



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

RENATA VERAS CARVALHO MOURÃO

**ESTUDO DA RELAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
MONONUCLEAR E EXPRESSÃO DE Ki-67, COLÁGENO TIPO
IV E LAMININA EM CISTOS RADICULARES**

**FORTALEZA
2013**

RENATA VERAS CARVALHO MOURÃO

**ESTUDO DA RELAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
MONONUCLEAR E EXPRESSÃO DE Ki-67, COLÁGENOTIPO
IV E LAMININA EM CISTOS RADICULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Tropical.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

**FORTALEZA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M891e Mourão, Renata Veras Carvalho
Estudo da relação do infiltrado inflamatório mononuclear e expressão de Ki-67, colágeno IV e laminina em cistos radiculares/ Renata Veras Carvalho Mourão. – 2013.
54 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Patologia.
Orientação: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Imuno-histoquímica. 2. Antígeno Ki-67. 3. Laminina. 4. Colágeno Tipo IV. 5. Cisto Radicular. 6. Cisto Dentífero. I.Título.

CDD 616.31

RENATA VERAS CARVALHO MOURÃO

**ESTUDO DA RELAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
MONONUCLEAR E EXPRESSÃO DE Ki-67, COLÁGENO TIPO
IV E LAMININA EM CISTOS RADICULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Eveline Turatti
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Fabrício Bitu Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato Luiz Maia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais Ordono e Lucineide, pelo estímulo e apoio incondicionais desde a primeira hora, pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e sensatez com que constantemente me ajudaram.

Ao meu marido, Josué e a nossa filha Marina, pelo incentivo, dedicação apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, e por fortalecer minha fé a cada dificuldade superada.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e principalmente, por ser um exemplo de excelente mestra a ser seguido por todos. A todos os colegas e mestres da Patologia do Curso de Odontologia da UFC: Prof. Fabrício Bitú, Prof. Mário, bem como à todos colegas mestrados, em especial, ao Paulinho e a Carol por todo o apoio e amizade.

À minha família: meu pai, Ordono, por participar da minha educação, a minha querida mãezinha, Lucineide, por ser uma mãe maravilhosa a quem amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Aos meus irmãos Ricardo e Rinaldo, cunhadas, e sobrinhos Ana Clara, Samuel e Lucas pela maravilhosa amizade. Aos meus avós Luíz (*in memoriam*) e Elita pelo carinho e apoio e as minhas tias Luzelita, Lucirene e Tio Luiz Carvalho, pelo apoio em todas as horas.

Ao meu marido, Josué, por me apoiar em todos os meus objetivos, por ser um grande companheiro e um enorme pai para a Marina.

A Marininha, filha querida, que me ensina a cada dia que sempre podemos amar um pouco mais, pois o amor que sentimos por um filho é algo imensurável. Peço desculpas pelos momentos de ausência.

A todos os colegas e professores do Mestrado em Patologia, pelo convívio e aprendizado, em especial ao Dr. Eleutério, pelo incentivo dado e aprendizado valioso. À professora Doutora Margarida Pompeu, pelo apoio fornecido desde o início do mestrado.

Agradeço ao Tio Sullivan Mota, exemplo de médico, mestre, pelo seu constante apoio, antes mesmo do início do mestrado.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC, do Curso de Odontologia, pelo apoio.

“A maior prisão que existe é estar preso a si mesmo, as suas verdades e aos seus conhecimentos. Por outro lado, liberdade é desaprender o que se tornou obsoleto e almejar novas descobertas.”

(Josué Oka)

RESUMO

Os cistos dos ossos maxilares são classificados como odontogênicos e não odontogênicos. Dentre os odontogênicos inflamatórios, destaca-se o cisto radicular, e entre os de desenvolvimento, o dentígero. Estes cistos e suas variantes apresentam etiopatogênese e comportamento biológico diferentes, mas são igualmente líticos. A atividade proliferativa do epitélio de revestimento, dos componentes da membrana basal e da matriz extracelular, possivelmente, interferem nos mecanismos de crescimento, constituindo alvos de pesquisas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a relação do infiltrado inflamatório mononuclear com a expressão de marcadores de proliferação (Ki 67) e das proteínas da membrana basal e matriz extracelular nos cistos radiculares. Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional tendo sido realizado um levantamento dos casos catalogados no Serviço de Biopsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (FAMED) e no Laboratório de Patologia Bucal (FFOE) (UFC). Após a revisão histológica, os grupos foram divididos em cisto radicular intensamente inflamado (CRII) (n=17), cisto radicular levemente inflamado (CRLI) (n=9) e cisto dentígero (CD) (n=9). A presença e intensidade do infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário e preservação do epitélio de revestimento foram os parâmetros utilizados para seleção dos casos. Os espécimes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica por estreptoavidina biotina, utilizando-se os anticorpos Ki 67 (Dako®, 1:50), anti-colágeno IV (DBS®, 1:40) e anti-laminina (DBS®, 1:20). A expressão de Ki 67 foi mais intensa no grupo CRLI, quando comparada ao grupo CRII e CD. A expressão de colágeno tipo IV na membrana basal foi significativa no grupo CRLI, quando comparada com o grupo CRII e CD. Já a imunomarcagem de matriz extracelular variou de ausente a fraca nos grupos CRII e CRLI, enquanto no CD se exibiu de forma fraca a moderada, sendo esta diferença significativa. A expressão de laminina em membrana basal nos grupos CRII e CD foi negativa e no grupo dos CRLI foi fraca e pontual. Concluiu-se que a presença e a intensidade do conteúdo inflamatório na parede dos cistos radiculares parecem modificar a expressão dos fatores de proliferação no epitélio de revestimento, e colágeno tipo IV e laminina na membrana basal, mas não interferem no comportamento do colágeno IV da matriz extracelular nos cistos radiculares. A expressão de componentes da membrana basal (laminina e colágeno tipo IV) é maior nos cistos radiculares com leve infiltrado inflamatório.

Palavras-Chave: Imuno-histoquímica. Antígeno Ki-67. Laminina. Colágeno tipo IV. Cisto Radicular.

ABSTRACT

Jawbone cysts are classified as odontogenic and non-odontogenic cysts. The radicular cyst is the most common odontogenic cyst of inflammatory origin, whereas the dentigerous cyst is the most common type of developmental odontogenic cyst. These cysts and their variations have different etiopathogenesis and biological behavior, but are equally lytic. The proliferation activity of the epithelial lining and the components of the basement membrane and extracellular matrix constitute targets of research. The aim of this study was to evaluate the relation between mononuclear inflammatory infiltrate and the expression of proliferative immunomarkers (Ki 67), and proteins of basement membrane and extracellular matrix in radicular cysts. In this retrospective observational study, all cases of jawbone cysts that had been recorded in the files of the Department of Pathology and Legal Medicine (FAMED), and of the Laboratory of Oral Pathology (FFOE) of the Federal University of Ceará (UFC) and reviewed. After histological revision, the groups were divided into heavily inflamed radicular cysts (HIRC) (n=17), slightly inflamed radicular cysts (SIRC) (n=9) and dentigerous cysts (DC) (n=9). The presence and intensity of the lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate and the preservation of the epithelial lining were the parameters used to select the cases. Immunohistochemical analyses were performed using the standard streptavidin-biotin-peroxidase method. The primary antibodies used in this study included Ki 67 (Dako®, 1:50), Anti-Collagen Type IV (DBS®, 1:40) and Anti-Laminin (DBS®, 1:20). The immunoexpression of Ki-67 was more intense in the SIRC group compared to the HIRC group and DC. Likewise, the immunoexpression of Anti-Collagen Type IV in the basement membrane of the SIRC group presented a statistically significant difference compared to the HIRC group and DC. The expression of laminin in the basement membrane and in group HIRC and DC was negative and the group of SIRC was weak and punctual. It was concluded that presence and severity of inflammatory content wall of radicular cysts appear to modify the expression of proliferation factors in the coating epithelium and collagen type IV and laminin in the basement membrane but not modify with the behavior of extracellular matrix in radicular cyst. The expression of basement membrane components (laminin and collagen type IV) is higher in radicular cyst with mild inflammatory infiltrate.

