fibroso da cápsula cística.

O comportamento localmente agressivo é justificado, em parte, por suas características histopatológicas que revelam grande atividade forro-capsular com proliferação celular evidente, que mais se assemelha a um neoplasma benigno (Ahlforde *et al.*, 1984; Zachariades *et al.*, 1985; Sapp *et al.*, 1997; Shear, 2002c). Silva *et al.* (2002), utilizando marcadores epiteliais de queratinização terminal e de maturação da matriz extracelular, observaram que tanto o forro epitelial como a cápsula conjuntiva dos QOs são instáveis e imaturas, justificando o comportamento biológico neoplásico-símile desta lesão.

Scharffetter *et al.* (1989), relataram que a proliferação do epitélio e do tecido conjuntivo do QO eram irregulares e em grupos não homogêneos. Segundo os autores, havia tanto áreas em que o epitélio e o tecido conjuntivo tinham proliferação simultânea, como áreas onde esta se dava de forma alternada.

O tratamento convencional é a enucleação cirúrgica, que pode estar associada a cauterização com agentes químicos, a osteotomia periférica e/ou a crioterapia, a fim de reduzir a frequência de recorrência (Hsun-Tau, 1998; Kondell & Winberg, 1998; Blanas *et al.*, 2000; Stoelinga *et al.*, 2001; Ézsias, 2001; Woolgar *et al.*, 2001). A marsupialização seguida de enucleação é indicada em lesões de grandes proporções (Marker *et al.*, 1996; Blanas *et al.*, 2000; Algust *et al.*, 2003).

Um dos mais importantes aspectos do comportamento biológico do QO é a recidiva após o tratamento. Relatos de recorrência que variam de 8.5 a 58% dos casos têm sido reportados após ressecção em bloco, enucleação com ou sem terapia adjuvante (agentes químicos) ou marsupialização (Tabela 3). Algumas teorias têm sido propostas para explicar a tendência do QO recidivar. Relatos atribuem essas teorias às propriedades físicas da lesão (cápsula friável), sua extensão e localização, e sugerem que a persistência está relacionada a um tratamento inadequado. Outras apontam para a presença de restos epiteliais ou microcistos em tecidos circunjacentes como fatores importantes. Tem sido notado, em particular, que o QO paraceratinizado comporta-se de forma mais agressiva que a variante ortoceratinizada (Barnnon & Colonei, 1976; Zachariades *et al.*, 1985; Scharffetter *et al.*, 1989; Myoung *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002; Shear, 2002c; Li *et al.*, 2003).

O Queratocisto Odontogênico Ortoceratinizado (QOO) é uma lesão rara, correspondendo de 3,5 a 28% dos casos de QO (Ahlforde *et al.*, 1984; Sant'Ana *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). Esta lesão possui características histopatológicas próprias, que foram revistas por Silva *et al.*, (2001) e subdividida com as seguintes características: 1) revestimento

epitelial estreito, uniforme, por vezes descontínuo e, ocasionalmente, destacado da cápsula cística; 2) revestimento epitelial totalmente ortoceratinizado, sem evidência de corrugação na camada superficial e sempre associado a uma camada granulosa evidente; 3) camada espinhosa estreita onde, ocasionalmente, discretas áreas de acantose e edema intracelular; 4) camada basal pouco pronunciada e formada por células cuboidais e/ou pavimentosas planas ou baixas, sem evidência de polarização; 5) interface epitélio/conjuntivo plana; 6) cápsula cística constituída de tecido conjuntivo denso, discretamente vascularizado, podendo exibir infiltrado inflamatório ocasional e 7) presença freqüente de lâmina de queratina na cavidade cística.

Tabela 3. Revisão de estudos relacionados à recorrência dos QOs.

Autores	Nº de casos	Nº de recorrência	%
Barnnon <i>et al.</i> (1976)	283	34	12
Ahlfors <i>et al.</i> (1984)	255	69	27
Zachariades <i>et al.</i> (1985)	16	4	25
Woolgar <i>et al.</i> (1987)	682	95	14
Kondell <i>et al.</i> (1988)	29	7	24
Berrone <i>et al.</i> (1994)	62	18	29
Marker <i>et al.</i> (1996)	23	2	8.5
El-Hajj <i>et al.</i> (1996)	62	25	40
Hsun-Tau <i>et al.</i> (1998)	70	7	10
Myoung <i>et al.</i> (2001)	132	77	58
Stoelinga <i>et al.</i> (2001)	82	9	11
Total	1696	347	20

Stoelinga *et al.* (2001), avaliaram a conduta terapêutica para 82 QOs diagnosticados em 80 pacientes e relataram que a aplicação de solução de Carnoy (Álcool absoluto 6mL, cloroforme 3 mL, ácido acético glacial 1mL e cloreto férrico 1g) na cavidade óssea, após a enucleação cística, é uma manobra eficaz na prevenção de recidivas.

Marker *et al.* (1996), em estudo avaliando o comportamento de QOs de grandes dimensões submetidos à descompressão e posterior enucleação, observaram que de 23 casos acompanhados apenas, dois recidivaram. No artigo, é relatado que, apesar do tratamento exigir um maior compromisso, tanto por parte do paciente como do profissional, as vantagens são animadoras para ambas as partes; isto ocorre, pois além da diminuição da lesão, o contato direto da cavidade cística com o meio bucal provoca alterações estruturais tanto no epitélio quanto na cápsula conjuntiva. Estes dados corroboram com os de August *et al.*, (2003).

Independente da técnica realizada para o tratamento do QO é consenso a importância de um acompanhamento criterioso (Hsun-Tau, 1998; Kondell & Winberg, 1988; Marker *et al.*, 1996; Stoelinga *et al.*, 2001). A frequência de recidiva é maior nos primeiros cinco anos, mas casos após dez anos têm sido relatados por Barnnon *et al.* (1976) e Berrone *et al.* (1994). Stoelinga *et al.* (2001), relataram um caso de recorrência após 25 anos. Myoung *et al.*, (2001) relataram que dos nove pacientes de seu estudo ocorreram duas ou mais recorrências. A tabela 4 resume alguns estudos relacionados ao tempo de recorrência.

Tabela 4. Revisão de trabalhos que mostraram o tempo médio de recorrência dos QOs.

Autores	Recorrência	Tempo em anos		
		≤ 5	5--10	≥ 10
Barnnon <i>et al.</i> (1976)	28	18	3	3
Ahfors <i>et al.</i> (1984)	69	96	---	---
Zachariades <i>et al.</i> (1985)	4	4	---	---
Woolgar <i>et al.</i> (1987)	95	66	*	*
Berrone <i>et al.</i> (1994)	15	11	1	3
Marker <i>et al.</i> (1996)	2	2	---	---
Hsun-Tau <i>et al.</i> (1996)	7	6	---	1
Stoelinga <i>et al.</i> (2001)	9	6	1	2
Total	214	171	**	**

*84 casos recidivaram até 7 anos.

** dados não computados, pois a referência 4 não forneceu informações suficientes

O tratamento preconizado para as lesões recidivantes deve ser o mesmo das lesões solitárias, pois trabalhos comparando ambas as lesões não observaram distinção em seus aspectos clínicos, histopatológicos e em sua capacidade proliferativa (Li *et al.*, 1995; Lobardi *et al.*, 1995; Woolgar *et al.*, 1997).

Múltiplos QOs, em um único paciente, são uma característica constante da Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular (Síndrome de Gorlin-Goltz). Esta síndrome é herdada de forma autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variada. Shear (2002b) relata que o gene PTCH, associado a Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular (SCNB), é um gene supressor tumoral, mapeado no cromossomo 9q 22.3 e que mutações neste gene têm se mostrado um importante passo na patogênese dos QOs (Lench *et al.*, 1996) Além dos cistos dos maxilares, podem ser observados múltiplos carcinomas de células basais, anomalias nas costelas e vértebras, calcificações intracranianas, pequenos cistos epidermóides, metacarpos encurtados, fibromas no ovário e meduloblastoma (Honavar *et al.*, 2001; Bitar *et al.*, 2002).

Os QOs associados a SCNB possuem características histológicas semelhante às lesões isoladas, mas em pacientes síndrômicos é observado lesões com maior potencial de crescimento e maior probabilidade de recidiva. O comportamento distinto destas lesões tem sido foco de alguns estudos que demonstram a maior capacidade proliferativa dos QOs síndrômicos (Li *et al.*, 1995; Lobardi *et al.*, 1995; El Murtadi *et al.*, 1996; Lo Muzio *et al.*, 1999); mas, no trabalho realizado por Carvalhas *et al.* (1998), os resultados não apresentaram diferença significativa entre o número de AgNORs por núcleo.

A literatura descreve casos de displasias epiteliais e de carcinomas acometendo o forro epitelial de QOs, mas estes são relatos muito raros (Ahlforde *et al.*, 1984; Makowski *et al.*, 2001). Proliferações ameloblásticas também foram documentadas (Souza *et al.* 1994). O potencial de transformação neoplásica foi avaliado utilizando a marcação da proteína gerada pelo gene p53, onde foi demonstrado um baixo potencial de malignização destas lesões (Ogden *et al.*, 1992).

2.2- Proliferação Celular

Estudos a cerca da proliferação celular, bem como os mecanismos reguladores do ciclo celular têm contribuído largamente para as pesquisas que tratam da biologia dos diversos tipos de lesões, com importante reflexão no diagnóstico, prognóstico e terapêuticas das mesmas.

Ciclo celular é o termo utilizado para descrever uma série de eventos processados ordenadamente, os quais asseguram a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica, e a divisão destes componentes em duas células filhas.

No início da década de oitenta o ciclo celular já era estabelecido em duas fases principais: a interfase e a mitose. Por muitos anos os citologistas preocuparam-se primordialmente com o período da mitose, durante o qual as profundas alterações cromossômicas eram vistas ao microscópio. Observou-se, entretanto, que a interfase é um período de atividade biossintética intensa, durante o qual a célula dobra de tamanho e duplica o seu complemento cromossômico (de Robertis & de Robertis, 1993). Atualmente, estabelecendo-se um princípio de organização, o ciclo celular é frequentemente considerado

como sendo composto de 4 fases: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período depois da replicação do DNA (G2) e a fase mitótica que culmina com a divisão celular (de Robertis & de Robertis, 1993; Rabenhorst *et al.*, 1993; Rabenhorst *et al.*, 1994; Cotran *et ali*, 1999).

A entrada e a progressão de células através do ciclo celular são controladas por diversas moléculas que culminam por mudanças nos níveis de ciclinas. Níveis de várias ciclinas, denominadas A, B1-2, D1-3 e E, têm seu pico durante fases específicas do ciclo celular, e são rapidamente degradadas à medida que a célula entra na fase seguinte do ciclo celular. As ciclinas desempenham suas funções formando complexo com um grupo de proteínas expressadas constitutivamente denominadas Quinases Ciclina-Dependentes (CDKs). Diferentes combinações de ciclinas e CDKs são associadas em cada uma das importantes transições do ciclo celular (Gordon-Cardo, 1994; Rabenhorst *et al.*, 1994; Cotran *et al.*, 1999).

A regulação do ciclo celular ocorre em dois pontos principais denominados pontos de restrição (*check points*): no período de G2 tardio, antes da entrada da célula em mitose; e na interfase, ao final de G1, no período chamado start. A regulação no período de start é muito mais controlada que a passagem para a entrada em mitose (Rabenhorst *et al.*, 1993; Rabenhorst *et al.*, 1994). O movimento através do start é controlado indiretamente por nutriente, hormônios e fatores de crescimento, que atuam anteriormente, ou seja, no G1 precoce. Os estágios do ciclo celular que se seguem ao G1 tardio (S, G2 e M) processam-se independentemente dos fatores externos (Rabenhorst *et al.*, 1993).

Inicialmente, a taxa de proliferação celular era avaliada pela observação das figuras de mitose, que como vimos, representa apenas uma fase do desenvolvimento celular. Com a descoberta de inúmeras proteínas que desempenham papel fundamental no ciclo celular, outros métodos foram desenvolvidos permitindo a identificação de maneira mais objetiva das células ciclisantes (Rabenhorst *et al.*, 1993; Rabenhorst *et al.*, 1994).

Dentro do contexto de se identificar as células em proliferação, atualmente algumas proteínas relacionadas com a fase replicativa têm sido utilizadas como marcadores e detectados através de anticorpos monoclonais como a polimerase-alfa, PCNA e o Ki-67, sendo estes dois últimos, os mais utilizados. A aplicabilidade destes anticorpos torna possível a investigação de numerosas lesões de modo simples, não dispendioso e reproduzível (Rabenhorst *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995).

2.2.1- Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA)

A PCNA é uma proteína nuclear que possui massa molecular de 36kDa, identificada como um co-fator da polimerase-delta, necessário à síntese de DNA e, portanto, à progressão do ciclo celular (figura 17). Sua distribuição, durante a divisão celular, tem início em G1 com pico na interfase G1/S e declínio em G2. Apesar de essencial para a síntese de DNA durante a fase S, sua meia vida é longa e conseqüentemente níveis detectáveis podem estar presentes em células que não estão mais em divisão (Hall & Woods, 1990; Li *et al.*, 1994). Na fase S, a PCNA é observada em sítios nucleolares durante a atividade sintética do DNA e sua localização, mas não sua síntese, é dependente da replicação do DNA (Downey *et al.*, 1990).

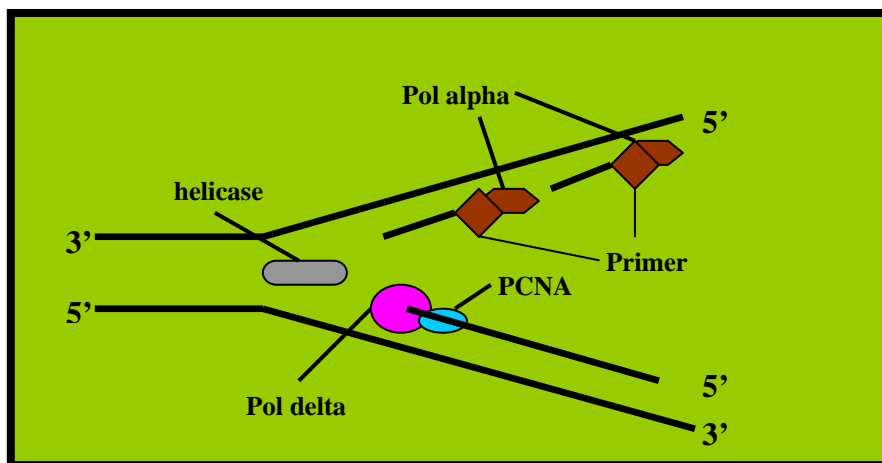


Fig 17 – Papel da PCNA na replicação de DNA.

Zuber *et al.* (1989), avaliaram o envolvimento do PCNA na replicação do DNA em células vivas. A atividade da PCNA foi bloqueada por anticorpos contra o PCNA em amostras de ovos da *Xenopus laevis* e plasmídeos resultando na inibição da replicação.

Apesar de ser considerado um marcador de proliferação celular, alguns estudos têm mostrado que a expressão de PCNA pode também ser associado com reparo de DNA e/ou estimulação por fatores de crescimento (Alisson & Best, 1998).