Keywords: Immunohistochemistry. Ki-67 antigen. Laminin. Collagen type IV. Radicular Cyst.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRII	- Cisto Radicular Intensamente Inflamado
CRLI	- Cisto Radicular Levemente Inflamado
CD	- Cisto Dentígero
DAB	- Diaminobenzidina
DBS	- Diagnostic BioSystems
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DPML	- Departamento de Patologia e Medicina Legal
EGF	- Fator de Crescimento Epidérmico
EUA	- Estados Unidos da América do Norte
FAMED	- Faculdade de Medicina (UFC)
FFOE	- Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
IL-1	- Interleucina um
IL-6	- Interleucina seis
IL-1 α	- Interleucina um alfa
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCNA	- Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDGF	- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pH	- Potencial Hidrogeniônico
MMP	- Metaloproteinases da Matriz
MCP-1	- Monocyte Chemotactic Protein-1
RANTES	- Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia mostrando o revestimento epitelial do cisto radicular com células marcadas com Ki-67 e evidenciadas pelo programa Image J. (HE400X)	33
Figura 2	Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de Ki-67 em Cisto radicular intensamente inflamado (A), Cisto radicular levemente inflamado (B) e Cisto dentífero (C). IHQ estreptavidina-biotina. Aumento de 400X	38
Figura 3	Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de colágeno tipo IV em membrana basal de Cisto radicular intensamente inflamado (A), Cisto radicular levemente inflamado (B) e Cisto dentífero (C). IHQ estreptavidina-biotina. Aumento de 400X	39
Figura 4	Fotomicrografia mostrando fraca e pontual marcação de laminina em área descamada de epitélio de cisto radicular levemente inflamado. IHQ estreptavidina-biotina. Aumento de 400X.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Parâmetros utilizados na laminina (Adaptado de SHINOHARA <i>et al.</i> (1996) e KANNAN <i>et al.</i> (1994)).....	34
Tabela 02	Parâmetros utilizados no colágeno tipo IV (Adaptado de SOUZA <i>et al.</i> , 2007)	35
Tabela 03	Intensidade e padrão de marcação imuno-histoquímico de colágeno tipo IV (membrana basal e matriz extracelular), laminina (membrana basal) e Ki-67 (epitélio cístico) de cistos radiculares e dentígeros	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	CISTO RADICULAR	14
2.1	Inflamação x cisto radicular	18
3.	CISTO DENTÍGERO	20
4.	PROLIFERAÇÃO CELULAR	22
4.1	Ki-67	23
4.2	Membrana Basal	24
5.	OBJETIVOS	27
5.1	Geral.....	27
5.2	Específicos	27
6.	METODOLOGIA.....	28
6.1	Materiais	28
6.2	Amostra	29
6.3	Protocolo experimental	30
6.4	Estudo imuno-histoquímico	30
6.5	Análise estatística.....	34
6.6	Aspectos éticos	34
7.	RESULTADOS	34
7.1	Imuno-histoquímica	34
8.	DISCUSSÃO	38
9.	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO 1	53
	ANEXO 2.....	54

1 INTRODUÇÃO

Os cistos odontogênicos são as lesões osteodestrutivas mais comuns no esqueleto humano, com histogênese comum com origem em remanescentes epiteliais do epitélio odontogênico, mas com comportamentos clínicos diferentes (SILVEIRA *et al.*, 2007). A origem destes cistos também pode ocorrer a partir dos remanescentes epiteliais da lâmina dentária, que possuem a capacidade, desde os estágios iniciais do desenvolvimento até 10 semanas *in útero*, de proliferar e formar pequenos cistos (SHEAR E SPEIGHT, 2011).

Vários autores pesquisaram possíveis diferenças entre o potencial de crescimento desses cistos, por meio das mais variadas metodologias. A maior parte dos estudos, entretanto, foi direcionada para as características proliferativas dos revestimentos epiteliais dos cistos estudados (OLIVEIRA *et al.*, 2002; POOMSAWAT *et al.*, 2006; AYOUB *et al.*, 2011).

As lesões periapicais crônicas do tipo granuloma dentário e cisto radicular representam entidades comuns na clínica odontológica, tendo a cárie dentária como principal fator etiológico. As endotoxinas bacterianas, bem como as citocinas originadas do processo imunoinflamatório parecem ter influência no desenvolvimento de tais lesões, contribuindo para a reabsorção do osso alveolar ao redor do ápice do dente envolvido. Os cistos radiculares originam-se da indução dos restos epiteliais de Malassez, podendo advir de granulomas dentários (SANTOS *et al.*, 2006; FUKADA *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por Meghi (1996) avaliou a presença de endotoxinas e citocinas no fluido dos cistos radiculares, ceratocistos e cistos foliculares. Foi verificada uma grande concentração de endotoxinas no fluido dos cistos radiculares, onde a presença de IL-1 beta ocorreu apenas nos cistos radiculares inflamados. Por outro lado, foi verificada a presença de mRNAs, oriundos da IL-1 alfa, IL-1 beta e IL-6 presente em todos os tipos de cistos. Este estudo sugeriu que as citocinas e endotoxinas encontradas no fluido dos cistos radiculares possuem um efeito mitogênico sobre o epitélio e que os fibroblastos têm este efeito intensificado pela presença das endotoxinas.

No tocante à classificação dos cistos dos maxilares com revestimento

epitelial, estes são classificados em cistos de desenvolvimento e de origem inflamatória. Por sua vez, os de desenvolvimento podem ser odontogênicos e não odontogênicos. Os de origem inflamatória incluem o cisto radicular, residual, paradentário, paradentário juvenil e colateral inflamatório (SHEAR e SPEIGHT, 2011).

O cisto dentífero é considerado o segundo tipo mais comum de cisto odontogênico e, geralmente se origina ao redor do dente permanente não irrompido. Apesar da maioria dos cistos dentíferos ser considerada como de desenvolvimento em sua origem, há alguns exemplos que parecem apresentar patogênese inflamatória, quando ocorre ao redor da coroa de um dente permanente incluso, em decorrência da inflamação periapical de um dente decíduo sobrejacente (SANDHU *et al.*, 2010). Além disso, ele ocorre na dentição permanente especialmente em associação com terceiros molares e caninos maxilares que, muitas vezes, permanecem impactados (CAKARER *et al.*, 2011).

2 CISTO RADICULAR

O cisto radicular pode ser definido como uma lesão situada na região periradicular de um dente desvitalizado, caracterizada pela formação de uma cavidade patológica, circundada por epitélio, e uma cápsula constituída por tecido conjuntivo, encerrando em seu interior um material fluido ou semissólido (SAUAIA *et al.*, 2000).

Estudos epidemiológicos mostram que o cisto radicular representa a entidade patológica encontrada com maior frequência (GROSSMAN *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010), com predominância pelo sexo masculino (AVELAR *et al.*, 2009; PROCKT *et al.*, 2008; EL-GEHANI *et al.*, 2009; JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006). A prevalência desta lesão ocorre na terceira década de vida (BORGES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2010; AVELAR *et al.*, 2009; SHARIFIAN; KHALILI., 2011; OCHSENIUS *et al.*, 2007) sendo a localização mais frequente a maxila (SELVAMANI; DONOGHUE; BASANDI, 2012; GROSSMAN *et al.*, 2007; JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006).

Os cistos radiculares, geralmente, são assintomáticos, descobertos muitas vezes apenas pelas radiografias, mas podem atingir grandes dimensões, em consequência de infecções, da falta de sintomatologia e evidências clínicas (MARTINS FILHO *et al.*, 2009; SOARES; SANTOS; SILVEIRA, 2006).

Em geral, os cistos radiculares são originários de um granuloma periapical com epitélio pré-existente, o qual constitui um foco de tecido de granulação cronicamente inflamado no ápice de um dente. Por outro lado, a formação dos granulomas dentários ocorre em consequência da penetração de agentes infecciosos bacterianos e irritantes do periápice dental, que proporcionam aumento de fibroblastos, fibrilas colágenas, células endoteliais e capilares (FREITAS; ROSA; SOUSA, 2000). Ambos se classificam como lesões periapicais crônicas, cuja formação envolve a ativação da resposta imunológica e a reabsorção do osso alveolar ao redor do ápice do dente envolvido (FUKADA *et al.*, 2009).