Toschi & Bravo (1998), avaliaram a marcação da PCNA em fibroblastos humanos quiescentes irradiados por radiação ultravioleta e demonstraram que a ação da radiação UV nos fibroblastos, induzia o aumento do reparo do DNA e da marcação pelo

PCNA. A marcação da PCNA depende da dose de radiação UV usada e foi concordante com a atividade de reparo de DNA determinada por autorradiografia.

A detecção imunohistoquímica do PCNA é realizada por meio de anticorpos mononucleares, incluindo o PC10, 19A2 e 19F4, que reconhecem diferentes tipos de epítomos. Apesar de representarem a mesma proteína, estes anticorpos possuem propriedades diferentes, como a capacidade de reagir com epítomos antigênicos resistentes à fixação em carnoy ou formalina, o que facilitou seu emprego em materiais colhidos rotineiramente ou a partir de arquivos (Hall & Levinson, 1990; McCormick *et al.*, 1993).

A marcação da PCNA é um dado importante na avaliação do comportamento biológico de lesões benignas e malignas. Tsuji *et al.* (1995), avaliaram a PCNA em um total de 75 casos de lesões benignas e malignas da cavidade oral, sendo 50 Carcinomas de Células Escamosas, 14 Leucoplasias e 11 Adenomas Pleomórficos. Células PCNA⁺ foram detectadas, em maior proporção, nos Carcinomas que nas Leucoplasias e nos Adenomas. Allison *et al.* (1998), não observaram correlação entre a intensidade de marcação da PCNA e o grau de diferenciação de Carcinomas Epidermóides orais.

2.2.2- Ki-67

O anticorpo Ki-67, utilizado para a detecção de células ciclizantes, foi assim designado por ter sido produzido na Universidade de Kiel (Alemanha), sendo que o clone produtor do anticorpo específico para este antígeno foi crescido na 67^a placa de cultura de tecido. Este Anticorpo representa uma IgG de camundongo contra uma linhagem celular L428 da Doença de Hodgkin (Rabenhorst *et al.* 1994).

A natureza do antígeno reconhecido pelo anticorpo Ki-67 não está de todo estabelecida. Recentes estudos sugerem que este antígeno seja um componente da matriz nuclear caracterizado como uma proteína não histona de peso molecular aproximado de 345 a 395 kDa. Este antígeno é expresso durante todo o ciclo celular (G1,S, G2, M), mas sua expressão antigênica aumenta na segunda metade da fase S, alcançando um pico máximo em G2 e M (Rabenhorst *et al.*, 1993; Brown & Gatter, 2002). Estas observações foram confirmadas por outros marcadores de proliferação celular tais com a Tymidina, incorporação de Bromodeoxyuridine e Citometria de Fluxo (Hall & Woods, 1990). Bruno *et al.* (1991),

observaram, através de citometria de fluxo, que o antígeno detectado pelo anticorpo Ki-67 era geralmente expresso em células ciclisantes, apresentando localização nucleolar, podendo ser utilizado amplamente na marcação da fração de crescimento de tumores.

Os primeiros anticorpos contra o antígeno Ki-67 eram utilizados somente em cortes de tecidos congelados, sendo limitada sua aplicação na rotina patológica cirúrgica (Rabenhorst *et al.*, 1993). Posteriormente, foram descobertos anticorpos monoclonais utilizando uma estrutura recombinante da proteína Ki-67, como imunógeno, designados MIB1-3, que podem detectar o antígeno Ki-67 em material fixado em formalina, desde que seja realizada recuperação antigênica pelo calor (Kubbutat *et al.*, 1994).

Souza *et al.* (1999), realizaram um estudo comparando a capacidade proliferativa do granuloma central de células gigantes com a do tumor central de células gigantes. Na avaliação, utilizando o Ki-67, os resultados mostraram que o tumor central de células gigantes apresentou menor capacidade proliferativa que o granuloma. Em outra pesquisa, realizada por Souza *et al.* (2000), também avaliando proliferação celular pelo Ki-67, PCNA e AgNORs em lesões de células gigantes; a lesão periférica de células gigantes apresentou maior capacidade proliferativa que a lesão central de células gigantes.

Saito *et al.* (1999), em um estudo avaliando a marcação do Ki-67 em lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral, observou um maior número de células Ki-67⁺ em Carcinomas Epidermóides e em Displasias graves quando comparados com Displasias leves e Carcinomas Verrucosos. Os Carcinomas Verrucosos são tumores malignos bem diferenciados e pouco agressivos.

Van Oidjen *et al.* (1998), relatam que nem todas as células que contêm o antígeno Ki-67 possuem atividade proliferativa, significando que em certos tecidos, o grande número de células Ki-67⁺ poderia superestimar o índice de proliferação celular. O autor aponta que o Ki-67 possui meia-vida longa podendo ser detectado em células que tenham concluído o ciclo mitótico.

2.2.3- Estudos avaliando os marcadores de proliferação celular em cistos odontogênicos e ameloblastomas

Um número representativo de trabalhos foi publicado durante a década passada sobre a detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), Ki-67 e, com menor expressão das Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNORs). Estes marcadores têm em comum o fato de que todos são expressos em células com atividade proliferativa, sendo utilizados para avaliar o comportamento biológico particularmente em neoplasmas. Dentre os Cistos Odontogênicos, o QO é pauta de grande parte das pesquisas tanto em casos esporádicos como em associação com a SCNB. Devido às evidências documentadas na literatura que o QO é uma lesão agressiva e sugerindo que pode ser considerado um neoplasma, não é surpresa a maior demanda de estudos aplicando esta metodologia.

Um dos primeiros estudos avaliando a capacidade proliferativa dos Cistos Odontogênicos pela expressão do PCNA realiza da por Ogden *et al.* (1992), utilizou uma série de doze QO, doze CD e doze Cistos Radiculares (CR) em secções processadas e fixadas na rotina. O anticorpo monoclonal utilizado foi o PC10 e a marcação positiva, mais intensa, esteve presente em todas as células da camada basal e na maioria das da camada suprabasal nos QOs.

Outro estudo usando o mesmo anticorpo monoclonal PC10 foi realizado por Li *et al.* (1994). Os autores avaliaram 31 cistos odontogênicos (onze QOs, dez CDs e dez CRs) e dez espécies de epitélio normal da mucosa oral. O forro epitelial dos QOs catalogados apresentou o maior número de células PCNA⁺, sendo que a maioria estava na camada suprabasal e menos que 5% na camada basal. O total de células PCNA⁺ foi significativamente maior ($p < 0.005$) que dos CDs. A predominância de células PCNA⁺ na camada suprabasal dos QOs foi coerente com os achados de um estudo anterior realizado pelo mesmo autor, onde foi documentada uma maior expressão de Receptores de Fator de Crescimento Epidermóide (EGFr) no estrato suprabasal (Li *et al.*, 1993).

Posteriormente, esses mesmos autores realizaram outro estudo para avaliar a capacidade proliferativa dos cistos odontogênicos utilizando a marcação da proteína Ki-67. Neste trabalho foi notada uma grande correlação entre a contagem de células positivas para o PCNA e Ki-67, indicando claramente que no estudo anterior os dados referentes ao PCNA refletem a proliferação celular, mas com maior número de células PCNA positivas, o que

pode ser reflexo de sua alta meia-vida, quando comparada à da Ki-67. Segundo os autores, o Ki-67 seria um marcador mais específico para as células proliferantes. Oliveira *et al.* (2001), relata que a alta meia-vida da PCNA pode ter contribuído pela alta expressão de células PCNA positivas em seu estudo (74,98% em média dos QOs estudados), porém, os autores acreditam que as células que expressam a PCNA refletem as características proliferativas dos QOs, principalmente pela marcação suprabasal do epitélio. A maior marcação da PCNA, quando comparada com o Ki-67, foi documentada em vários trabalhos (Souza *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000; Sandra *et al.*, 2001a; Meer *et al.*, 2003) indicando um comportamento distinto destes dois marcadores, como se segue.

Meer *et al.* (2003), avaliaram a capacidade proliferativa dos ameloblastomas pela marcação da PCNA e da Ki-67 e documentaram que a variante unicística apresentava maior capacidade proliferativa que a sólida, corroborando com Rosenstein *et al.*, 2001 e contradizendo os resultados de vários trabalhos com semelhante linha de pesquisa (Fujuoka *et al.*, 1996; Piatelli *et al.*, 1998; Sandra *et al.*, 2001a). Segundo os autores, a metodologia aplicada em cada trabalho é um fator importante e pode ser a causa dos resultados conflitantes.

Comparando os QOs com os ameloblastomas, todas as variantes dos ameloblastomas apresentam maior capacidade proliferativa tomando por referência a marcação pelo PCNA documentados em estudo realizado por Piatelli *et al.* em 1998, mas segundo Takaheshi *et al.* (1998), a média das percentagens de células PCNA positivas foi significativamente maior nos QOs que nos ameloblastomas. Neste ponto, os dados relatados na literatura não são conclusivos, assim novos trabalhos devem ser realizados incluindo também outros marcadores como o Ki-67, não relatado na literatura, para uma melhor compreensão do comportamento biológico destas lesões.

A média de marcação da PCNA, nos QOs, apresentou valores distintos variando de 15,8%, 23,5% e 74,98% nos trabalhos realizados por El Murtadi *te al.* (1996), Piatelli *et al.* (1998) e Oliveira *et al.* (2001) respectivamente. Esta comparação é impossível de ser realizada em todos os trabalhos, pois a forma de contagem de células é diferente, sendo que alguns usam a média das percentagens (El Murtadi *et al.*, 1996; Piatelli *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2001) e outros a média de células por milímetro de membrana basal (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Paula *et al.*, 2000). A diferença entre os valores documentados na marcação das

duas principais proteínas relacionadas à proliferação celular é um forte indicativo da necessidade de realização de trabalhos nesta área de pesquisa.

2.3- p53

O gene p53, situado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), foi identificado como oncogene em 1979 e só em 1989, constatou-se ser o seu produto genético, um regulador negativo do ciclo celular. O gene codifica uma fosfoproteína nomeada por seu peso molecular de 53kDa. Possui onze exons, que codificam 393 aminoácidos, existente em sua forma ativa como um tetrâmero, dividida em três regiões: 1- Extremidade NH₂ (N-terminal), similar aos fatores de transcrição; 2- Região central, sítio de ligação ao DNA; 3- Extremidade carboxil (C-terminal), necessária a oligomerização. (Batasakis & el-Naggar, 1995; Darntn, 1998; Nogueira *et al.*, 1998)

A proteína p53 desempenha um importante papel ao proteger as células da transformação maligna. É considerada o “guardião do genoma” por estabelecer a integridade física do genoma celular. Quando ocorre um dano ao DNA, a proteína p53 se acumula na célula parando o ciclo celular em G1, antes de entrar na fase S. A atuação da p53 no ciclo celular se dá pela sua função de ativador da transcrição. Um dos principais genes transativado pelo p53 é o p21. A proteína p21 inibe a cdk2 (quinase ciclina dependente) impedindo a fosforilação da pRb necessária para a entrada das células na fase S. A parada permite que a célula repare a lesão do DNA (Carson & Lois, 1998; Darntn, 1998; Nogueira *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999). Outros genes regulados pelo p53 podem afetar a síntese de DNA (GADD45), induzir a apoptose (BAX), modular a resposta a agentes terapêuticos (MRD-1) e da angiogênese (Delfino *et al.*, 1997). (Figura 18)

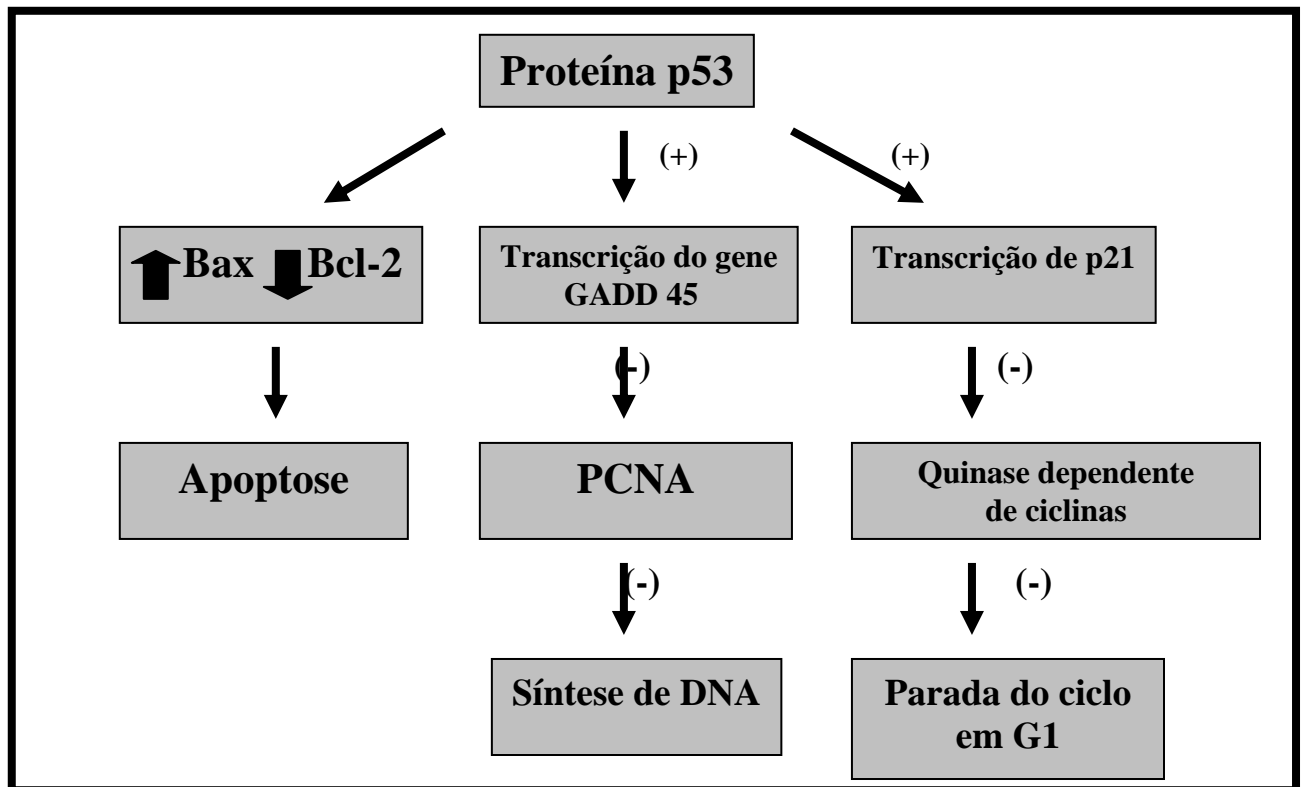


Figura 18 - Resumo da modulação do ciclo celular e indução a apoptose pelo gene p53.

Se a via de reparo falhar, a proteína p53 pode ativar a via apoptótica. Em muitos modelos de apoptose, a liberação do citocromo C das mitocôndrias parece constituir uma etapa crítica na cadeia de eventos que levam a apoptose. Acredita-se que a proteína bcl-2 e proteínas relacionadas, localizadas estrategicamente nas membranas mitocondriais externas, possam regular a saída do citocromo C das mitocôndrias para o citoplasma. O modo exato pelo qual esse trânsito do citocromo C é regulado não está totalmente esclarecido; entretanto há algumas evidências de que a bax forma um canal na membrana mitocondrial que permita a saída do citocromo C, enquanto a bcl-2 bloqueia a atividade de formação dos canais pela bax, inibindo a apoptose (Cotran *et al.*, 1999).