Durante o período de deposição da dentina radicular, os restos epiteliais de Malassez resultam da apoptose incompleta sofrida pela bainha epitelial de Hertwig durante a rizogênese, permanecendo no ligamento periodontal até o recebimento de um estímulo proliferativo, com possibilidade de desenvolver cistos radiculares. A presença e ação de citocinas inflamatórias parecem estimular a divisão dessas células epiteliais, bem como a reabsorção do osso adjacente (RUIZ *et al.*, 2003). Em decorrência de um estímulo crônico de baixa intensidade, desencadeado pelas bactérias e seus produtos, é condicionado ao organismo o fato de tentar inibir o crescimento da agressão e, desta forma, mantê-la confinada à região periapical (VIER; FIGUEIREDO, 2002).

Alguns autores descrevem diversas teorias para explicar a formação da cavidade cística. Segundo Lin, Huang e Rosenberg (2007) existem três teorias que explicam a formação dos cistos radiculares: a primeira é a teoria da deficiência nutricional, em que por meio de um estímulo inflamatório, ocorre uma proliferação epitelial na região, e as células mais centrais sofrem necrose, formando a cavidade cística. Outra teoria defende que a proliferação celular é consequência da formação de um abscesso, formando cordões que o revestem. A terceira teoria afirma que a formação de cordões de tecido epitelial ocorre devido a proliferação dos restos epiteliais de Malassez, que se fusionam, originando a cavidade cística. A

descamação de restos celulares conduz a um aumento do conteúdo proteico no interior da cavidade, levando a entrada de líquido e conseqüente expansão da lesão.

A expansão da cavidade cística não é consequência apenas do aumento da pressão osmótica. Devem ser considerados aspectos importantes, como as propriedades do epitélio cístico, da matriz extracelular e dos componentes das reações imunoinflamatórias (PIATTELLI *et al.*, 2004). Um estudo realizado por MUGLALI *et al.* (2008) avaliou o nível das citocinas e quimiocinas no fluido dos cistos radiculares e residuais, tendo sido constatado que o fluido dos cistos radiculares possui uma maior concentração de IL-1 α , TNF- α , MCP-1 e RANTES quando comparado com os cistos residuais. Estas citocinas estão envolvidas na expansão cística por isso evidenciou-se que apesar de possuírem origens semelhantes, os cistos radiculares possuem uma maior capacidade de expansão que os cistos residuais e que se o cisto radicular for inadvertidamente deixado após uma extração, certo grau de inflamação pode permanecer e desta forma contribuir para a expansão cística.

Outro fator importante para o crescimento e expansão da lesão cística é a participação das metaloproteinases da matriz (MMPs) : as colagenases (MMP-1, -8 e -13); gelatinases (MMP-2 e -9), também conhecidas como colagenases do tipo IV, estromelisinases (MMP-3, -10 e -11), além de outras (KUMAMOTO *et al.*, 2003). Estudo de Silveira *et al.* (2007) avaliou a expressão imuno-histoquímica das MMPs - 1, -2 e -9 em cistos radiculares, residuais, dentígeros e ceratocistos. Esse estudo concluiu que o mecanismo de expansão dos cistos estudados pode ser influenciado, e até mesmo conduzido, pela secreção das metaloproteinases da matriz (que podem estar sendo liberadas tanto pelo componente epitelial como por células mesenquimais).

Na sua maioria, os cistos radiculares são revestidos completamente ou em parte por epitélio estratificado escamoso não ceratinizado (SHEAR; SPEIGHT, 2011). Este epitélio pode conter exocitose, espongirose ou hiperplasia . A cápsula do cisto radicular consiste em tecido conjuntivo fibroso denso, muitas vezes com infiltrado inflamatório contendo linfócitos variáveis, permeados por neutrófilos, plasmócitos, histiócitos e, raramente, mastócitos e eosinófilos (NEVILLE, 2009).

Vários estudos defendem a inviabilidade do diagnóstico radiográfico para diferenciação de lesões periapicais. A imagem radiográfica tem caráter sugestivo de diagnóstico. Apenas os exames histopatológicos são conclusivos para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo (VIER; FIGUEIREDO, 2000).

O tratamento dos cistos radiculares pode ser realizado através do tratamento endodôntico, que é a forma conservadora, ou, em alguns casos, cirurgicamente (MARTINS FILHO *et al.*, 2009). A escolha do tratamento depende de alguns fatores: tamanho da lesão, relação com estruturas nobres, origem e evolução da lesão. O tratamento endodôntico dos cistos radiculares envolve o tratamento conservador realizado pelo preparo biomecânico dos canais radiculares e o tratamento cirúrgico, que inclui a exérese total ou parcial da lesão. Quando o tratamento cirúrgico é realizado, este pode ocorrer primeiramente através da descompressão e/ou marsupialização da lesão e, posteriormente, sua enucleação, ou diretamente pela enucleação total da lesão. O tratamento cirúrgico é geralmente sugerido nos casos de situações nas quais ocorrem extensas lesões (RIBEIRO JR. *et al.*, 2004).

Por outro lado, a marsupialização seguida de enucleação expressa diversas vantagens quando comparada ao tratamento cirúrgico radical, dentre as quais a maior preservação dos tecidos orais e estruturas anatômicas e a eliminação de grandes procedimentos cirúrgicos, que apresentam menores índices de recidiva, mas que podem estar associados a defeitos faciais de difícil resolução (FIGUEIREDO, 2011).

Alguns autores defendem o tratamento de cistos radiculares de grandes dimensões por via do tratamento endodôntico, realizado com o auxílio de microscopia eletrônica, associada à laserterapia (MOTTA JÚNIOR; FIDEL; FIDEL, 2009). Outros sugerem como tratamento de cistos de grandes dimensões a descompressão cística feita com o emprego de um dreno na região bucomaxilofacial, seguida do tratamento endodôntico. O procedimento promove a redução da lesão, evitando cirurgias extensas (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

2.1 Inflamação x cisto radicular

Quando o organismo se depara com um dano tecidual, a resposta inflamatória é a primeira linha de defesa. É um processo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis. O processo inflamatório tem por finalidade remover o estímulo que induziu a inflamação e dar início à recuperação tecidual. Pode ocorrer no tecido conjuntivo vascularizado, incluindo plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e constituintes extracelulares do tecido conjuntivo. No tecido conjuntivo, a matriz extracelular é composta de proteínas fibrosas estruturais (colágeno e elastina), glicoproteínas aderentes (fibronectina, laminina, colágeno, tenascinas e outras) e proteoglicanas, que proporcionam um arcabouço físico para sustentação da estrutura tecidual (CRUVINEL *et al.*, 2010; HEHN, 2011).

Nos cistos odontogênicos diferentes células e mediadores inflamatórios estão envolvidos na sua formação e desenvolvimento. Tanto a defesa humoral e celular quanto os eventos bioquímicos e celulares da inflamação assim como os moduladores da matriz extracelular contribuem para o desenvolvimento de lesões crônicas dos tipos granuloma e cisto radicular (SANTOS *et al.*, 2009).

A inflamação crônica, em geral, é ocasionada pela presença de um estímulo tóxico persistente. O processo inflamatório é objeto de alterações qualitativas, caracterizadas por mudanças progressivas nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido. As células imunocompetentes, macrófagos, fibroblastos e a imunidade adquirida estão envolvidos neste processo (HEHN, 2011). Alguns estudos investigaram os tipos celulares presentes em granulomas periapicais: Babál *et al.*, (1987), identificaram, com o uso de anticorpos monoclonais, a natureza e a distribuição dos componentes celulares neste tipo de lesão. Constataram uma predominância de linfócitos e um número variável de fibroblastos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. Piantelli *et al.* (1991) avaliaram por meio da microscopia eletrônica as células presentes nos granulomas periapicais e verificaram que monócitos/macrófagos, linfócitos e células plasmáticas foram predominantes. Bracks (2012) por sua vez, estudou a distribuição quantitativa de mastócitos e macrófagos em lesões perirradiculares inflamatórias (cistos e

granulomas), e observou que nestas lesões a presença de mastócitos foi mais marcante nas áreas de exocitose e de inflamação superficial intensa, e que não houve diferença com relação à frequência de mastócitos e macrófagos nas regiões superficiais e profundas das lesões.