Os genes bax e IGF-BP3 são dois genes responsivos da p53 envolvidos na via da morte celular. O bax se liga à proteína inibidora da apoptose bcl-2 e a antagoniza. O IGF-BP3 liga-se ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e, presumivelmente, induz a apoptose ao bloquear a sinalização intracelular mediada pelo IGF (Darntn, 1998; Cotran *et al.*, 1999).

Vários genes apoptóticos que são ativados pelo p53 têm sido identificados, sugerindo que a resposta apoptótica do p53 possui múltiplas vias. Recentemente, outros

membros pró-apoptóticos da família bcl-2 nomeados de NOXA e PUMA foram relacionados como alvo do gene p53. Estas proteínas, assim como outro produto do gene p53 (p53 AIP1), estão localizados na mitocôndria promovendo a perda do potencial da membrana mitocondrial e liberação do Citocromo C, ativando assim a Apaf-1/caspase-9 da cascata apoptótica. Alteração na integridade mitocondrial também pode ser mediada por outros genes relacionados ao p53 (PIGs) provocando apoptose. Têm sido proposto que espécies de oxigênio reativo (EOR) produzidas pelos PIGs causam dano a mitocôndria iniciando a apoptose (Balint & Vousden, 2001).

Expressão mínima de dois receptores de membrana, Fas/APLO-1 e DR5/KILLER, e um ligante denominado Fas L, que induzem a apoptose, têm sido relacionados com estimulação por p53. O PIDD é outro receptor que também é citado na indução da apoptose pelo p53 (Balint & Vousden, 2001). (Figura 19)

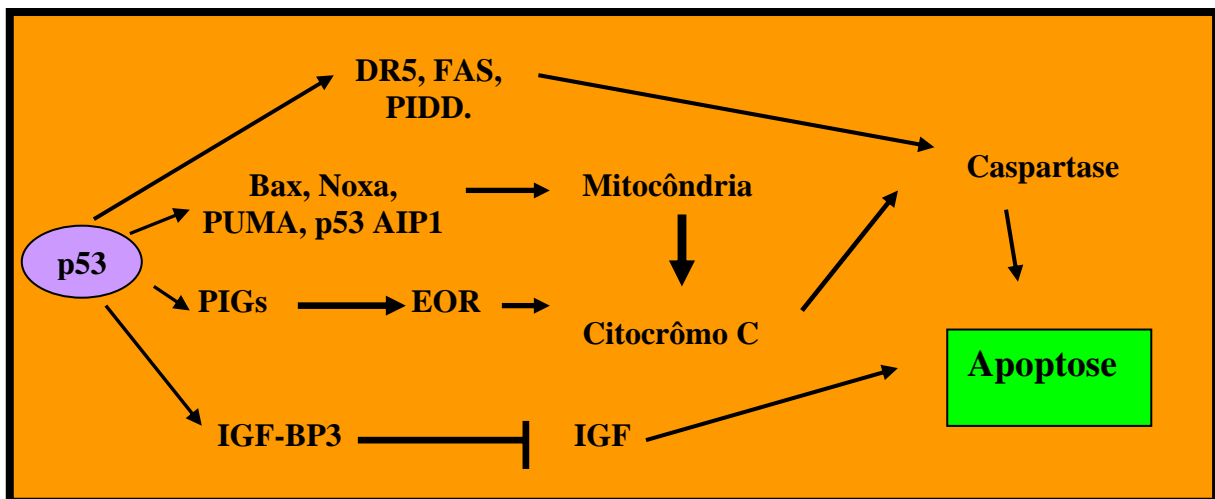


Figura 19- Resumo da indução da apoptose pelo p53

Se o gene p53 é mutante, a célula poderá passar através do ciclo celular com seu DNA danificado. Desse modo, os mecanismos de parada do DNA e a ativação das vias de reparo e apoptose são perturbadas, com conseqüente seleção de clones com potencial de malignidade.

Mutações do gene p53 são as mais freqüentes anomalias genéticas encontradas em cânceres humanos, com envolvimento em mais de 50% dos tumores (Carson & Lois, 1995; Darntn, 1998; Cotran *et al.*, 1999).

A perda da função da p53 pode ocorrer de várias maneiras: 1- em nível genético, como na deleção de um ou dois alelos (síndrome de Li-Fraumeni e Xeroderma Pigmentoso), mutações sem sentido e mutações sentido trocado, que são mais comuns, e provocam a redução ou alteração dos tetrâmeros da proteína, alterando sua funcionalidade; 2- em nível protéico, como nas infecções por HPV, onde a proteína E6 viral tem afinidade pela p53, desativando-a e desta forma impedindo sua ação (Nogueira *et al.*, 1998).

A proteína p53 selvagem é virtualmente indetectável em células normais devido sua curta meia vida, que não ultrapassa vinte minutos. A variante mutada, por sua vez, apresenta longa meia vida (21 horas) possibilitando sua detecção (Darntn, 1998).

Mutações do p53 podem ser detectadas por diversos métodos laboratoriais. Diretos como pela reação de polimerase em cadeia (PCR) do DNA ou do RNA, seguida pelo polimorfismo conformacional de simples fita (SSCP) ou pelo sequenciamento, ou indiretos, através da imunohistoquímica, usando anticorpos que detectam o acúmulo da proteína mutante nos tecidos. Este último é o mais utilizado, principalmente pela facilidade metodológica e por ser um método de rotina em muitos laboratórios (Darntn, 1998; Nogueira *et al.*, 1998).

Loyola *et al.* (1995), avaliaram a proteína p53 em 24 casos de Carcinomas Epidermóides da mucosa bucal, dos quais 54% expressaram a proteína em intensidade e padrão variados. Em 69% dos casos positivos, a marcação foi observada em mais de 50% das células neoplásicas.

Além de se utilizar a p53 para avaliar comportamento clínico, auxiliar o diagnóstico, estabelecer prognósticos e indicar tratamentos mais eficazes para as neoplasias malignas, a detecção da p53 também está presente em muitas pesquisas em lesões cancerisáveis e para avaliar o comportamento biológico de lesões benignas com maior potencial de agressividade (Jin *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 1999; Partridge *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Saranath *et al.*, 1999).

Tsuji *et al.* (1995), avaliaram a expressão da proteína p53 em um total de 75 casos de lesões benignas e malignas da cavidade oral, sendo 50 Carcinomas de Células Escamosas, 14 Leucoplasias, e 11 Adenomas Pleomórficos. Células p53⁺ foram freqüentemente vistas nos carcinomas, e raramente nas leucoplasias e nos adenomas.

Nogueira *et al.* (1998), realizaram estudo imunohistoquímico da expressão da proteína p53 e sua correlação com lesões benignas e malignas da cavidade oral. Os autores documentaram que 22,2% das lesões benignas estudadas apresentaram positividade para a p53, sendo sua maioria fracamente corada e a coloração se limitava à camada basal. Com relação à marcação da p53 em lesões benignas, essa não foi considerada pelos autores como uma mutação, e sim como uma atividade normal desta proteína na camada basal do epitélio.

Li *et al.* (1996), realizaram estudos, utilizando a p53, em QOs (onze solitários, cinco recorrentes e seis associados a SCBN), CR e CD. Foram testados três tipos de anticorpos, sendo que o clone BP53-12 apresentou marcação mais intensa e consistente; este foi detectado em todos os tipos de cistos. Para avaliar a presença de mutações do gene p53 foram realizados testes de PCR-SSP em dez QOs (quatro solitários, dois recorrente e dois associados a SCNB) e sequenciamento direto de 2 espécimes frescos de QOs (um solitário e um sindrômico). Não foi observada anormalidade em nenhum dos casos dos DNAs avaliados, sendo os achados semelhantes ao do gene p53 normal usados como controle. De posse dos resultados, os autores sugeriram que a expressão da proteína p53 no epitélio dos QOs não é reflexo de alterações do gene p53, sendo provavelmente reflexo de uma maior produção e/ou estabilização da p53 normal.

Lo Muzio *et al.* (1999), avaliaram 32 casos de QOs (16 esporádicos e 16 associados a SCBN) comparando a expressão do PCNA e oncoproteínas p53, bcl-2 e bcl-1 (ciclina D1). A maioria dos forros epiteliais dos QOs sindrômicos mostrou imunopositividade nuclear para p53, ciclina D1 e maior número de células PCNA⁺. Todos os QOs esporádicos foram negativos para p53 e Ciclina D1. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na marcação do bcl-2. Os autores concluíram que a maior expressão da Ciclina D1 e p53 pode ser considerado um marcador qualificado para fenômenos de mutação celular. Assim, a principal das hipóteses que justificaria o comportamento clínico agressivo seria devido a desregulação da ciclina D1 e p53, envolvidas no controle da proliferação celular.

Em vista do acima exposto, observa-se que, apesar dos vários estudos documentados na literatura, não existe um consenso referente ao significado da detecção da proteína p53 nestas lesões odontogênicas. Como relatado anteriormente, há também uma diferença entre os valores relatados na marcação das duas principais proteínas relacionadas à proliferação celular. Estes dados comprovam a necessidade da realização de trabalhos nessa

linha de pesquisa para que se possa compreender melhor o comportamento biológico destas lesões.

OBJETIVOS

- Avaliar capacidade de proliferação celular dos Cistos Dentígeros, Queratocistos Odontogênicos e Ameloblastomas Unicísticos pela marcação com o Ki-67 e PCNA;
- Comparar a marcação da atividade proliferativa nos Cistos Dentígeros, Queratocistos Odontogênicos e Ameloblastomas Unicísticos entre os dois marcadores;
- Pesquisar a ocorrência de expressão da proteína p53 em Cistos Dentígeros, Queratocistos Odontogênicos e Ameloblastomas Unicísticos;
- Correlacionar os achados da expressão da p53 e do Ki-67 e/ou PCNA entre um grupo de Cistos Dentígeros, um grupo de Queratocistos Odontogênicos e um grupo de Ameloblastoma Unicísticos;
- Correlacionar os achados da expressão da p53 e do Ki-67 e/ou PCNA em Queratocistos Odontogênicos esporádicos e associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra¹ foi constituída de dez casos de CDs, quinze casos de QOs (nove casos esporádicos e seis associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular) e cinco casos de AUs diagnosticados no laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC, laboratório de patologia do Instituto de Prevenção e Combate ao Câncer (CE), laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Fortaleza e laboratório de Patologia Bucal do Centro Integrado de Diagnóstico Oral. A partir do material emblocado em parafina, foram preparados cortes de cinco micrômetros, para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmação dos diagnósticos histopatológico e para os estudos imunohistoquímicos. Casos com componente inflamatório que abrangia toda extensão da lesão foram descartados, pois há indicadores que esta pode influenciar nos resultados (Paula *et al.*, 2000).

A técnica imunohistoquímica utilizada foi a da estreptoavidina-biotina peroxidase (ABC) descrita por Hsu *et al.*, (1981) com algumas modificações, cujos passos principais serão descritos a seguir. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e lavados com água corrente seguidos de recuperação antigênica em forno de microondas convencional por 15-20 minutos, potência máxima, em solução tampão de citrato 10mM (pH 6,0). Após o bloqueio com a peroxidase 3% por dez minutos, segue-se a incubação com os anticorpos monoclonais anti-PCNA (DAKO A/S, Denmark – Clone PC10 – diluição 1:20), Ki-67 (DAKO, France – Anti Ki-67 – diluição 1:60), anti-p53 (DAKO A/S, Denmark – Clone DO-7 – diluição 1:80) overnight à temperatura de 4^oC. As lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário (DAKO A/S, Denmark – Clone N^o EO354 – diluição 1:200). A detecção foi feita usando o complexo streptoavidina-biotina (DAKO) incubado por 45 minutos. Após cada incubação os cortes foram lavados em PBS. A visualização da reação foi feita com solução 3,3'diaminobenzidina (DAKO) a 1 mg/mL em Tris-HCl (pH 7.0) e H₂O₂ (concentração final de 0,06%). Os cortes foram contracorados com solução de hematoxilina de Harrys durante 1 minuto, desidratados e recobertos com lamínula de vidro.

¹ O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará.

Para cada marcador, em cada reação, foi utilizado um caso de tumor gástrico sabidamente positivo para os mesmos. O controle negativo foi o caso controle positivo sem a presença do anticorpo primário.

4.1- Análise imunohistoquímica

A leitura das lâminas de imunohistoquímica para PCNA, Ki-67 e p53, foi feita por 2 observadores, em microscópico ótico (Olimpus) com aumento de 400x. Os campos escolhidos para análise foram aleatórios, seguindo o revestimento epitelial cístico, sendo suprimidas as áreas que apresentaram dobras ou ausência de epitélio.

O critério histopatológico para identificar as células da camada basal, nos QOs, foi o mesmo adotado por Oliveira *et al.* (2001), onde foi avaliada a morfologia nuclear. As células acima da camada basal com núcleo esférico foram consideradas como suprabasais e as células que apresentavam forma nuclear pavimentosa foram consideradas como superficiais e não foram contadas.

Foram considerados como positivos os núcleos de células que apresentaram coloração castanha, não importando a intensidade ou tipo de granulação. Cada núcleo, com marcação imunohistoquímica, foi contado como uma unidade.

As contagens de todos os campos analisados em cada lâmina foram anotados em uma planilha. A média do total de células contadas, em cada lâmina, foi de 800 células, incluindo as células da membrana basal e suprabasal.

Nas amostras utilizadas para avaliar a marcação da proteína p53, as lesões que apresentavam menos de 5% dos núcleos corados ou que apresentavam coração inespecífica foram consideradas negativas.

4.2- Análise estatística

Para comparar as médias obtidas no forro epitelial dos QOs, CDs e AUs pelo PCNA, Ki-67 e p53, foi utilizado o Teste t-student para as amostra emparelhadas, com nível de significância de 0.05%.

RESULTADOS

A amostra foi composta de seis homens e treze mulheres (oito amostras não referendavam o sexo dos pacientes). A idade variou de 20 a 63 anos nos QOs (média de 42 anos), de 8 a 58 anos nos CDs (média de 26,5 anos) e de 13 a 20 anos nos AUs (média de 15 anos).

A expressão da PCNA e da Ki-67, nas células epiteliais, foi geralmente confinada ao núcleo; a reatividade citoplasmática ocorreu apenas em áreas ocasionais. O número e a distribuição da marcação de ambas às proteínas variou entre os tipos de cistos estudados. A marcação da PCNA esteve presente em todos os forros epiteliais, já a marcação do Ki-67 não foi detectada em algumas amostras de CDs. A média da percentagem de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ documentadas no forro epitelial dos QOs (46,4 e 13,7%) foi significativamente maior que a dos CDs (26,2 e 7,9%) (P<0.05). (figuras 22 e 23) As amostras apresentaram um percentual de células PCNA⁺ significativamente maior que a marcação pelo Ki-67 (tabela 5), mas a distribuição da marcação frente aos estratos epiteliais teve comportamento semelhante. (figuras 20 e 21) O epitélio dos QOs apresentou maior percentagem de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ no estrato suprabasal. (tabela 6)

Nos casos de CD, documentamos uma marcação predominante nas camadas basais do epitélio. Não realizamos uma contagem discriminando as camadas, pois a delimitação entre as camadas era inexistente em alguns casos. (figura 23)

Os QOs (46.4%) apresentaram média de células PCNA positivas maior que a dos AUs (35,9%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (P=0.136). Apesar dos dados obtidos com o PCNA revelarem um equilíbrio entre a capacidade proliferativa das lesões, a marcação utilizando Ki-67 demonstrou que os AUs (24,4%) apresentavam maior índice de marcação que os QOs (13,7%) (P<0.05). (figura 24)

Tabela 5- Media das percentagens da expressão da PCNA e Ki-67 em lesões odontogênicas.