Os macrófagos participam predominantemente na inflamação crônica. Originam-se dos monócitos que constituem de 3% a 8% dos leucócitos circulantes, e estão presentes no tecido conjuntivo ou parênquima dos órgãos. Além dos macrófagos, os monócitos também originam células dendríticas mieloides. Por outro lado, os macrófagos são células capazes de produzir substâncias que participam nas funções de defesa e reparos de tecidos (produção de colagenase), na defesa imunológica contra infecções e tumores e na produção de citocinas, fatores de crescimento e angiogênese. Sua permanência nos tecidos pode variar de meses a anos. Participam da imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), estimulando, desta forma, os linfócitos T (CRUVINEL *et al.*, 2010; RAPPOLEE *et al.*, 1988).

Os linfócitos originam-se na medula óssea a partir de uma célula precursora pluripotencial hematopoiética. Subdividem-se em linfócitos T e linfócitos B. A maturação dos linfócitos B ocorre no fígado fetal e posteriormente na medula óssea. Os linfócitos B, quando ativados por antígenos, se transformam em células plasmáticas que secretam imunoglobulinas, responsáveis pela imunidade humoral, atuando contra bactérias extracelulares. Os linfócitos T, após sua ativação, secretam citocinas e são responsáveis pela imunidade celular atuando principalmente contra patógenos intracelulares. Os linfócitos T e B, através de mediadores químicos e citocinas, migram para as regiões inflamadas exibindo uma relação de reciprocidade com os macrófagos na inflamação crônica (ROBLETO, 2009; MESQUITA JÚNIOR, D *et al.*, 2010).

3. CISTO DENTÍGERO

O cisto dentígero é um cisto odontogênico associado à coroa de um dente permanente não irrompido (THOSAPORN; IAMAROON; PONGSIRIWETS, 2004). Em geral, comporta-se de forma assintomática, não apresentando desconforto ao paciente, exceto quando ocorre a exacerbação inflamatória, sendo descoberto muitas vezes apenas pelo exame radiográfico (PASSI *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2006).

Segundo estudos epidemiológicos, o cisto dentígero é o segundo cisto mais comumente encontrado na cavidade oral (GROSSMAN, *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010), possuindo uma predominância pelo sexo masculino (OCHENIUS *et al.*, 2007; JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006), incidência mais elevada na segunda década de vida (SELVAMANI; DONOGHUE; BASANDI, 2012; PROCKT *et al.*, 2008) e localização predominante na mandíbula (AVELAR *et al.*, 2009; JONES; CRAIG; FRANKLIN, 2006).

Os cistos dentígeros originam-se do epitélio folicular e é frequentemente sugerido que estes se desenvolvem durante diferentes estágios da formação dentária. Tais cistos surgem precocemente durante a odontogênese, gerados pela degeneração do retículo estrelado do órgão do esmalte, o que poderia acarretar hipoplasia do esmalte do dente envolvido. Outra possibilidade é o desenvolvimento do cisto ocorrer após a completa formação da coroa, quando sucede o acúmulo de líquido entre a coroa e o epitélio reduzido do esmalte (AL-TALABANI; SMITH, 1980). Alguns autores citam uma origem inflamatória para o cisto dentígero, que seria relacionado a processos infecciosos que envolveriam o dente decíduo antecessor (SILVEIRA *et al.*, 2009; AGUILO *et al.*, 1998).

Histologicamente, o cisto dentígero se mostra com uma cápsula de tecido conjuntivo frouxamente arranjado e com pequenas ilhas ou cordões de epitélio odontogênico. O revestimento da cavidade cística possui de duas a quatro camadas de células não queratinizadas com uma interface epitélio –conjuntivo plana (WALDRON *et al.*, 2002). Na cápsula pode ser encontrado um infiltrado inflamatório

do tipo mononuclear e, ocasionalmente, alguns polimorfonucleares. Segundo a literatura, o cisto dentígero inflamatório é caracterizado pela presença do epitélio proliferativo e exsudato inflamatório (AGUILO *et al.*, 1998).

Exibe-se radiograficamente com uma radiolucência bem definida circundando a coroa de um dente incluso, muitas vezes com uma borda esclerótica (KALASKAR; TIKU; DAMLE, 2007). Então, é comum ser encontrada reabsorção radicular no dente que se encontra na região da lesão (FREITAS *et al.*, 2006).

A remoção do dente associado e a enucleação da lesão são consideradas terapias definitivas no cisto dentígero. Por outro lado, cistos dentígeros de grandes dimensões podem necessitar de uma descompressão ou marsupialização para promover uma diminuição da lesão e, desta forma, tornar mais seguro o procedimento cirúrgico a ser realizado posteriormente (KARAMMANIS *et al.*, 2006). Cakarer *et al.*, 2011 mostraram em seu estudo uma paciente de 17 anos portadora de um grande cisto dentígero mandibular associado a um terceiro molar não erupcionado. O tratamento realizado foi a descompressão e a enucleação após seis meses. Neste caso, a abordagem conservadora permitiu que a formação óssea ocorresse sem a utilização de quaisquer materiais de enxerto, permitindo a colocação posterior de implantes dentários. Por outro lado, algumas raras complicações podem ocorrer pela presença dos cistos dentígeros: os cistos maxilares podem deslocar-se e destruir o antromaxilar e cavidade nasal ou os cistos mandibulares podem causar parestesia no nervo alveolar inferior (MOTAMEDI *et al.*, 2005).

4. PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultantes da finalização do ciclo celular. É controlada pela diferenciação celular que constitui um processo biológico complexo e vital (SCOOT, 1997; LEVINE *et al.*, 1994). Numerosos processos fisiológicos e patológicos, incluindo crescimento, cicatrização, reparo, hipertrofia, hiperplasia e desenvolvimento de tumores, estão relacionados com a proliferação celular. Sendo, os estudos nesta área extremamente relevantes (KUMAR *et al.*, 2005).

O crescimento e a divisão celular de células somáticas dependem de uma série complexa de reações bioquímicas que ocorrem em um período de 24 a 48 horas, denominado ciclo celular. Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas. O ciclo celular é composto de quatro fases: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período depois da replicação de DNA (G2) e a fase mitótica, que culmina com a divisão celular. O início do ciclo depende de um estímulo, pois a célula se encontra em repouso (G0) e precisa ser estimulada por fatores de crescimento (PDGF, EGF, INSULINA), hormônios esteroides e citocinas produzidas por elas mesmas ou células ao redor (GARAY *et al.*, 2003; PINHO, 1999).

Para a avaliação do crescimento e proliferação celular, são utilizados os marcadores de proliferação celular, que asseguram, não só uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, como também a possibilidade de investigação prognóstica das neoplasias humanas, de maneira simplificada e rápida (ROCHA *et al.*, 2007).

4.1 Ki -67

O antígeno Ki-67 é uma proteína humana localizada no núcleo com expressão associada a células em proliferação, ou seja, ausente em células quiescentes (GUEDES *et al.*, 1984). É um antígeno nuclear não histona que faz parte da estrutura proteica, conhecida como suporte cromossômico. Sua expressão é determinada pelo gene situado no *locus* 10q25 e ocorre no final da fase G1, em S, G2 e M (FONATSCH *et al.*, 1991). Ele reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente em proliferação, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (GUEDES *et al.*, 1984).

Sua utilização em técnicas imuno-histoquímicas, aliando simplicidade, facilidade de manuseio pelos patologistas e amplo uso para diagnóstico, favorece inúmeros estudos, correlacionando os resultados obtidos à gradação e prognóstico das neoplasias (ARISAWA *et al.*, 1999).

O Ki-67 é amplamente utilizado para avaliar o potencial proliferativo de células saudáveis, assim como de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (GÜLER *et al.*, 2012). Alguns trabalhos indicaram a superioridade do Ki-67 como marcador de proliferação celular, por não receber tantas influências de fatores externos e internos (VIEIRA *et al.*, 2009).

Ramalho *et al.* (2000) realizaram um trabalho de expressão imuno-histoquímica da Ciclina D1, Ki-67 e PCNA em carcinomas espinocelulares de boca. Compararam os três anticorpos, tendo concluído ser o Ki-67 o melhor anticorpo para material rotineiramente processado, pois proporcionou melhor qualidade de marcação, com padrão granular e intensidade variável entre células do mesmo tumor. Além disso, segundo eles, existiu a ausência completa de colorações inespecíficas, outra vantagem adicional conferida ao Ki-67.

AYOUB *et al.* (2011) verificou a imuno-expressão de Ki-67 em cistos radiculares e ceratocistos. Concluiu que a natureza benigna de cistos radiculares e o comportamento agressivo dos ceratocistos poderiam ser explicados por meio da expressão de Ki-67 e que ele pode ser um marcador de proliferação celular valioso para a melhor entendimento do comportamento biológico das lesões císticas.

4.2 Membrana basal

A membrana basal é uma delgada lâmina de matriz extracelular que reveste células nervosas, adiposas e musculares, além de separar células epiteliais do tecido conjuntivo subjacente (DELLA COLLETA *et al.*, 1994; GONZÁLEZ *et al.*, 1994).

A matriz extracelular é uma estrutura constituída por proteínas e polissacarídeos, que são secretados localmente e distribuídos em uma extensa rede organizada, associada à superfície celular. Na interface do epitélio com o tecido conjuntivo, a matriz é chamada de lâmina ou membrana basal, uma cobertura fina, porém resistente, que possui importante papel no controle do comportamento celular (ALBERTS, 2004).

Na sua composição, estão presentes proteínas, como o colágeno tipo IV, heparam-sulfato, fibronectina, entactina e a laminina (ENGBRING; KLEINMAN, 2003). Dentre estes, o colágeno tipo IV e a laminina despertam bastante interesse na patogênese das lesões periapicais, visto que podem desempenhar diversas funções, tais como: adesão celular, migração, atividade proteolítica, proliferação celular, crescimento tumoral e metástases (ENGBRING; KLEINMAN, 2003).

As lamininas fazem parte de uma família de glicoproteínas que formam uma porção integral da rede de suporte da membrana basal em quase todos os tecidos animais e de matrizes extracelulares encontradas entre camadas celulares. Contribuem na montagem da membrana basal, resultando em uma arquitetura supramolecular (COLOGNATO; URCHENCO, 2000; LEBLEU, 2007).

A laminina-1 (laminina clássica) é a proteína não colagênica mais abundante presente na membrana basal. Composta de três cadeias polipeptídicas muito longas (alfa, beta e gama), organizadas na forma de uma cruz assimétrica e unidas por pontes dissulfídicas. Várias isoformas de cada tipo de cadeia podem associar-se de variadas combinações para formar uma grande família de lamininas. Como muitas outras proteínas da matriz extracelular, as lamininas nas membranas basais consistem de vários domínios funcionais. Uns ligam-se à percalana, outros ao nidogênio e dois ou mais a proteínas receptoras de laminina, na superfície da célula (ALBERTS *et al.*, 2004; BARNERJEE *et al.*, 2012).

É uma glicoproteína presente na membrana basal, com funções específicas, dentre as quais se destaca a adesividade. Sabe-se que as células tumorais se ligam à membrana basal, através de receptores para laminina e, posteriormente, são estimuladas a produzir metaloproteinases, iniciando, assim, a fragmentação e degradação da membrana. Essas características reforçam os estudos imuno-histoquímicos sobre os componentes da membrana basal, relacionados com o crescimento da loja cística (SOUZA *et al.*, 2007; ZUCCARI *et al.*, 2011).

A laminina regula uma variedade de fenômenos biológicos, incluindo fixação, crescimento, morfologia e migração celular. Certos tipos de células normais e neoplásicas contêm locais de ligação de alta afinidade pela laminina (LIOTTA, 1984).

Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de observar o padrão de distribuição da laminina na membrana basal em cistos odontogênicos por meio de uso de anticorpos primários. Nos cistos radiculares, a intensidade da imunomarcagem para laminina mostrou-se moderada e intensa, com um padrão de marcação ininterrupto. Por outro lado, nos cistos dentígeros, a intensidade da imunomarcagem se exibiu fraca (OLIVEIRA *et al.*, 2002; POOMSAWAT; PUNYASING; WEERAPRADIST, 2006).

Outro estudo realizado por Ayoub *et al.* (2011) utilizou o mesmo anticorpo para avaliar 13 cistos radiculares e 12 ceratocistos, constatando que 76.9% dos cistos radiculares foram positivos para a marcação imuno-histoquímica para laminina.

O colágeno tipo IV é uma proteína de alto peso molecular, formado por duas cadeias polipeptídicas, alfa 1 e alfa 2, unidas numa só molécula tri-helicoidal, que se dispõe em forma de rede (ALBERTS *et al.*, 2004). Por sua vez, ele também pode fornecer condições adequadas para o crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares, como, por exemplo, os epitélios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). É uma proteína fibrosa que forma a parte principal da membrana basal, onde os outros componentes da matriz são montados. (LIOTTA.,1984).

Um trabalho realizado por Oliveira *et al.*, (2002) avaliou o padrão de distribuição do colágeno tipo IV em cistos odontogênicos: cistos radiculares,

ceratocistos e cistos dentígeros. A imunorreatividade mostrou regularidade quanto á espessura da marcação linear em zona subepitelial, tendo se mostrado em todos, como uma linha delgada, com exceção de dois cistos dentígeros que se apresentaram com algumas áreas espessas. Já na relação de continuidade da marcação linear, os cistos radiculares exibiram continuidade em cinco espécimes, os dentígeros em quatro e nenhum dos ceratocistos exibiu esta continuidade.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Avaliar a relação do infiltrado inflamatório mononuclear com a expressão de marcador de proliferação celular Ki-67 e das proteínas da membrana basal e matriz extracelular nos cistos radiculares.

5.2 Específicos

- Diferenciar os cistos radiculares quanto ao processo inflamatório.
- Verificar a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 no epitélio dos cistos radiculares levemente inflamados e intensamente inflamados e cistos dentígeros (não inflamados).
- Verificar a expressão de colágeno IV e laminina na membrana basal dos cistos radiculares levemente inflamados e intensamente inflamados e cistos dentígeros (não inflamados).
- Verificar a expressão de colágeno IV na matriz extracelular dos cistos radiculares levemente inflamados e intensamente inflamados e dentígeros (não inflamados).

6. METODOLOGIA

6.1 Materiais

Reagentes, corantes e anticorpos

- ✓ Formol, Sigma.
- ✓ Hematoxilina, Merck.
- ✓ Eosina, Merck.
- ✓ Ki 67 (Dako®)
- ✓ Anticolágeno IV (DBS®)
- ✓ Antilaminina(DBS®)
- ✓ Diaminobenzidina (DABI)(Dako®,EUA).

Equipamentos

- ✓ Balança digital de precisão, Gehaka®.
- ✓ Micrótomo.
- ✓ Microscópio binocular, Nikon®.
- ✓ Processador automático (A/T 2000M), Airtechniques, inc®.
- ✓ Petelik (Dako®).

Materiais diversos

- ✓ Pipetas automáticas
- ✓ Becker de 10 mL.
- ✓ Gazes
- ✓ Lâminas silanizadas
- ✓ Lâminas histológicas
- ✓ Lamínulas
- ✓ Parafina para preparações histológicas

6.2 Amostra

Este é um estudo retrospectivo, quantitativo e observacional. A amostra foi oriunda dos casos cadastrados e arquivados no serviço de Biopsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina (FAMED) e do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, ambos da Universidade Federal do Ceará.

Foi realizada uma busca ativa das lâminas histológicas e da descrição dos laudos histopatológicos desses casos para delineamento da amostra. Os casos previamente selecionados foram revisados por dois patologistas orais para verificação da qualidade de fixação e processamento do espécime, além da integridade dos blocos de parafina.

A amostra foi composta por 35 (trinta e cinco) casos, sendo definida como de conveniência. Este tipo de amostra é formada por elementos que o pesquisador reuniu simplesmente porque dispunha deles. São comuns na área de saúde, em que se fazem pesquisas com pacientes de uma só clínica ou de um hospital (GUIMARÃES., 2008).