	Nº	PCNA	Ki-67
Queratocisto	15	46,4	13,7
Cisto Dentígero	10	26,2	7,9
Ameloblastoma Unicístico	5	35,9	24,4
Ki 67	QO x CD (P = 0,048)	QO x AU (P = 0,015)	CD x AU (P =0,0222)
PCNA	QO x CD (P = 0,0061)	QO x AU (P = 0,136)	CD x AU (P =0,212)

Tabela 6- Média das percentagens da PCNA e Ki-67 na lâmina basal e suprabasal dos QOs.

Queratocisto	15 casos	PCNA	Ki-67
Lâmina Basal	15	34,3	8,4
Suprabasal	15	58,6	19,1
Total	15	46,4	13,7
Ki 67	P = 0,0001		
PCNA	P = 0,043		

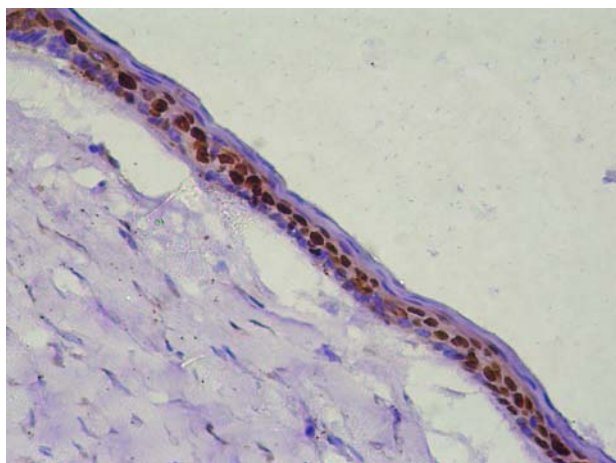


Figura 20 – (100x), Imunohistoquímica PCNA positivo, QO, com marcação predominante na camada suprabasal.

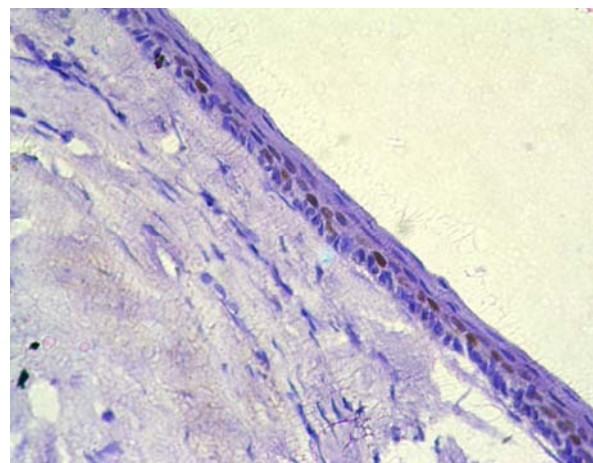


Figura 21 – (100x), Imunohistoquímica Ki-67 positivo, QO, com marcação predominante na camada suprabasal. Observar o menor número de células positivas em relação ao PCNA.

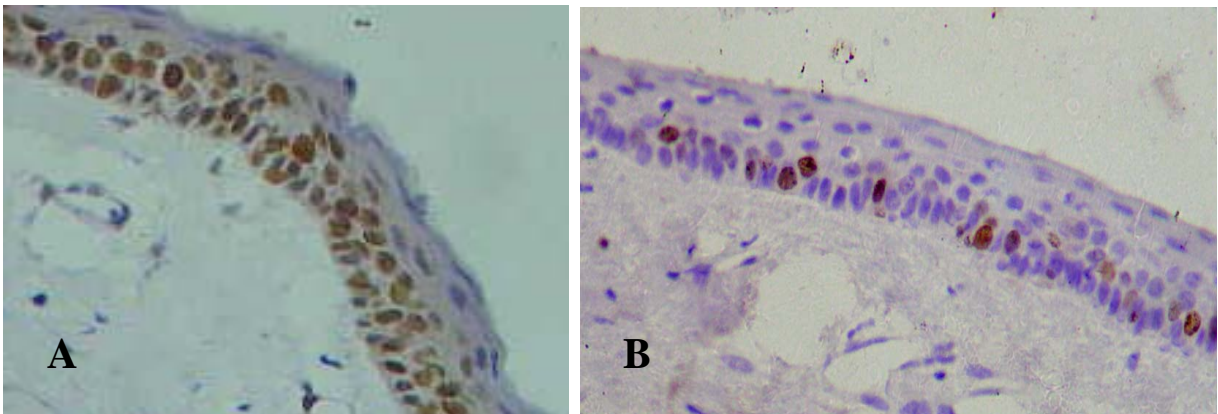


Figura 22 – (400x), Imunohistoquímica PCNA (A) e Ki-67 (B) positivo, QO, com marcação predominante na camada suprabasal. Ilustração representativa da maior média da percentagem de marcação da PCNA em relação à Ki-67.

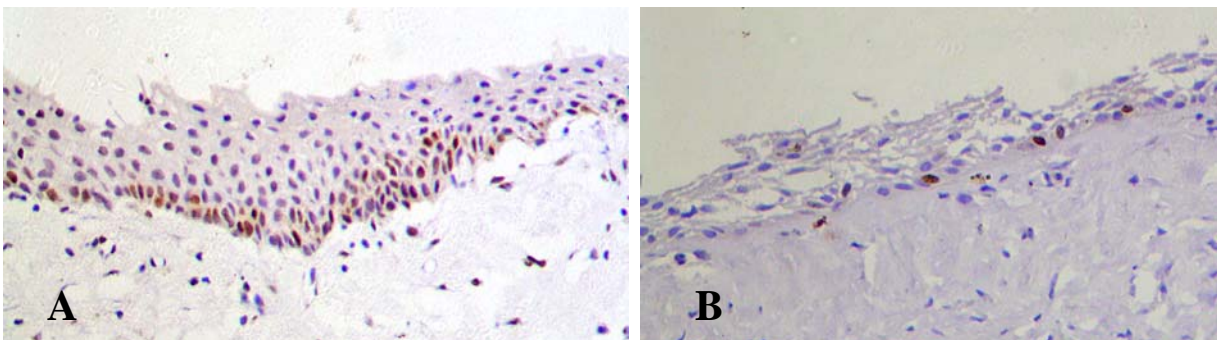


Figura 23 – (100x), Imunohistoquímica PCNA (A) e Ki-67 (B) positivo, CD, com marcação predominante na camada basal. Ilustração representativa da maior média da percentagem de marcação da PCNA em relação à Ki-67.

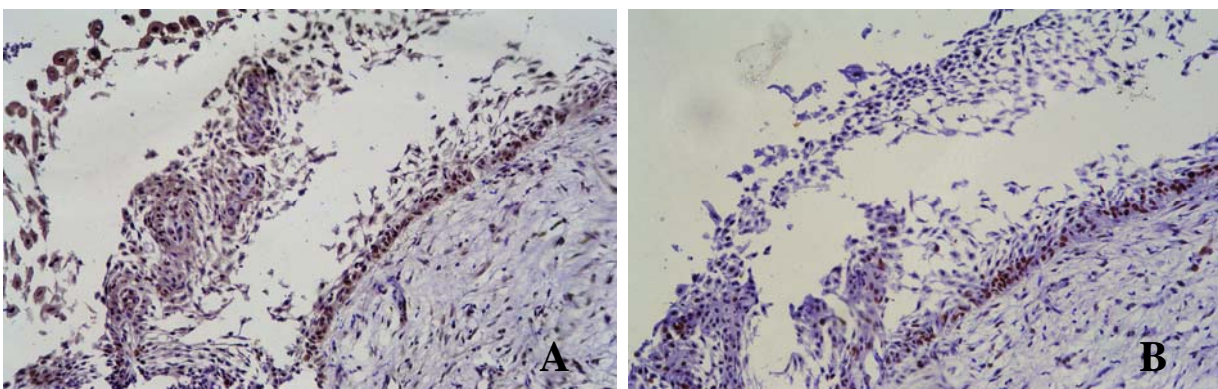


Figura 24 – (100x), Imunohistoquímica PCNA (A) e Ki-67 (B) positivo, AU. Ilustração representativa da maior média da percentagem de marcação da PCNA em relação à Ki 67. Observar o maior número de células marcadas pelo Ki 67 comparando com os QOs e CDs das figuras acima representadas.

Na amostra estudada, a média das percentagens da marcação para o PCNA nos QOs esporádicos (46,7%) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com os casos sindrômicos (46,0%) (P=0.08). Contrariamente, a marcação com o Ki-67 nas lesões esporádicas (17,4%) foi significativamente superior as sindrômicas (8,2%) (P<0.005) (Tabela 7).

Tabela 7- Média das percentagens da PCNA e Ki-67 nos QOs sindrômicos e esporádicos.

	Nº	PCNA	Ki-67
Queratocisto Esporádico	9	46,7	17,4
Queratocisto Sindrômico	6	46,0	8,2
Total	15	46,4	13,7
Ki 67	P = 0,0015		
PCNA	P = 0,465		

Dentre as lesões odontogênicas avaliadas em nossa pesquisa 33,3% (5/15) dos QOs apresentaram positividade para a p53, sendo que a marcação limitou-se às camadas basais e suprabasais. (figura 25) Foi documentada uma media de células positivas na camada suprabasal (17,15%) levemente superior à observada na camada basal (13,7%). Com relação aos CDs apenas um dos dez casos apresentou positividade para a p53. (figura 26) Não foi detectada positividade para a p53 em nenhum caso de Ameloblastoma Unicístico. (Tabela 8)

Tabela 8- expressão da p53 nos QOs, CDs e AUs.

	Nº	P53(positivo)	P53 (negativo)
Queratocisto	15	5	10
Cisto Dentígero	10	1	9
Ameloblastoma Unicístico	5	0	0

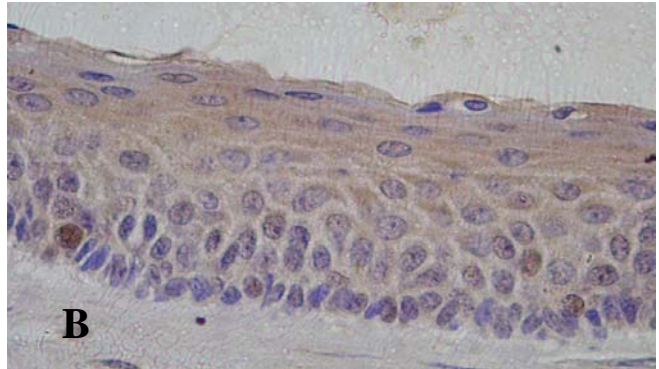
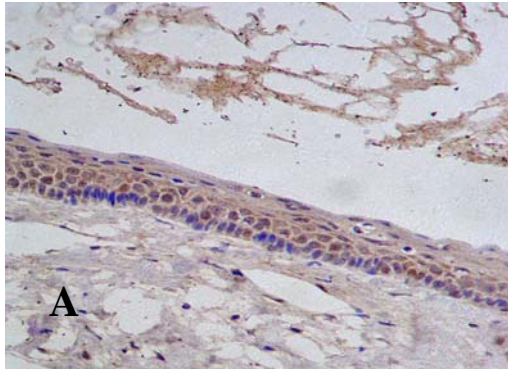


Figura 25 – A (100x) e B (1000x), Imunohistoquímica p53 positiva. QO apresentando marcação predominante na camada suprabasal, com células fracamente e fortemente coradas.

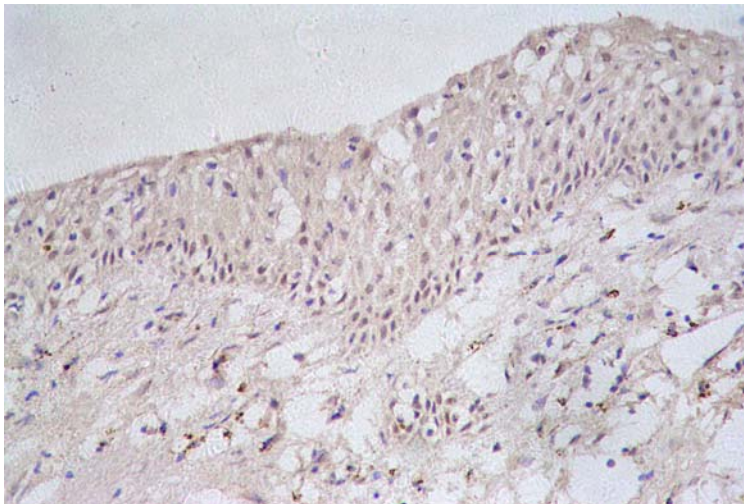


Figura 26 – (100x), Positividade Imunohistoquímica para p53 em um caso de CD.

DISCUSSÃO

6.1- Considerações Gerais:

Neste estudo a média de idade dos pacientes portadores de CDs foi de 26.5 anos, sendo que cinco dos oito casos foram diagnosticados nas três primeiras décadas de vida, corroborando com Bento *et al.* (1996). Foi documentada, também, uma preferência pelo sexo feminino (5/3) contrariando os dados de Bento *et al.* (1996), Neville *et al.* (1995) e Regezi & Siculba (1999), que documentaram uma leve predileção pelo sexo masculino.

Com relação aos QOs a média de idade foi de 42 anos, praticamente a mesma encontrada por Ahlfords *et al.* (1984) que, dentre os 255 pacientes de seu estudo, observou uma média de 41 anos. Nossa média também foi próxima da obtida por Barnnon & Colonel, (1976) que observou uma média de 39 anos e 9 meses nos 283 pacientes estudados. O sexo feminino foi o de maior prevalência dos QOs (5/3) discordando com os dados documentados em nossa revisão literária (Ahlfords *et al.*, 1984; Barnnon & Colonel, 1976; Neville *et al.*, 1995; Stoelinga *et al.*, 2001).

Os três casos de AU seguem os dados documentados na literatura com relação à idade, pois todos pertenciam à segunda década de vida com média de quinze anos (Roos *et al.*, 1994; Neville *et al.*, 1995; Reichart *et al.*, 1995; Sapp *et al.*, 1997). Segundo Philipsen & Reichart (1998), vinte anos separam as médias de idade dos AUs associados a um dente incluso dos que não apresentam elemento dental (16,5 versus 35,2 anos). Os autores documentaram, também, que a associação com um dente ocorre principalmente em pacientes do sexo feminino (1.5/1 casos) e nossos dados corroboram com esses achados, pois os três casos que apresentavam documentação eram do sexo feminino. Já Roos *et al.* (1994), documentaram uma discreta prevalência pelo sexo masculino nos trinta casos de AUs de seu estudo (16/14).

6.2- Marcadores de Proliferação Celular:

6.2.1- Cistos Odontogênicos:

A identificação da atividade proliferativa em cistos e tumores tem sido relatada na avaliação do comportamento biológico destas lesões. Dentre os cistos odontogênicos de desenvolvimento os QOs e os CDs são as lesões mais comuns e que despertam maior interesse dos pesquisadores, principalmente os QOs, pois estes são lesões mais agressivas e com maior potencial de recidiva, sendo considerada por alguns autores como uma lesão com comportamento neoplásico benigno (Ahlforde *et al.*, 1984; Zachariades *et al.*, 1985; Sapp *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Shear, 2001a).