A presença e a intensidade do infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário, e a preservação total ou parcial do epitélio de revestimento da cavidade cística foram os parâmetros histológicos utilizados para a determinação dos grupos. Os cistos radiculares intensamente inflamados e cistos radiculares levemente inflamados formaram os dois grupos teste. E os cistos dentígeros sem nenhuma evidência de inflamação na cápsula foram utilizados como grupo de comparação por ser um cisto indolente, com crescimento lento (VAZ *et al.*, 2010). Foram excluídos do estudo os casos de impossibilidade de localização do bloco de parafina. Casos em que a reação de imuno-histoquímica foi comprometida em consequência da falta de qualidade ou falhas de armazenamento dos blocos de parafina também foram descartados.

6.3 Protocolo experimental

Após revisão histológica, os grupos ficaram assim estabelecidos:

Grupo I - composto por cistos radiculares exibindo moderada ou intensa inflamação na cápsula e designado **Grupo cisto radicular intensamente inflamado com o n=17**. Na parede do cisto foi verificada presença de densos aglomerados de células inflamatórias histiolinfoplasmocitárias em meio a numerosos vasos sanguíneos ectásicos e/ou neoformados, por vezes com macrófagos espumosos e corpúsculos de Russel. Estes achados se distribuíam, predominantemente, na região subepitelial e se estendiam para o córion profundo.

Grupo II - representado por cistos radiculares com discreta inflamação na cápsula e designado **Grupo cisto radicular levemente inflamado com o n=9**. A cápsula cística era constituída por tecido conjuntivo fibroso exibindo raros vasos sanguíneos e raras células inflamatórias histiolinfoplasmocitárias dispersas localizadas na região subepitelial.

Grupo III - constituído e designado **Grupo cisto dentígero com o n=9**. Estes cistos eram representados por parede revestida por epitélio escamoso constituído por poucas camadas celulares sob o qual havia córion fibroso com ausência de elementos inflamatórios (SHEAR, M.; SPEIGHT, P. M. 2011). Não foram considerados diagnósticos de cistos dentígeros inflamados nem cistos foliculares.

6.4 Estudo imuno-histoquímico

Técnica de imuno-histoquímica

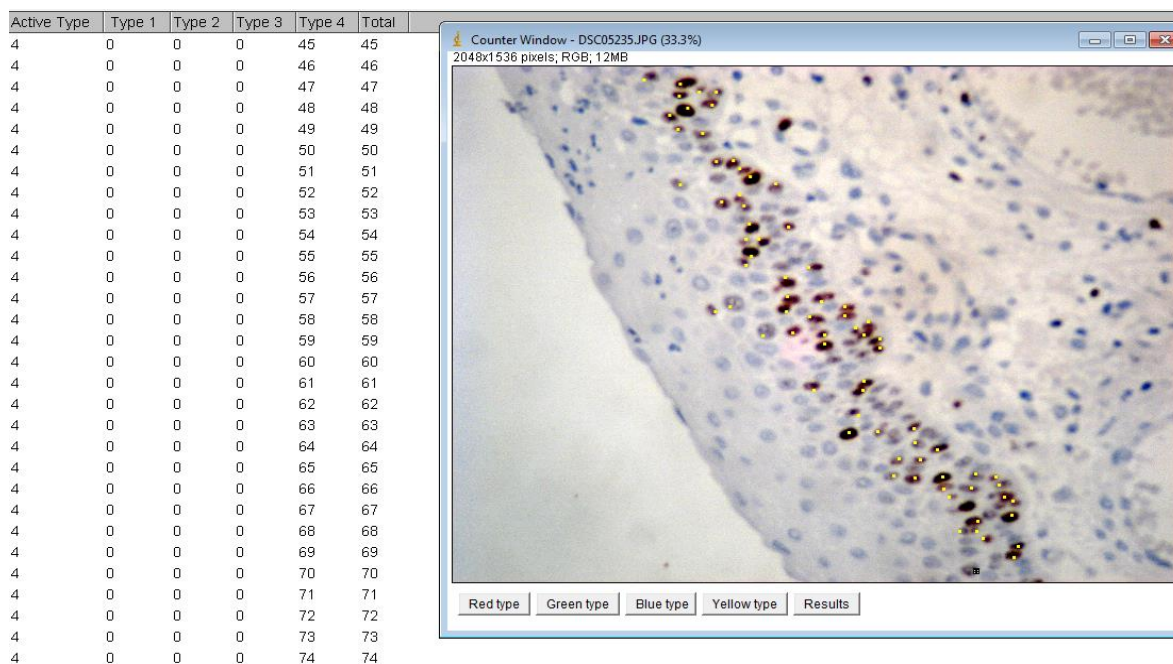
Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados em cortes histológicos de 3µm de espessura, dispostos em lâminas microscópicas silanizadas seguindo-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Os anticorpos primários foram utilizados com as seguintes diluições: Ki-67(Dako®) (1:50), laminina (DBS®) (1:20) e anticolágeno IV (DBS®) (1:40). As lâminas foram incubadas em estufa a 70°C por três horas e, após este período, foram desparafinizadas em xilol e gradiente de álcool. Primeiramente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena por incubação com solução de peróxido de hidrogênio (solução aquosa de

H₂O₂ a 10V), por quatro ciclos de cinco minutos. A recuperação antigênica para os anticorpos Ki 67 e anti-colágeno tipo IV foi realizada em banho maria (Petelik Dako®), durante trinta minutos, imersos em tampão citrato 0,01 mL, com pH 6,0. Já o anticorpo antilaminina foi submetido à digestão proteolítica com proteinase k a 5% por 60 minutos e sob a temperatura de 37°C. Os anticorpos primários (Ki-67 / LAM-89/ anticolágeno IV) foram incubados por 12 horas a 4°C em câmara úmida. Foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado seguido do complexo strepto-avidina-biotina-peroxidase, sendo revelado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako®,EUA) tendo o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a revelação, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harrys. Foram utilizados como controle interno positivo para as reações de colágeno tipo IV e da laminina, a imunomarcação em membrana basal dos vasos sanguíneos e como controle externo espécimes de granuloma piogênico. Para as reações imuno-histoquímicas com Ki 67, foram empregadas espécimes de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado como controle externo. No controle negativo foi utilizado o mesmo tecido de cada reação, sendo suprimido o anticorpo primário.

Análise histológica da expressão imuno-histoquímica do Ki 67

Para análise da proliferação celular, foram consideradas positivas todas as células que exibiram marcação nuclear para o anticorpo Ki-67, independentemente da intensidade da marcação, contadas em dez campos em aumento de 400X (KRUSE-LÖSLER *et al.*, 2006). O procedimento de contagem foi feito por um observador em dias diferentes, utilizando-se de um microscópio óptico OLYMPUS. Para a análise da imunomarcação, sob aumento total de 400x, foram capturadas imagens em dez campos de cada um dos casos, por meio de máquina fotográfica digital SONY 10.1 megapixels (Sony Corporation-Tokyo, Japan). As imagens obtidas foram analisadas, por meio do programa Image J (*Image and Processing Analysis in Java*- Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2004) (Figura 1), por um só observador, em momentos distintos. Em seguida foi realizada uma média dos campos marcados a partir de uma unidade da amostra e posteriormente uma média para cada grupo identificado.

Figura 1: Fotomicrografia mostrando o revestimento epitelial de cisto radicular com células marcadas com Ki-67 e evidenciadas pelo programa Image J. (HE 400X).



Análise histológica da expressão imuno-histoquímica da laminina

A análise da expressão imuno-histoquímica do componente laminina da membrana basal de cistos radiculares levemente inflamados (CRLI), cistos radiculares intensamente inflamados (CRII) e cistos dentígeros (CD) foi realizada utilizando-se microscópio óptico. Foi adotado o método semiquantitativo para graduação da intensidade de marcação bem como da integridade da expressão da laminina na membrana basal, de acordo com a metodologia adaptada de SHINOHARA *et al.* (1996) e KANANNAN *et al.* (1994). A intensidade de marcação foi graduada como negativo (0), discreta (1) e moderada (2).

Análise histológica da expressão imuno-histoquímica do colágeno IV

O padrão de expressão e distribuição imuno-histoquímica do componente da matriz extracelular colágeno IV nas secções de todos os casos de cistos radiculares levemente inflamados, cistos radiculares intensamente inflamados e cistos dentígeros foram realizados utilizando-se a microscopia óptica, tanto em membranas basais como em meio à matriz extracelular intersticial. Para a análise da expressão

imuno-histoquímica em membranas basais, foram considerados os parâmetros: intensidade e padrão de marcação. Para o parâmetro intensidade, os casos foram categorizados em: imunorreatividade positiva moderada (2), imunorreatividade positiva fraca (1) e imunorreatividade negativa (0). E para o parâmetro padrão de marcação, foram utilizadas as seguintes categorias: imunorreatividade contínua e imunorreatividade descontínua (SOUSA *et al.*, 2007).

Tabela 1: Parâmetros de análise microscópica utilizados na Lamina

Membrana basal	Intensidade
	Moderada (2)
	Discreta (1)
	Negativo (0)

Fonte: Adaptado de SHINOHARA *et al.* (1996) e KANNAN *et al.* (1994).

Tabela 2: Parâmetros de análise microscópica utilizados no colágeno tipo IV

Membrana basal	Intensidade
	Moderada (2)
	Fraca (1)
	Negativo (0)
	Padrão de marcação
	Contínua (1)
	Descontínua (0)
Matriz extracelular intersticial	Intensidade
	Moderada (2)
	Fraca (1)
	Negativa (0)

Fonte: Adaptado de SOUZA *et al.* (2007).

6.5 Análise estatística

Como os dados clinicopatológicos são variáveis qualitativas nominais, a Estatística descritiva compreendeu a determinação das frequências absolutas e relativas (%). O teste ANOVA/Tukey foi utilizado para comparar as médias de células marcadas por Ki-67 (expressos em forma de média \pm EPM) e o teste de Kruskal-Wallis/Dunn para comparação dos escores de marcação imunohistoquímica da laminina e do colágeno tipo IV (expressos em forma de mediana (mínima, máxima)). O nível de significância foi estabelecido em 5%, sendo, pois, considerado como estatisticamente significativo um valor p menor que 0,05 (GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®], GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2007).

6.6 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido para análise do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) sendo aprovado sob protocolo nº. 290/10.

7. RESULTADOS

7.1 Imuno-histoquímica

A imunomarcagem do epitélio com Ki-67 mostrou que a média do grupo CRII (cisto radicular intensamente inflamado) foi de 10.0 ± 1.3 e do CD(cisto dentígero) 5.4 ± 0.9 . Já o grupo CRLI (cisto radicular levemente inflamado) expressou média de 16.8 ± 3.1 , portanto um número superior de células marcadas no epitélio de revestimento cístico do grupo do CRLI foi identificado, com significância estatística, em relação aos demais grupos ($p < 0.05$, teste ANOVA/Tukey) (Tabela 3, Figura 2)

Relativamente à preservação da membrana basal do epitélio cístico, foi demonstrado que, no grupo dos cistos radiculares levemente inflamados, a mesma estava mais preservada, quando comparada com a do grupo dos cistos radiculares intensamente inflamados, com bastante descontinuidade visualizada pela marcação multifocal do colágeno tipo IV. Por vezes, neste último grupo, o epitélio se exibiu descamado e em lise. Inclusive, um caso de cisto radicular intensamente inflamado estava totalmente destituído de revestimento epitelial.

A intensidade de marcação do colágeno tipo IV na membrana basal dos três grupos analisados mostrou-se predominantemente fraca. No grupo CRII, a intensidade da expressão de colágeno tipo IV foi menos intensa com mediana 0, enquanto nos outros dois grupos foi 1 com diferença estatisticamente significativa do CRII em relação ao CRLI ($p < 0.05$, Teste Kruskal-Wallis/Dunn) (Tabela 3).

Com relação à continuidade da imunomarcação de colágeno tipo IV em membrana basal de epitélio cístico, no grupo dos cistos radiculares intensamente inflamados, esta expressão era mais descontínua, quando comparada com o grupo dos cistos radiculares levemente inflamados, com diferença estatisticamente significativa entre os dois padrões de marcação ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis/Dunn). A imunomarcação de membrana basal do cisto dentífero não diferiu significativamente do CRII ($p = 0.1338$, Kruskal-Wallis/Dunn), nem do CRLI ($p = 0.2465$, Kruskal-Wallis/Dunn) (Tabela 3).

No concernente à expressão de colágeno tipo IV na matriz extracelular, o cisto dentífero mostrou matriz extracelular menos intensamente marcada do que o CRLI ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis/Dunn). Não houve diferença significativa entre os dois tipos de cistos radiculares ($p = 0.3667$, Kruskal-Wallis/Dunn) (Tabela 3).

A marcação da laminina em membrana basal no grupo dos CRLI foi fraca e pontual com mediana 0 variando de 0 a 1 ($p = 0.4241$, Kruskal-Wallis/Dunn). Nos demais grupos CRII e CD a marcação foi negativa. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados. (Tabela 3).

Tabela 3: Intensidade e padrão de marcação imuno-histoquímica de colágeno IV (membrana basal e matriz extracelular), laminina (membrana basal) e Ki-67 (epitélio cístico) de cistos radiculares e dentígeros.

			Cisto Radicular Intensamente Inflamado	Cisto Radicular Levemente Inflamado	Cisto Dentígero	P-valor
Colágeno IV	Membrana Basal	Intensidade	0 (0,2)*	1 (1,2)	1 (1,2)	0.0445
		Continuidade	0 (0,1)*	1 (0,1)	0 (0,1)	0.0475
	Matriz Extracelular	Intensidade	1 (1,2)	1 (1,2)	1 (0,2)*	0.0246
Laminina	Membrana Basal	Intensidade	0 (0,0)	0 (0,1)	0 (0,0)	0.4241
Ki-67	Epitélio Cístico	Número de células marcadas	10.0±1.3†	16.8±3.1	5.4±0.9†	0.0040

*p<0.05 em relação ao cisto radicular levemente inflamado (Kruskall-Wallis/Dunn). Dados expressos em forma de mediana (mínima, máxima).

†p<0.05 em relação do cisto radicular levemente inflamado (ANOVA/Tukey). Dados expressos em forma de média±EPM.

Figura 2: Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de Ki-67 em Cisto radicular intensamente inflamado (A), Cisto radicular levemente inflamado (B) e Cisto dentígero (C). IHQ Estreptavidina-biotina. Aumento de 400X.

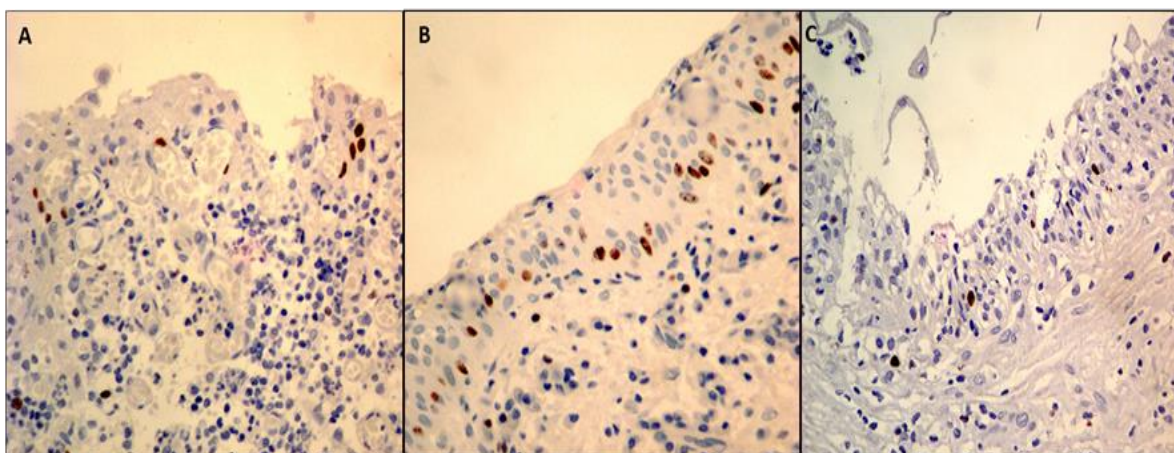


Figura 3 - Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de Colágeno tipo IV em membrana basal de cisto radicular intensamente inflamado (A), cisto radicular levemente inflamado (B) e cisto dentífero (C). IHQ Estreptavidina-biotina. Aumento de 400X.