Todos os 25 casos de cistos odontogênicos estudados apresentaram marcação positiva para o PCNA, o que retrata os dados documentados na literatura (Li *et al.*, 1994; El Murtadi *et al.*, 1996; Lo Muzio *et al.*, 1998; Piattelli *et al.*, 1998; Paula *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001). Contrariamente ao PCNA, nem todos os cistos odontogênicos foram marcados pelo Ki-67. A ausência de marcação foi observada em dois casos de CDs, sendo que a baixa média de células positivas para este marcador foi encontrada para todas as lesões, quando comparamos com a marcação com o PCNA. Piattelli *et al.* (2002), documentou uma média baixa (3,14%) de células positivas para o Ki-67 nos CDs. Todos os QOs foram positivos para o Ki-67 corroborando com os relatos literários (Li *et al.*, 1995; Paula *et al.*, 2000).

O percentual de células PCNA positivas, nos cistos odontogênicos, foi significativamente maior que a marcação pelo Ki-67, mas a distribuição da marcação frente aos estratos epiteliais teve comportamento semelhante. Estes dados são confirmados por estudo anterior que avalia o comportamento dos cistos odontogênicos (Li *et al.*, 1995). A diferença na percentagem de células marcadas pelo PCNA e Ki-67 também em pesquisas avaliando tumores odontogênicos (Sandra *et al.*, 2001b; Merr *et al.*, 2003), lesões de células gigantes (Souza *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000) e carcinomas da mucosa oral (Alisson *et al.*, 1998).

6.2.2- Queratocisto Odontogênico:

O forro epitelial dos QOs aparentemente expressa um potencial de crescimento intrínseco que não é observado em outros cistos odontogênicos. A presença de figuras mitóticas, similar ao ameloblastoma ou a lâmina dental, e a maior marcação pela H₃-Timidina, quando comparado a outros cistos odontogênicos, são dados importantes que refletem esta característica peculiar dos QOs (Shear, 2002a). O crescimento epitelial dos QOs não ocorre de forma homogênea e apresenta uma íntima relação com a cápsula cística. (Scharffetter *et al.*, 1989; Shear, 2002a)

Os dados referentes à média de marcação nos QOs com a PCNA (46,4%) foram menores que os observados por Oliveira *et al.* (2001) (74,9%) e maiores que os encontrados por Piattelli *et al.* (1998) (23,5%) e El Murtadi *et al.* (1996) (15,9%). Comparação similar foi impossível de ser realizada com o Ki-67, pois os trabalhos que utilizam este marcador realizaram a contagem de células por milímetro de membrana basal e não por percentagem (Li *et al.*, 1995; Paula *et al.*, 2000). Alguns fatores podem contribuir para a percentagem relativamente alta de células PCNA positivas documentada por Oliveira *et al.* (2001) como a metodologia, pois a recuperação antigênica empregada pode contribuir aumentando ou diminuindo a detecção desse marcador e a presença de inflamação nos espécimes estudados (discutida no item a seguir), pois segundo Paula *et al.* (2000), lesões inflamadas apresentam maior índice de marcação para PCNA.

Tomando por base nossos resultados referentes ao PCNA e o Ki-67, o forro epitelial dos QOs apresenta a característica incomum, de possuir maioria das células do estrato suprabasal marcadas (figura 27). A média de 57,1% de positividade da camada suprabasal, ao passo que a camada basal apresentou média de 36,3%, sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Estes dados corroboram com os resultados documentados por Li *et al.* (1994), Li *et al.* (1995), El Murtadi *et al.* (1996), Lo Muzio *et al.* (1999), Piattelli *et al.* (1998), Paula *et al.* (2000) e Oliveira *et al.* (2001), sendo que apenas o trabalho de Ogden *et al.* (1992) apresenta dados conflitantes.

A predominância de células em proliferação na camada suprabasal do QOs pode estar relacionada a maior expressão de receptores para o Fator de Crescimento Epidermóide (EGFr), nas células suprabasais, documentada por Li *et al.* (1993). É importante salientar que a ocorrência de divisão celular em estratos acima do basal é uma característica de lesões

altamente proliferantes como foi documentado por Oliver *et al.* (2000), que detectou 73% de células Ki-67 positivas nos estratos suprabasais de lesões displásicas do epitélio oral.

6.2.3- Inflamação:

A presença de infiltrado inflamatório na cápsula cística provoca alterações que podem influenciar no comportamento biológico da lesão (MARKER *et al.*, 1996) e modificar as características morfológicas do revestimento cístico como a ausência de queratinização do epitélio escamoso e outras alterações clássicas de cistos inflamatórios (EL-HAJJ *et al.*, 1996). Tem sido relatado que fatores de crescimento e citosinas, liberados durante os eventos inflamatórios, podem influenciar no crescimento dos QOs (MEGHJI *et al.*, 1996).

Um estudo recente (Paula *et al.*, 2000) sobre a influência da inflamação na expressão imunohistoquímica das proteínas PCNA e Ki-67 e a expressão histoquímica dos AgNORs. Avaliando dez QO inflamados e dez não inflamados foi documentado que o número total de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ significativamente maior em lesões inflamadas que nas não inflamadas (P=0.01), onde as médias dos números de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ foram significativamente maior no estrato suprabasal que no basal em ambos os cistos (P=0.01). Além disso, os QOs inflamados também mostraram maior percentagem de células PCNA⁺ e Ki-67⁺ na camada basal quando comparados com os não inflamados. A média do número de AgNORs por núcleo foi significativamente maior nos cistos inflamados que nos não inflamados. Slootweg, (1995) relatou que a inflamação alterou a marcação pelo Ki-67 nas amostras de CD e CR avaliadas em sua pesquisa.

Assim em vista da influencia exercida pela inflamação foram excluídos os casos de QOs esporádicos que apresentavam grande quantidade de inflamação na cápsula cística. Entretanto, em três dos seis casos de QOs associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular do nosso estudo havia inflamação. Esses casos, devido a sua raridade não foram excluídos, mas durante a contagem das células positivas para a PCNA e para a Ki-67 os observadores selecionaram áreas das lesões em que o forro epitelial mantinha as características histopatológicas originais dos QOs onde a cápsula estivesse relativamente livre de células inflamatórias. (figuras 28 e 29) Utilizando esse critério, não se observou nos QOs

variação relacionada ao componente inflamatório e as médias das células positivas para o PCNA e Ki-67 nos QOs inflamados ou não, foram bem próximas, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Vale salientar que, em áreas com considerável inflamação, observadas nos nossos casos, foi documentada uma maior proporção de células proliferantes na camada basal, para ambos os marcadores, quando comparadas com as regiões não inflamadas nas mesmas lesões o que corrobora com os dados descritos anteriormente indicando que a inflamação pode alterar as características biológicas dos QOs. (figura 30)

6.2.4- QOs associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular:

Os dados encontrados com relação à expressão dos marcadores de proliferação celular nos QOs associados à SCNB, quando comparados com os esporádicos, são conflitantes com os resultados relatados por vários autores, dentre eles: Li *et al.* (1995), El Murtadi *et al.* (1996) e Lo Muzio *et al.* (1999). Na amostra estudada, a média das percentagens da marcação para o PCNA nos QOs esporádicos (46,7%) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com os casos sindrômicos (46,0%) ($P < 0,05$). O oposto foi encontrado com relação ao Ki-67, onde as lesões esporádicas (17,4%) apresentavam marcação significativamente superior as sindrômicas (8,2%) ($P < 0,005$). Segundo os autores supracitados, as lesões sindrômicas apresentam maior número de células proliferantes, tanto na avaliação pelo PCNA quanto pelo Ki-67.

Apesar dos resultados conflitantes com os dados relatados na literatura, todos os casos de QOs avaliados em nosso trabalho apresentavam maior percentagem de células proliferantes na camada suprabasal tanto para o PCNA (SB-58,6%; LB-34,3%) quanto para o Ki-67 (SB-19,1%; LB-8,3%), sendo estas diferenças consideradas estatisticamente significativas ($P < 0,001$). Assim, nossos dados refletem as características proliferativas dos espécimes estudados, pois, como descrito anteriormente, o predomínio suprabasal de células proliferantes geralmente não ocorre em forros epiteliais normais (Oliver *et al.* 2000).

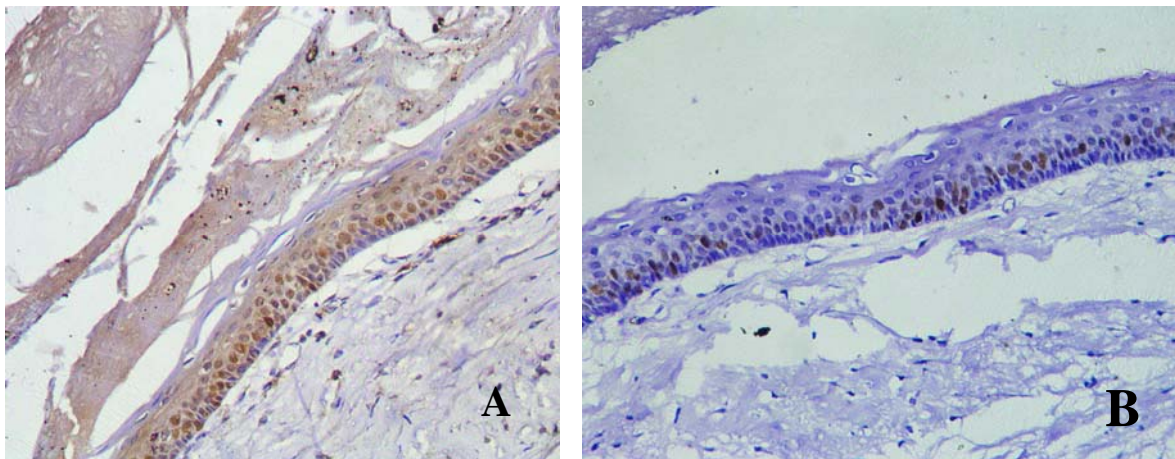


Figura 27 – (100x), Imunohistoquímica PCNA (A) e Ki 67 (B) positivo, QO, com marcação predominante na camada suprabasal. Ilustração representativa da maior média da percentagem de marcação da PCNA em relação à Ki-67.

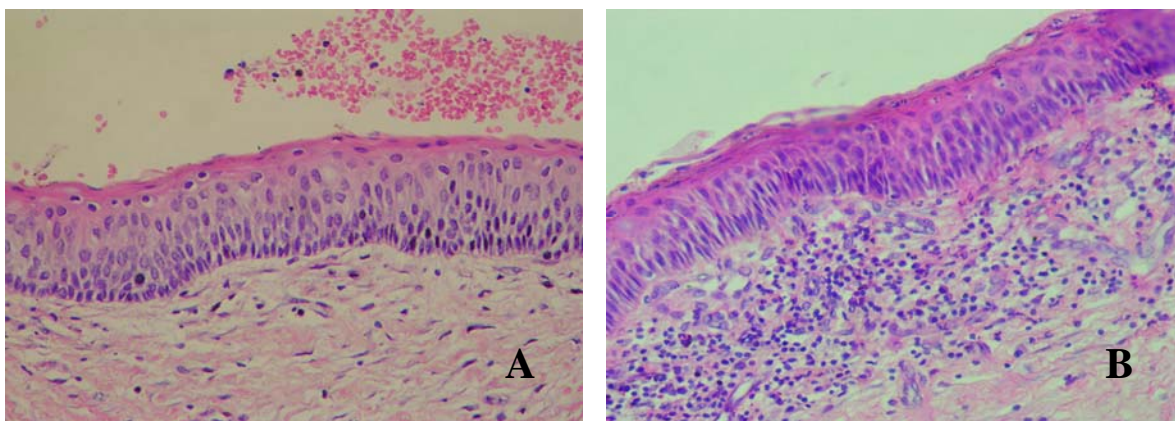


Figura 28 – HE (200x), Forro epitelial de um QO demonstrando uma area com infiltrado inflamatório (B) e outra região, do mesmo espécime, sem componente inflamatório (A).

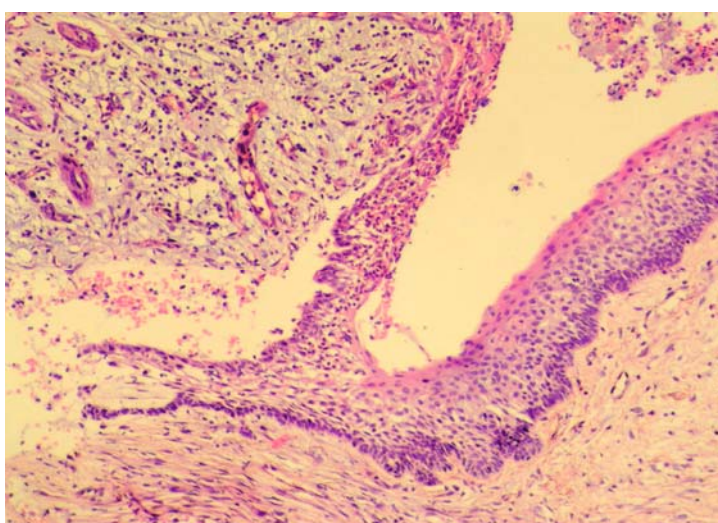


Figura 29 – HE (40x), Forro epitelial de um QO demonstrando as alterações que podem ser observadas em áreas com considerável componente inflamatório.

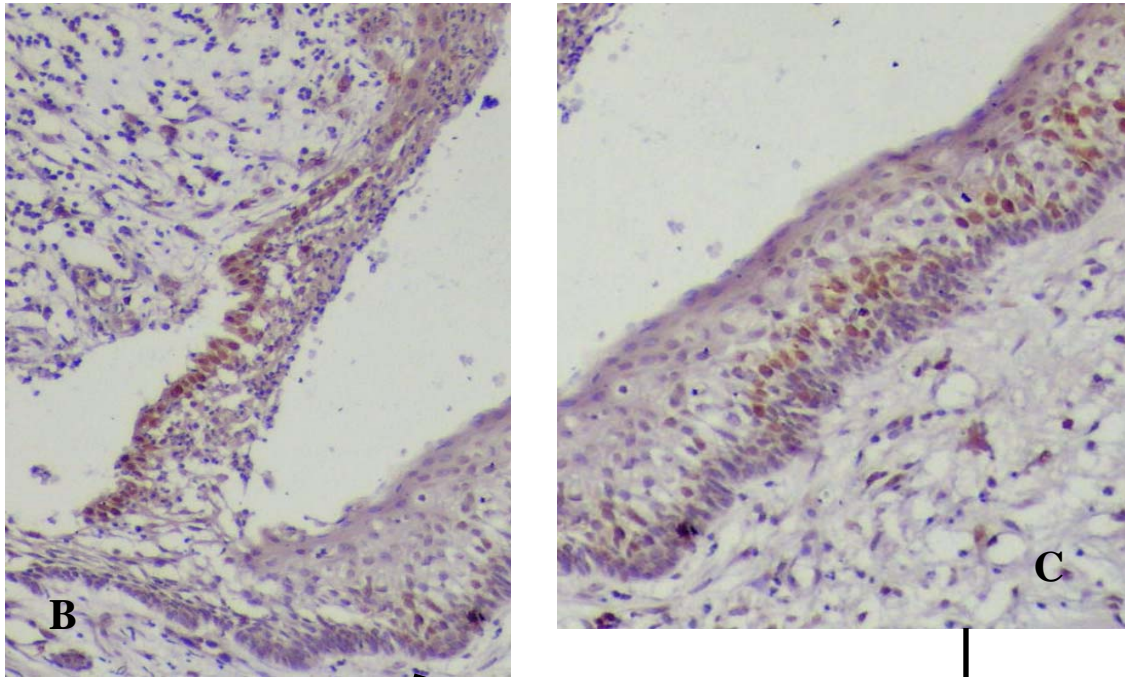


Figura 30 - (A) 40x, (B) e (C) 100x, Imunohistoquímica PCNA, demonstrando maior positividade do estrato basal em áreas inflamadas.

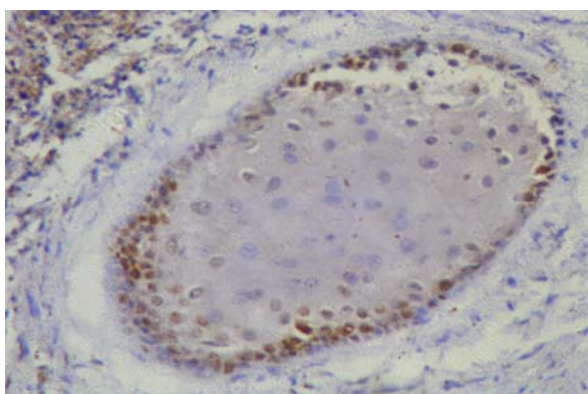
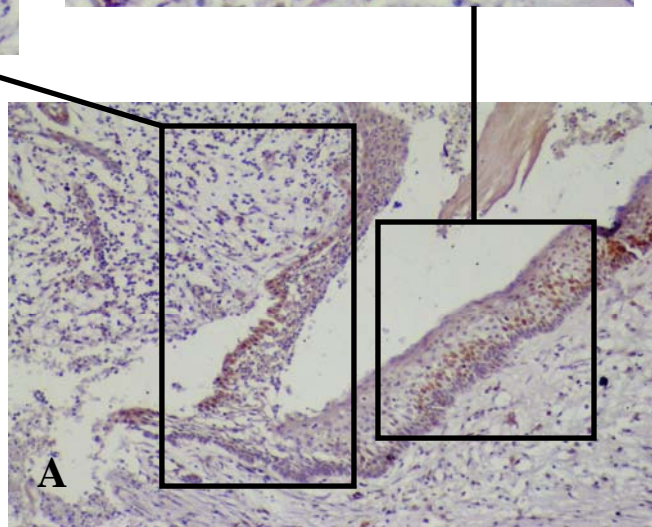


Figura 31 - (400x), Imunohistoquímica PCNA positivo, QO, revelando marcação em um cisto satélite.

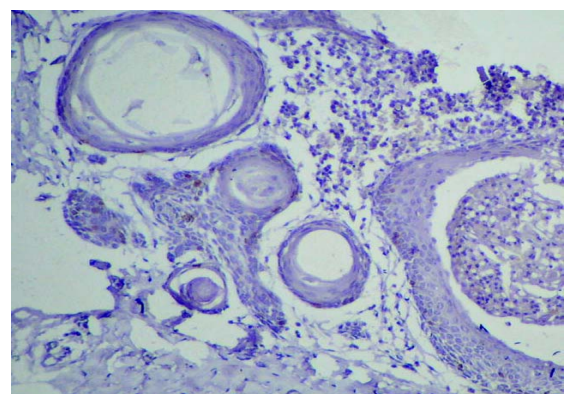


Figura 32 - (40x), Imunohistoquímica Ki-67 positivo, QO, revelando marcação em cistos satélites.

Foi documentado, em dois casos de QOs sindrômicos, a presença de cistos satélites, não sendo encontrado nenhum nos QOs esporádicos. Estes dados corroboram com os descritos na literatura (Neville *et al.*, 1995). (figuras 31 e 32)

6.2.5- Queratocisto Odontogênico x Cisto Dentífero:

Os CDs são considerados como lesões menos agressivas que os QOs. Os dados encontrados em nosso estudo comprovam que tanto pela marcação do PCNA (46.4%) quanto do Ki-67 (13,7%), os valores dos QOs são superiores aos dos CDs (PCNA = 26.2% e Ki-67 = 7.9%). Estes dados documentados em nossa pesquisa corroboram com os encontrados na literatura para ambos os marcadores (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Sloomweng, 1995; Piattelli *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

A média das células positivas dos CDs para o PCNA (26,2%) foi maior que a descrita por Piattelli *et al.* (1998) (9.8%), e a marcação da Ki-67 (7.9%) foi maior que a descrita pelo mesmo Piattelli *et al.* (2002) (3,1%).

Apesar de valores distintos com relação ao índice de marcação das proteínas relacionadas à proliferação celular, a literatura é unânime quando descreve que o comportamento biológico do CD é semelhante ao do cisto radicular e ambos são lesões menos agressivas que os QOs (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Piattelli *et al.*, 1998; Piattelli *et al.*, 2002).

6.2.6- Ameloblastoma Unicístico:

O ameloblastoma é considerado um dos mais comuns tumores odontogênicos, representando cerca de 30,7% destas lesões. Na ausência de características histopatológicas de malignidade, o ameloblastoma não apresenta diferenças no comportamento biológico entre suas variantes. Entretanto, acredita-se que o ameloblastoma unicístico (AU) tenha um comportamento menos agressivo que outras formas do neoplasma, especialmente quando está

associado a um molar impactado.(Barbachan *et al.*, 1985; Fonseca *et al.*, 1986; Reichart *et al.*, 1995; Sassi *et al.*, 2001).

A média do número de células PCNA positivas nos AUs, documentadas em nosso estudo (36,9%), foi maior que a documentada por Piattelli *et al.* (1998) (28,1%), Funaoka *et al.* (1996) (14,7%) e Sandra *et al.* (2001a) (12,0%), sendo similar ou superior à média das variantes sólidas, mais agressivas, descritas por estes autores. Com relação ao Ki-67, o valor documentado foi 24,4%, também maior que o documentado por Piattelli *et al.* (1998) (16,5%) e Sandra *et al.* (2001a) (2,8%).

Piattelli *et al.* (2002), relatou não haver diferença estatisticamente significativa, na marcação do Ki-67, entre o AU e o ameloblastoma associado a um CD. Segundo os autores, os dados imunohistoquímicos confirmaram a hipótese que o ameloblastoma associado a um CD tem comportamento biológico similar ao do AU e que deve ser considerado meramente uma variante histopatológica de um ameloblastoma. Li *et al.* (1995), avaliaram a expressão de PCNA no forro epitelial dos AUs e de cistos odontogênicos. Seus resultados mostraram que todas as áreas do limitante epitelial do AU apresentavam significativamente maior número de células PCNA⁺ que as do epitélio do CD, mesmo em áreas que a morfologia foi similar ao forro do CD. Estes achados foram interpretados pelo autor de modo favorável ao conceito de que o AU é originalmente um neoplasma cístico. Nossos dados, assim como dos dois autores supracitados, comprovaram que o AU apresenta uma maior capacidade proliferativa que o CD, tanto na avaliação pelo PCNA (AU = 35.9% e CD = 26.2%) quanto pelo Ki-67 (AU = 24.4% e CD = 7.9%).

Em um estudo comparando a capacidade proliferativa dentre as variantes do ameloblastoma Piattelli *et al.* (1998), documentaram que os ameloblastomas recorrentes apresentavam maior contagem de células PCNA positivas que as outras variantes do ameloblastoma, sendo que o tipo unicístico possuiu menor índice de marcação que os sólidos. Estes dados corroboram com os apresentados por Funaoka *et al.* (1996) e Sandra *et al.* (2001a), que mostraram também uma menor capacidade proliferativa na variante unicística, e segundo Sandra *et al.* (2001a), todas as variantes císticas do ameloblastoma, não apenas a unicística, mas também a multicística são menos proliferantes que os tipos sólidos. Ong'uti *et al.* (1997), documentaram que a marcação da Ki-67 é menor em cordões epiteliais e em áreas císticas do ameloblastoma que em regiões de aspecto folicular ou plexiforme. Li *et al.* (1995), estudou a expressão do Ki-67 e do PCNA em AU e Ameloblastoma Sólido ou Multicístico

(ASM). No AU, as ilhas celulares que invadem a cápsula cística exibiram maior número de células PCNA⁺ que as células das proliferações intraluminais. O limitante cístico do tumor tinha, relativamente, menos células PCNA⁺ que os nódulos intraluminais. Comparando com o ASM folicular, esta variante apresentou marcação positiva significativamente maior que todas as regiões do AU.

Em um estudo recente realizado por Merr *et al.* (2003), os valores dos marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67 foram conflitantes com os dados descritos anteriormente, apresentando média maior para os AUs (PCNA – 71,2% e Ki-67 – 8,8%) quando comparado com a variante sólida ou multicística (PCNA – 64,9% e Ki-67 – 2,8%). Segundo os autores, a razão para os resultados inconsistentes pode estar relacionada às diferenças no índice de marcação utilizado nestas lesões, pois são utilizadas metodologias distintas, especialmente relacionadas ao protocolo de contagem. Outra possível razão, citada pelo autor, está relacionada à morfologia dos tumores, pois enquanto as lesões sólidas possuem grandes folículos ou áreas plexiformes a serem avaliadas, nos AUs, há somente um forro epitelial. Isto pode resultar na inclusão de grande número de células basais e parabasais no grupo unicístico, colaborando para uma maior média de células marcadas nestas lesões.

6.2.7- Queratocisto Odontogênico x Ameloblastoma Unicístico:

Estudos imunohistoquímicos comparando a capacidade proliferativa dos QOs com a dos AUs apresentam resultados conflitantes, pois segundo Piattelli *et al.* (1998), todas as variantes dos ameloblastomas, inclusive as unicísticas, apresentam maior capacidade proliferativa que os QOs, tomando por base a marcação para a PCNA. Já Takaheshi *et al.* (1998), documentou uma maior média de células PCNA positivas nos QOs que nos ameloblastomas.

Em nosso trabalho, assim como no descrito por Takaheshi *et al.* (1998), os QOs (46,4%) apresentaram média de células PCNA positivas maior que a dos AUs (35,9%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0.136$), sugerindo que as lesões apresentam capacidade proliferativa semelhante.

Apesar dos dados obtidos com o PCNA revelarem um equilíbrio entre a capacidade proliferativa das lesões, a marcação pela Ki-67 demonstrou que os AUs (24,4%)

apresentavam maior índice de marcação que os QOs (13,7%) ($P < 0.05$). Estes dados são de fundamental importância para a compreensão do comportamento biológico destas lesões, pois não encontramos, em nossa revisão literária, nenhum trabalho que compare a capacidade proliferativa dos AUs com a dos QOs pela marcação da Ki-67.

6.3- p53:

A proteína p53 atua como fator de transição de genes envolvidos no controle da proliferação celular (Carson & Lois, 1995; Darntn, 1998; Cotran *et al.*, 1999). A imunomarcação da p53 tem sido usada na marcação de neoplasias e malignidades, pois detecção imunohistoquímica da proteína p53 é baseada no fato desta, quando está mutada, possui a meia vida aumentada (Darntn, 1998; Nogueira *et al.*, 1998).

Dentre os cistos odontogênicos avaliados nesta pesquisa, 33,3% (5/15) dos QOs apresentaram positividade para a p53. A marcação limitou-se às camadas basais e suprabasais com média de células positivas na camada suprabasal (17,15%) levemente superior à observada na camada basal (13,7%). Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Ogden *et al.* (1992) e Lombardi *et al.* (1995) que documentaram positividade para o p53 em 41% (5/12) e 50% (15/30) de seus QO, respectivamente. Segundo estes autores as células marcadas localizavam-se nas camadas basais e suprabasais. Um maior percentual de células p53 positivas foi documentado por Sloopweg (1995), que documentou em seu trabalho 84,6% (11/13) de positividade para a proteína p53 e, segundo o autor, foi observado uma concordância significativa entre a intensidade de marcação da p53 e o número de células Ki-67 positivas, relacionando a hiperexpressão da proteína p53 com a capacidade proliferativa dos QOs.

Dentre os QOs estudados cinco casos foram positivos, dois eram de pacientes síndrômicos e três de pacientes esporádicos, não sendo documentado diferença significativa entre estas variantes e a marcação com a proteína p53. Nossos resultados confirmam os dados de Lombardi *et al.* (1995), que relataram uma não associação da positividade para a p53 e com a Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular. Segundo os autores, não foi documentada, também, relação com a inflamação, recorrência, ou com características

histopatológicas como proliferações epiteliais, cistos satélites ou epitélio odontogênico na cápsula cística. Já segundo Lo Muzio *et al.* (1999), dos 32 casos de QOs avaliados em sua pesquisa quinze foram positivos para o p53, sendo todas lesões sindrômicas, e nenhum caso esporádico apresentou marcação.

Com relação aos CDs apenas um dos dez casos apresentou marcação positiva. Segundo Ogden *et al.* (1992) e Li *et al.* (1996), os CDs não apresentam positividade para a p53, salvo a marcação pelo clone BP53-12 descrita por Li *et al.* (1996) relatada posteriormente.

Apesar da alta capacidade proliferativa documentada em nossa pesquisa, a perda do controle da proliferação celular dos AUs não esteve relacionada com a mutação do p53, pois nenhum dos casos de AUs apresentou positividade para a p53. Usando marcadores de proliferação celular, PCNA e Ki 67, Sandra *et al.* (2001a), reportaram que cada tipo de Ameloblastoma tinha diferente atividade proliferativa. Em outro estudo, os mesmos autores encontraram relação significativa com a positividade da MDM2, detectada na região periférica, similar a encontrada pela PCNA, Ki-67 e proteínas anti-apoptóticas. Não foi documentada diferença significativa na marcação da p53 em cada tipo de ameloblastoma (Sandra *et al.*, 2001b; Sandra *et al.*, 2002).

A detecção da p53, nas lesões benignas, poderia ser considerada um importante marcador prognóstico para a evolução destas a malignidade como afirmam Saito *et al.* (1999) e Lo Muzio *et al.* (1999). No entanto, Tsuji *et al.* (1995) e Nogueira *et al.* (1998), chamam a atenção a respeito da cautela que se deve ter, quanto à detecção imunohistoquímica da p53 em relação ao prognóstico destas. Os autores afirmam que a positividade da p53 em tecido normal e lesões benignas, coradas fracamente e coradas na camada basal ou suprabasal, não deve ser considerada como uma mutação do p53 e sim como a atividade normal da p53 na camada germinativa do epitélio.

Outro relato importante, que concorda com a opinião desses dois autores, foi descrito por Li *et al.* (1996), os quais, por imunohistoquímica encontraram positividade para a p53, variando de 38 a 71%, e todas localizadas na camada basal e suprabasal, mas por sequenciamento direto ou por polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), não encontraram mutação em nenhum gene da amostra dos cistos. Assim Li *et al.* (1996), reforçam os argumentos dos autores citados acima, que sugerem ser essa uma atividade normal da p53 na camada germinativa do epitélio.

É importante salientar que a marcação da p53 pode sofrer influência de alguns fatores como o anticorpo utilizado e o aumento da sensibilidade da reação de imunomarcação com a utilização de métodos de recuperação antigênica mais eficazes. Um exemplo de variação quanto ao uso de anticorpos distintos foi documentado no trabalho realizado por Li *et al.* (1996) que avaliou 22 QOs, cinco CDs e cinco Cistos Radiculares utilizando três tipos de anticorpos para a p53 (clone BP53-12, clone 1801 e o policlonal CM1). Com o clone BP53-12, as células positivas foram detectadas em todos os espécimes de cistos odontogênicos, mas com o clone 1801 e com o policlonal CM1 a marcação ocorreu somente em 3/8 (38%) e 5/7 (71%) dos QOs, respectivamente, e não foi documentada positividade nos CDs e nos CRs. O anticorpo para a proteína p53 utilizado neste trabalho foi o clone DO-7, o mais utilizado nas pesquisas referendadas em nossa revisão literária (Loiola *et al.* 1995; Alisson *et al.* 1998; Jin *et al.* 1998; Saito *et al.* 1999; Souza *et al.* 1999; Souza *et al.* 2000), sendo considerado um anticorpo de boa sensibilidade para a detecção da proteína p53.

Assim, consideramos que a detecção da proteína p53, principalmente nos casos de QOs, foi expressiva, e apesar de ser um forte indicativo de mutação, as características clínicas demonstram um comportamento benigno dessas lesões abrindo a possibilidade da detecção ser causada por uma maior estabilidade desta, exercendo sua função na parada do ciclo celular e reparo frente ao DNA lesado. Entretanto esta hipótese só pode ser confirmada através de métodos moleculares.

Conclusão

1. A detecção do PCNA foi observada em todos os cistos odontogênicos, contrastando com a detecção do Ki-67 que não foi observada em dois casos de CD;
2. As médias das percentagens do Ki-67 foram menores que as do PCNA em todos os cistos odontogênicos;
3. Nos QOs a camada mais proliferante é a suprabasal para os dois marcadores estudados;
4. Nos QO, a detecção do PCNA apresentou média semelhante para os casos associados ou não a Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular, mas com relação ao Ki-67, os casos esporádicos apresentaram maior média de marcação que os sindrômicos;
5. Os AUs apresentaram maior média, para ambos os marcadores, que os CDs;
6. Os AUs apresentaram média de marcação para o PCNA semelhante a observada nos QOs, mas, com relação ao Ki-67, os AUs tiveram maior índice de marcação;
7. Apesar da detecção da proteína p53 por imunohistoquímicas ser considerada a variante mutada, o caráter clínico benigno destas lesões sugere uma maior estabilidade desta proteína na sua função de reparo.
8. Não foi documentada relação entre a detecção da p53 e a capacidade proliferativa das lesões estudadas.

Assim parece ser o PCNA, um melhor marcador de proliferação celular nos CDs e QOs, pois como marca maior número de células, lesões pouco proliferativas não são dadas como falso negativo. O que parece ocorrer com o Ki-67.

Com relação ao maior índice proliferativo dos AUs em relação aos QOs, detectada somente pelo Ki-67, não se pode garantir, por este trabalho, que essa diferença seja própria da lesão ou seja devido a um menor índice proliferativo observado com esse marcador nos QOs. Estes dados retratam a elevada capacidade proliferativa dos QOs, sendo similar a de um neoplasma benigno.

Referências Bibliográficas

1. AHLFORDS, E.; LARSSON, A.; SJOGREN, S., The Odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor? **J Oral Maxillofac. Surg**, v. 42, n. 1, p. 10-9, 1984.
2. ALGUST, M.; FAQUIN, W. C.; TROULIS, M. J.; KABAN, L. B., Differentiation of odontogenic keratocyst epithelium after cystic decompression. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 6, p. 678-83, 2003.
3. ALI, M.; BAUGHMAN, R. A., Maxillary Odontogenic keratocyst: a common and serious clinical misdiagnosis, **J Am Dent Assoc**, v. 134, n. 7, p. 877-83, 2003.
4. ALISSON, R. T.; BEST, T., p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry. **J. Oral Pathol Med**, v. 27, p. 434-40, 1998.
5. AL-KHATEEB, T.; ABABNEB, K. T., Ameloblastoma in Young Jordains: A Review of the Clinicopathologic Features and treatment of 10 Cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, p. 13-8, 2003.
6. ALTINI, M.; COLEMAN, H.; DOGLIONI, C.; FAVIA, G.; MAIORANO, E., Calretinin expression in ameloblastomas, **Histopathology**, v. 37, n. 1, p. 27-32, 2000.
7. ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO, V. C., **Patologia Bucal**. Artes Médicas – São Paulo, 1984.
8. AZOUBEL, E.; SOUZA, P. H. C.; STÊVÃO, E. L. L.; JAEGER, E., Ameloblastoma unicístico em mandíbula – Relato de um caso. **Revista Odonto Ciência**, n. 24, p. 215-20, 1997.

9. BÁLINT, É.; VOUSDEN, K. H., Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. **Br. J. Cancer**, v. 82, n.12, p. 1813-23, 2001.
10. BARBACHAN, J. J. D. *et al.* Considerações sobre o estudo dos ameloblastomas. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 27, p. 13-25, 1985.
11. BARNNON, R. B.; COLONEL, L. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part I. Clinical features. **Oral Surg**, v. 42, n. 1, p. 54-72, 1976.
12. BATASAKIS, G. J.; EL-NAGGAR, A. K., p53: Fifteen Years After Discovery. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 2, n. 2, p. 71-88, 1995.
13. BENN, A.; ALTINI, M., Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 81, n. 2, p. 203-9, 1996.
14. BENTO, P. M.; SOUZA, L. B.; PINTO, L. P., Estudo epidemiológico dos cistos odontogênicos – Análise de 446 casos. **Ver. Odonto Ciênc.**, n. 22, p. 125-42, 1996.
15. BERRONE, S.; GALLESIO, C; TARELLO, F.; FAVRO, E., Le cheratocisti odontogene – Presentazione di una casistica con revisione histológica e controllo clinico a distanza, **Minerva stomatol.**, v. 43, n. 3, p. 115-26, 1994.
16. BITAR, G. J; HERMAN, C. K.; DAHMAN, M. I.; HOARD, M. A., Basal cell nevus syndrome: Guidelines for early detection. **Am. Fam. Physician**, v. 65, n. 12, p. 2501-4, 2002.
17. BLANAS, N.; FREUND, B.; SCHWARTZ, M.; FURST, I. M., Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 90, n. 5, p. 553-8, 2000.

18. BODNER, L., Cystic lesions of the jaws in children. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngology**, v. 62, p. 25-9, 2002.
19. BOSENSTEIN, T.; POGREL, M. A.; SMITH, R. A.; REGEZI, J. A., Cystic Ameloblastoma – Behavior and treatment of 21 cases. **J. Oral Maxillofac Surg**, v. 59, p. 1311-16, 2001.
20. BROW, D.C.; GATTER, K. C., Ki-67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, p.2-11, 2002.
21. BRUNO, S.; CRISSMAN, H. A.; BAUER, K. D.; DARZYNKIEWICZ, Z., Changes in cell nuclei during S phase: Progressive chromatin condensation and altered expression of the proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, cyclin (PCNA), p105 and p34. **Exp. Cell Res.**, v. 169, p. 99-106, 1991.
22. CARSON, D. A.; LOIS, A., Cancer progression and p53. **The Lancet**, v. 356, p. 1009-11, 1995.
23. CARVALHAIS, J. N.; AGUIAR, M. C. F., Estudo das AgNORS em ceratocistos odontogênicos associados e não associados à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide. **Arq. Odontol.**, v. 34, n. 1, p. 11-7, 1998.
24. CAWSON, A. R.; BINNIE, W.H.; EVERSON, W.J., **Atlas Colorido de Enfermidades da Boca**. Artes Médicas – São Paulo. 1997.
25. COLEMAN, H.; ALTINI, M.; ALI, H.; DOGLIONI, C.; FAVIA, G.; MAIORANO, E., Use of calretinin in the differential diagnosis of unicystic ameloblastomas. **Histopathology**, v. 38, p. 312-17, 2001.
26. CORDON-CARDO, C., Mutation of Cell Cycle Regulators – Biological and Clinical Implications for Human Neoplasia. **Am. J. Pathol.**, v. 147, n. 3, p. 545-60, 1995.

27. COTRAN, R.S.; KUMAR, M.D.V.; COLLINS, M.D.T., **Robbins Pathologic Basis of Disease**, W.B. Saunders Company - Philadelphia. Sexta edição. 1999.
28. DARNTN, S.J., p53 Desmystified. **Mol. Pathol**, v. 51, f. 5, p.248-53, Oct 1998.
29. DE ROBERTIS, E.D.P.; DE ROBERTIS JR, E.M.F., **Bases da Biologia Celular e Molecular**, Guanabara Koogan - -Rio de Janeiro, v. 2, 1993.
30. DELFINO, A. B. M.; BARRETO, E. C.; DA SILVA JR, E. T.; DE MENDONÇA, R. G.; ORNELLAS, M. H., O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose – Carcinogênese. **Ver. Brás. Cancerol**, v. 43, n. 3, p. 173-86, 1997.
31. DONATO, A. C.; MILNER, E.; MISTRO, F. Z.; MOREIRA, C. A.; KIGNEL, S., Ameloblastoma originário de cisto dentífero – Relato de um caso. **Ver. Paul. Odontol.**, n. 5, p. 36-42, 1996.
32. DOWNEY, K. M.; TAN, C.; SO, A. G., DNA polymerase delta: a second eukaryotic DNA replicase. **BioEssays**, v. 12, n. 5, p. 231-5, 1990.
33. EL-HAJJ, G.; ANNEROTH, G., Odontogenic keratocysts – a retrospective clinical and histologic study, **Oral Maxillofac. Surg**, v. 25, n. 2, p. 125-44, 1996.
34. ELIAS, R.; SANTOS, R. B.; CORRÊA, M., Ameloblastoma unicístico: Lesões relacionadas. **Ver. Brás. Cir. Implant.**, v. 8, n. 31, p. 198-201, 2001.
35. EL MURTADI, A.; GREÑA, D.; TONER, M.; MACARTEN, B. E., Prolifering cell nuclear antigen staining in síndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 81, n. 2, p. 217-20, 1996.
36. EVERSON, J.W.; SCULLY, C.; **Atlas Colorido de Patologia Bucal**, Artes Médicas – São Paulo. 1995.

37. ÉZSIAS, A., Longitudinal *in vivo* observations on odontogenic keratocyst over a period of 4 years, **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 30, p. 80-2, 2001.
38. FONSECA, E. C.; PINTO, D. S.; CASTRO, A. L.; SABA, L. M. B.; SANVITTO, L. C., Ameloblastoma. Apresentação de 56 casos. **Ver. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 40, n. 2, p. 186-96, 1986.
39. FORNATORA, M. L.; REICH, R. F.; CHOTKOWSKI, G.; FREEDMAN, P. D., Odontogenic keratocyst with mural cartilaginous metaplasia: A case report and review of the literature. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 92, n. 4, p. 430-4, 2001.
40. FORTIN, T.; COUDERT, J. L.; FRANCOIS, B.; HUET, A.; NIOGRET, F.; JOURLIN, M.; GREMILLET, P., Marsupialization of dentigerous cyst associated with foreign body using 3D CT images: a case report. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 22, n. 1, p. 29-33, 1997.
41. FUNAOKA, K.; ARISUE, M.; KOBAYASHI, I.; LIZUKA, T.; KOHGO, T.; AMEMIYA, A.; TOTSUKA, Y., Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), in 23 cases of ameloblastoma. **Oral Oncol.**, v. 32b, n.5, p. 328-32, 1996.
42. GALVÃO, H. C.; SOUZA, L. B., Cisto dentífero: O possível significado histológico de células P.A.S. positivas. **Rev. ABO Nacional**, v. 7, n. 6, p. 351-5, 1999/ 2000.
43. GARDNER, D. G.; CORIO, R. L., Plexiform unicystic ameloblastoma – a variant of ameloblastoma with a low-recurrence rate after enucleation. **Cancer**, v. 53, p. 1730-35, 1984.
44. GIL, J. N.; RAU, L. H.; MANFRO, R., Ceratocisto Odontogênico – contribuição para o diagnóstico e tratamento. **Ver. Brás. Cir. Implant.**, v. 7, n. 26, p. 28-32, 2000.

45. HALL, P. A.; LEVINSON, D. A. Review: assesment of cell proliferation in histological material. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, n. 2, p. 184-192, 1990.
46. HALL, P. A.; WOODS, A. L., Imunohistocheamical markers of cellular proliferations: achievements, problems and prospects. **Cell Tissue Kinel**, v. 23, p. 505-22, 1990.
47. HOLMLUND, A.; ANNEROTH, G.; LUNDQUIST, G.; NORDENRAM, A., Ameloblastomas originating from odontogênic cyst. **J. Oral Pathol. Med.** v 20, p 318-21, 1991.
48. HONAVAR, S. G.; SHIELDS, J. A.; SHIELDS, C. L.; EAGLE JR, R. C.; DEMIRCI, H.; MAHMOOD, E. Z., Basal cell carcinoma of the eyelid associated whit Gorlin-Goltz syndrome. **Ophthalmology**, v. 108, n. 6, p.1115-23, 2001.
49. HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in imunoperoxidase tehnicques: A comparison between ABC end unlabeled (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.** v. 29; p. 577-80, 1981.
50. HSUN-TAU, C., Odontogenic keratocyst: a clinical experience em Singapore. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 86, p. 573-7, 1998.
51. IBRAHIM, S. O.; LILLEHAUG, J. R.; JOHANNESSEN, A.C.; LIAVAAG, P. G.; NILSEN, R.; VASSTRAND, E. N., Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erB-2/neu and proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 302-13, 1999.
52. JIN, T. Y.; KAYSER, S.; KEMP, B. L.; ORDENEZ, N. G.; TUCKER, S. L.; CLAYMAN, G. L.; GOEPFERT, H.; LUNA, M. A.; BATSAKIS, J. G.; EL-NAGGAR, A. K., The prognostic significance of the biomarkers p21^{waf1/cip1}, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 82, n. 11, p. 2159-65, 1998.

53. KONDELL, P.A.; WINBERG, J., Odontogenic keratocysts a follow-up study of 29 cases. **Swend. Dent. J.**, v. 12, n. 1-2, p. 52-62, 1998.
54. KUBBUTAT, M. H. G.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; FLAD, H. D.; GERDES, J., Epitope analysis of antibodies recognizing the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, n. 6, p. 524-8, 1994.
55. LEDESMA-MONTES, C.; HERNÁNDEZ-GUERRERO, J. C.; GARCÉS-ORTÍZ, M., Clinico-pathologic study of odontogenic cysts in a Mexican sample population, **Arch. Med. Res.**, v. 30, p. 373-6, 2000.
56. LEE, F. M. S. Ameloblastoma of the maxila with probable origem in residual cyst. **Oral Surg.**, v. 29, n. 6, p.799-805, 1970.
57. LENCH, N. J.; HIGH, A. S.; MARKAHAM, A. F.; HUME, W. J.; ROBINSON, P. A., Investigation of Chromosome 9q22.3-q31 DNA Marker Loss in Odontognic Keratocysts. **Oral Oncol.**, v. 32B, n. 3, p. 202-6, 1996.
58. LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B., Expression of epidermal growth factor receptors by odontogênic jaw cysts. **Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 432, p. 137-44, 1993.
59. LI, T. J.; BROWNE, R. M.; PRIME, S. S.; PATERSON, I. C.; MATTHEWS, J. B., Qualification of PCNA⁺ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 23, n. 4, p. 184-9, apr 1994.
60. _____. Epitelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki-67 in simple, recurrent and basal cell neavus syndrome (BCNS)- associated lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 221-226, 1995a.

61. _____. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in unicystic ameloblastoma. **Histopathology**, v. 26, n. 3, p. 219-228, 1995b.
62. _____. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 25, n. 5, p. 249-255, 1996.
63. LI, T. J.; LUO, H. Y.; YU, S. F., Ortokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathological and immunocytochemical study. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 38, n. 1, p. 49-51, 2003.
64. LI, T.; WU, Y.; YU, S.; YU, G., Unicystic Ameloblastoma – A Clinicopathologic Study of 33 Chinese Patients. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 24, n. 10, p. 1385-92, 2000.
65. LOBARDI, T.; ODELL, E. W.; MORGAN, P. R., p53 immunohistochemistry of odontogenic keratocysts in relation to recurrence, basal-cell budding and basal-cell nevus syndrome. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, n. 12, p. 0181-4, 1995.
66. LO MUZIO, L; SATAIBANO, S; PANNOME, G; BUCCI, P.; NOCINI, P. F.; BUCCI, E; DE ROSA, G., Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic Keratocysts and odontogenic Keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **J. Dent. Rest.**, v. 78, n. 7, p. 1345-53, 1999.
67. LOYOLA, A. M.; BORRA, R. C.; ARAUJO, V. C., Expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides da mucosa bucal. **RPG rev. pos-grad.**, v. 2, n. 2, 1995.
68. MAKAMURA, N.; HIGUCHI, Y.; MITSUYASU, T.; SANDRA, F.; OHISHI, M., Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, p. 13-20, 2002.

69. MAKOWSKI, G. J.; MCGUFF, S.; VAN SICKELS, J. E., Squamous cell carcinoma in a Maxillary odontogenic keratocyst. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 59, p. 76-80, 2001.
70. MANGANARO, A. M.; CROSS, S. E.; STARTZELL, J. M., Carcinoma arising in a dentigerous cyst with neck metastasis. **Head e Neck**, v. 19, p. 436-9, 1997.
71. MARKER, P.; BROUNDUM, N.; CLAUSEN, P. P.; BASTIAN, H. L., Tratament of large odontogenic keratocysts by descompression and later cistectomy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 82, p. 122-31, 1996.
72. MARTINS, R. H.; ANDERADE, J.; RAPOPORT, A.; ROSA, M. P., Histopathologic features and managment of ameloblastomas: study of 20 cases. **Rev. Paul. Med.**, v. 117, n. 4, p. 171-4, 1999.
73. MARTÍNEZ-PÉREZ, D.; VARELA-MORALES, M., Conservative tratament of dentigerous cysts in children: A report of 4 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 59, n. 3, p. 331-3, 2001.
74. McCORMICK, D.; YU, C.; HOBBS, C.; HALL, P. A. The relevance of antibody concentration to the immunological quantification the cell proliferation-associated antigens. **Histopatology**, v. 22, n. 6, p. 543-547, june 1993.
75. MEER, S.; GALPIN, S. J.; ALTINI, M.; COLEMAN, H.; ALI, H., Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunoreactivity in ameloblastomas, **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 95, p. 213-21, 2003.
76. MEGHJI, S.; QURESHI, W. HENDERSON, B.; HARRIS, M., The role of endotoxin and cytokines in the patogenesis of odontogenic cysts. **Archs. Oral Biol.**, v. 41, n.6, p. 523-31, 1996.

77. MYOUNG, H.; HONG, S. P.; HONG, S. D.; LEE, C. Y.; CHOI, J. Y.; SEO, B. M.; KIM, M. J., Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 91, n. 3, p. 328-33, 2001.
78. MURAKAMI, A.; KAWABATA, K.; SUZUKI, A.; MURAKAMI, S.; OOSHIMA, T., Eruption of impacted second premolar after marsupialization of a large dentigerous cyst: case report. **Pediatr. Dent.**, v. 17, n. 5, p. 327-4, 1995.
79. NEVILLE, B. W.; DAMN, D. D.; ALEN, C. M. & BOUQUOT, J. E., **Patology**, W.B. Saunders Company, p. 711, 1995.
80. NOGUEIRA, R. L. M.; RABENHIOST, S. H. B; FERREIRA, F. V. A., **Estudo imunohistoquímico da expressão da proteína p53 e sua correlação com lesões benignas e carcinomas da mucosa bucal**, Fortaleza 1998. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.
81. OGDEN, G. R.; CHISHOLM, D. M.; KIDDIE, R.A.; LANE, D. P., p53 protein in odontogenic cysts: increased expression in some odontogenic keratocysts. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 11, p. 1007-10, 1992.
82. OLIVER, K. U.; MAC DONALD, D. G.; FELIX, D. H., Aspects of cell proliferation in oral epithelial displastic lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v.29; p.49-55, 2000.
83. OLIVEIRA, G. O.; SANT’ANA FILHO, M.; RADOS, P. V.; LAUXEN, I. S., Qualificação de AgNORs e expressão do PCNA em ceratocisto odontogênico. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 43, n. 2, p. 51-6, 2001.
84. OLSON, J. W.; MILLER, R. L.; KUSHNER, G. M.; VEST, T. M., Odontogenic carcinoma occurring in dentigerous cyst: case report and clinical management. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1365-70, 2000.

85. ONG'UTI, M. N.; CRUCHLEY, A. T.; HOWELLS, G. L.; WILLIAMS, D. M., Ki-67 antigen in ameloblastomas: correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. **Oral Maxillofac. Surg.**, v. 26, n. 5, p. 376-79, 1997.
86. PARIZOTTO, V. A.; PARIZOTTO, S. P. C. O. L.; SILVA, A. L. .L., Opção de tratamento para cisto dentígero extenso em crianças. **Rev. Bras. Cir. Implant.**, v. 8, n. 30, p. 121-5, 2001.
87. PARTRIDGE, M.; KIGUWA, S.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S.; A'HERN, R.; LANGDON, J.D., New insights into p53 protein stabilization in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 1, p. 45-69, 1999.
88. PAULA, A. M. B.; CARVALHAIS, J. N.; DOMINGUES, M. G.; BARRETO, D. C.; MESQUITA, R. A., Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation, **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, n. 10, p. 477-82, 2000.
89. PHILIPSEN, H. P.; REICHART, P. A., Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 317-25, 1998.
90. PIATTELLI, A.; FIORONI, M.; SANTINELLI, A.; RUBINI, C., Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastoma and odontogenic cysts. **Oral Oncol.**, v. 34, n. 5, p. 408-12, 1998.
91. PIATTELLI, A.; IEZZI, G.; FIORONI, M.; SANTINELLI, A.; RUBINI, C., Ki-67 expression in dentigerous cysts, unicystic ameloblastomas, and ameloblastomas arising from dental cysts. **J. Endodont.**, v. 28, n. 2, 2002.
92. RABENHORST, S. H.; BURRINI, R. C.; SCHIMITT, F.C.L., Marcadores de proliferação celular. **Rev. Bras. Pathol. Clin.**, v. 29, n. 1, p. 24-28, 1993.

93. RABENHORST, S. H.; BURRINI, R. C.; SCHIMITT, F.C.L., Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev Bras Cancerol.**, v. 40, n. 3, p. 141-147, 1994.
94. REGEZI, J. A.; SICULBA, J. J., **Oral Patology**, W.B Saunders Company-Philadelphia., 3^a edição, p. 62-71, 1999.
95. REGEZI, J. A., Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrousseus, and gigant cell lesions of the jaws, **Mod. Pathol.**, v. 15, n. 3, p. 331-41, 2002.
96. REICHART, A. P.; PHILIPSEN, P.H., **Atlas Colorido de Odontologia (Patologia Bucal)**, Artes Médicas – Porto Alegre. 2000
97. REICHART, A. P.; PHILIPSEN, P.H.; SONNER, S., Ameloblastoma: Biological profile of 3677 cases. **Oral Oncol**, v. 31b, n2, p. 86-99, 1995.
98. ROOFE, S. B.; BOYD, JR E. M.; HOUSTON, G.D.; EDGIN, W. A., Squamous cell carcinoma arising in the epithelial lining of a dentigerous cyst. **South. Med. J.**, v. 92, n. 6, p 611-4, 1999.
99. ROOS, R. E.; RAUBENHEIMER, E. J.; VAN HEERDEN, W. F. P., Clinico-pathological study of 30 unicystic ameloblastomas. **J. Dental Assoc. S. Afr.**, p. 559-62, 1994.
100. SAITO, T.; NAKJIMA, T.; MOGI, K., Immnohistocheamical analysis of cell cicle-associated peoteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to veerucous carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 28, p. 226-32, 1999.

101. SANDRA, F.; NAKAMURA, N.; MITSUYASU, T.; SHIRATSUCHI, Y.; OHISHI, M. Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre), **Histopathology**, v. 39, p. 93-98, 2001a.
102. SANDRA, F.; MITSUYASU, T.; NAKAMURA, N.; SHIRATSUCHI, Y.; OHISHI, M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. **Oral Oncol.**, v. 37, p. 193-198, 2001b.
103. SANDRA, F.; NAKAMURA, N.; KANEMATSU, T.; HIRATA, M.; OHISHI, M., The role of MDM2 in proliferative activity of ameloblastoma. **Oral Oncol.**, v. 38, p. 153-7, 2002.
104. SANDS, T.; TOCCHIO, C., Multiple dentigerous cysts in a child. **Oral Health**, v. 88, n. 5, p. 27-9, 1998.
105. SANT'ANA FILHO, M.; RADOS, P. V.; BREMM, T. S., Prevalência de paraceratinização e ortoceratinização em ceratocistos odontogênicos. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 38, n. 2, p. 36-9, 1997.
106. SANTOS, J. N.; PINTO, L. P.; FIGUEREDO, C. L. R. V.; SOUZA, L. B., Tumores odontogênicos: análise de 127 casos. **Pesq. Odontol. Bras**, v. 15, n. 4, p. 308-13, 2001.
107. SAPP, J.P.; EVERSOLE, L.R.; WYSOCKI, G.P., **Contemporary Oral e Maxilofacial Patology**, New York: Mosby, 1997.
108. SARANATH, D.; TANDLE, A. T.; TENI, T. R.; DEDHIA, P. M.; BORGES, A. M.; PARKH, D.; SANGHAVI, V.; MEHTA, A. R., p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leucoplakias from India. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 3, p. 242-56, 1999.

109. SASSI, L. M.; RAMOS, G. H. A.; CALDERALI, G. T.; BIAZOLLA, E. R.; FREITAS, S. E. N.; OLIVEIRA, B. V., Ameloblastoma: Análise de 43 casos. **BCI**, v. 8, n. 31, 2001.
110. SCHARFFETTER, K.; BALZ-HERRMANN, C.; LAGRANGE, W.; KOBERG, W.; MITTERMAYER, C., Proliferation kinetics-study of the growth of Keratocysts. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 17, n. 5, p. 226-33, 1989.
111. SHEAR, M., The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: si it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. **Oral Oncol.**, v. 38, p.219-26, 2002a.
112. _____. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: si it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. **Oral Oncol.**, v. 38, p. 323-331, 2002b.
113. _____. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: si it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. **Oral Oncol.**, v. 38, p. 407-415, 2002c.
114. SILVA, M. J.; SOUSA, S. O.; CORREA, L.; CARVALHOSA, A. A.; ARAUJO, V. C., Immunohistochemical study of the orthokeratinized odontogenic cyst: a comparison with the odontogenic keratocyst. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 94, n.6, p. 732-7, 2002.
115. SILVA, M.J.A.; DE CARVALHOSA, A. B.; GOIVANINI, A. F.; MESQUITA, R. A.; DE ARAÚJO, V. C., Cisto odontogênico ortoceratinizado: critérios de diagnóstico, **RPG rev. pos-grad.**, v. 8, n. 2, p. 121-4, 2001.
116. SILVEIRA, E.D.; GIL, J.N., Ameloblastoma Unicístico: Considerações histopatológicas e tratamento. **Rev. Cienc. Saúde**, v 12, n 2, p 7-15, 1993.

117. SLOOTWEG, P. J., p53 protein and Ki-67 reativity ineptelial odontogenoc lesions. An immunohistcheamical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 393-7, 1995.
118. SOUZA, P. E. A.; PAIM, J. F. O.; CARVALHAIS, J. N.; GOMEZ, R. S., Immonohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central gigant cell granuloma and gigant cell tumor. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 28, n. 2, p. 54-8, 1999.
119. SOUSA, P.E.A; MESQUITA, R.A.; GOMEZ, R.S., Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis.**, v. 6, p. 35-39, 2000.
120. SOUZA, L. B.; PINTO, L. P.; FREITAS, R. A., Ceratocisto odontogênico com transformação ameloblastomatososa. **Revista Odonto Cienc.**, n. 18, p. 115-21, 1994.
121. STOELINGA, P. J. W., Long-term follow-up on keratocysts trated according to a defined protocol. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 30, n. 1, p. 14-25, 2001.
122. TAKAHASHI, H.; FUGITA, S.; YAMABE, S.; MORIISHI, T.; OKABE, H.; MIZUNO, A., Comparison of proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic keratocyst and ameloblastoma: an immunohistocheamical study. **Anal. Cell Pathol.**, v.16, n.4, p. 185-92, 1998.
123. TOSCHI, L.; BRAVO, R., Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. **J. Cell Biol.**, v. 107, p. 1623-28, 1988.
124. TSUJI, T.; MIMURA, Y.; WEN, S.; LI, X.; KENEKAWA, A.; SASAKI, K; SHINOSAKI, F., The significance of PCNA and p53 protein in same oral tumors. **J. Oral Maxilofac. Surg.**, v. 24, p. 221-5, 1995.

125. TSUKAMOTO, G.; SASAKI, A.; AKIYAMA, T.; ISHIKAWA, T.; KISHIMOTO, K.; NISHIYAMA, A.; MATSUMURA., A radiographic analysis of dentigerous cysts and odontogenic keratocysts associated with a mandibular third molar. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**v. 91, n. 6, p. 743-7, 2001.
126. VAN OIDJEN, M. G. C. T.; MEDEMA, R. H.; SLOOTWEG, P. J.; RIJKSEN, G., Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 110, p. 24-31, 1998.
127. ZACHARIADES, N.; PAPANICOLAU, S.; TRIANTAFYLLOU, D., Odontogenic keratocysts: Review of literature and report of sixteen cases. **J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 43, p 177-82, 1985.
128. ZUBER, M.; TAN, E. M.; RYOGI, M., Involvement of proliferating cell nuclear antigen (cyclin) in DNA replication in living cells. **Mol. Cell. Biol.**, n. 9, n. 1, p. 57-66, 1989.
129. WANG, E; YU. G; GAO, Y., A study of epithelial cell kinetics of the odontogenic keratocyst. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 33, n. 4, p. 210-2, 1998.
130. WOOLGAR, J. A.; RIPPIN, J. W.; BROWNE, R.M., Comparative study of the clinical and histological features of recurrent and no-recorrent odontogenic keratocysts. **J. Oral Pathol.**, v. 16, n.2, p. 49-52, 1987.