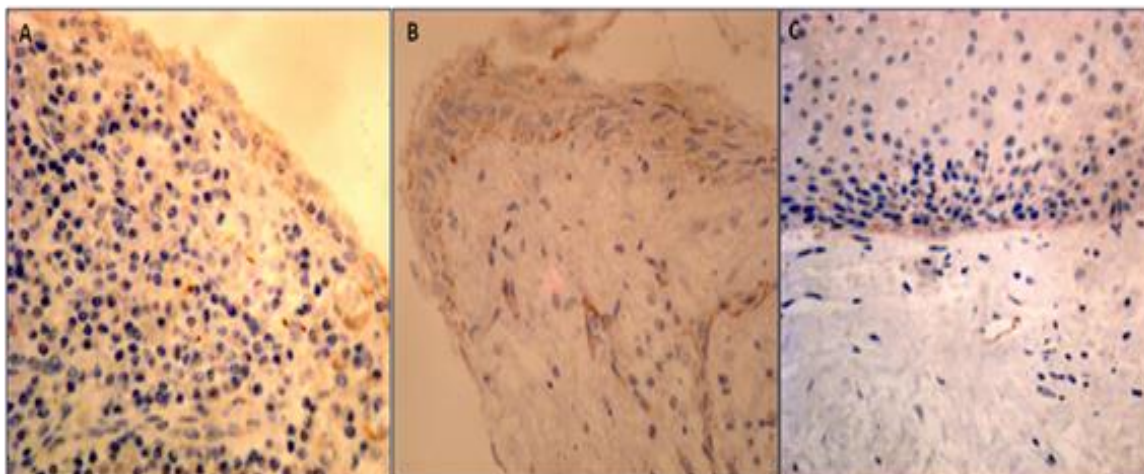
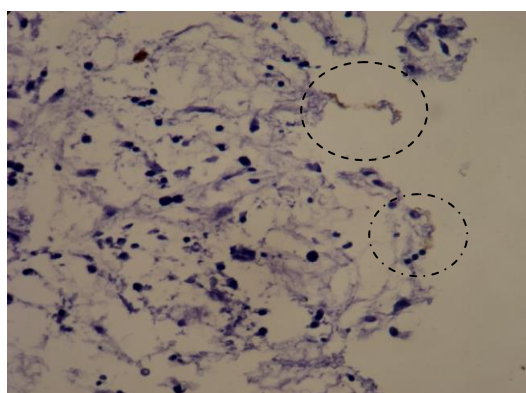


Figura 4 – Fotomicrografia mostrando fraca e pontual marcação de laminina em área descamada de epitélio de cisto radicular levemente inflamado. IHQ estreptavidina-biotina. Aumento de 400X.



8. DISCUSSÃO

A inflamação crônica é um fenômeno de longa duração, caracterizado pela infiltração de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e monócitos. Os macrófagos secretam uma grande quantidade de enzimas (colagenase, lipase), citocinas (IL-1, TNF e IL-8) e fatores de crescimento (PDGF, EGF e TGF- β) que atuam ativamente no processo inflamatório. Por outro lado, os linfócitos produzem as linfocinas (IFN- γ), que estimulam monócitos e macrófagos. Com efeito, a presença das enzimas proteolíticas pode ocasionar a degradação do colágeno na membrana basal e a destruição tecidual (BILATE, 2007; GÜLER, 2012).

Os dados obtidos em um estudo realizado por Ayoub *et al.*, (2011) com suporte na avaliação dos fatores relacionados à proliferação celular no epitélio de revestimento de cistos radiculares e dentígeros demonstraram que a expressão de Ki-67 no epitélio cístico foi maior na presença de intenso infiltrado inflamatório, sugerindo que o aumento da atividade proliferativa de cistos radiculares e dentígeros seria influenciado diretamente pela presença da inflamação em diferentes intensidades. Estes dados divergem dos resultados do presente trabalho onde a proliferação do epitélio cístico foi maior no grupo de cisto radicular levemente inflamado. Sabe-se que o cisto radicular é uma entidade inflamatória, portanto infere-se que, talvez, a presença de discreto conteúdo inflamatório seria suficiente para estimular o crescimento epitelial através da liberação de fatores de crescimento sem, contudo, agredir diretamente o epitélio, como visualizado em certos casos do grupo de cistos radiculares intensamente inflamados.

Outro trabalho, realizado por Willoughby *et al.*, (1986) obteve resultados concordantes com os resultados do presente trabalho pois em lesões inflamatórias produzidas na mucosa bucal, constatou-se que nas lesões inflamatórias leves ocorreria a proliferação epitelial e nas lesões inflamatórias mais intensas a proliferação epitelial seria deprimida, provavelmente em razão de danos mais extensos ocorridos nas células progenitoras.

O cisto dentígero exibe no revestimento epitelial poucas camadas de células. Portanto, sob o ponto de vista quantitativo, a marcação de Ki-67 pode ser

inferior a outras lesões líticas. Neste estudo, a quantidade de células marcadas foi menor quando comparada aos outros dois grupos. Alguns trabalhos (OLIVEIRA *et al.*, 2011; LIMA, 2003) avaliaram, com o uso do Ki-67, o perfil da proliferação celular do cisto dentígero e do ceratocisto, mostrando que a taxa de proliferação epitelial do cisto dentígero foi bem menor quando comparada a outra entidade.

A avaliação da membrana basal em nosso estudo demonstrou que, no CRLI (cisto radicular levemente inflamado), ocorre sua preservação. Talvez este achado decorra do fato de que o conteúdo inflamatório é pequeno neste cisto e produza pouca agressão na membrana basal, preservando a integridade do epitélio cístico. No cisto dentígero, a intensidade de marcação da membrana basal foi semelhante à do cisto radicular pouco inflamado, o que sugere a manutenção da membrana basal nesta lesão, com ausência de inflamação. Fortalecendo esta teoria, foi observado nos cistos radiculares intensamente inflamados um epitélio descamado, às vezes sem continuidade ou mesmo ausente. O trabalho realizado por (PULHEZ., 2004) foi concordante com o nosso estudo pois observou que em lesões com infiltrado inflamatório mais intenso a membrana basal tendeu a apresentar-se menos íntegra enquanto que lesões com o infiltrado inflamatório escasso esta estrutura apresenta-se mais espessa e com marcação mais intensa.

Soares *et al.*, 2007 avaliou a expressão de metaloproteinases (MMPs) em cistos radiculares com diferentes intensidades inflamatórias. Concluiu que, nos cistos radiculares, a existência de processos patológicos mediados por células inflamatórias está sujeita a variações em sua intensidade, que pode interferir na expressão das proteinases capazes de degradar componentes da membrana basal e da matriz extracelular.

No cisto radicular (leve e intensamente inflamado), em nosso estudo a intensidade de marcação do colágeno IV na matriz extracelular foi menor quando comparado ao cisto dentígero. Além disso, o padrão desta marcação foi mais contínuo no cisto radicular pouco inflamado. Talvez a presença das colagenases e outras substâncias, como as metaloproteinases liberadas pelo conteúdo inflamatório, possam interferir na deposição de colágeno tipo IV de acordo com a intensidade de conteúdo inflamatório nos cistos radiculares (QUINDERÉ., 2008). Adicionalmente,

não se pode descartar a influência dos diferentes níveis de inflamação na deposição de outros tipos de colágeno. Estes achados estão de acordo com o trabalho de Oliveira *et al.*, (2002), onde afirmam que quando o padrão de descontinuidade do colágeno tipo IV esteve presente em cistos radiculares e dentígeros, geralmente associava-se este achado com a presença de inflamação.

Com relação à intensidade de marcação da laminina em membrana basal no grupo dos cistos radiculares (leve e intensamente inflamados) a marcação ocorreu apenas no grupo dos cistos radiculares levemente inflamados, de forma fraca e focal. A fraca marcação verificada neste grupo e a ausência de marcação encontrada no grupo dos cistos radiculares intensamente inflamados podem ser justificadas pela presença do infiltrado inflamatório justa-epitelial, pois, segundo Abrahamson, (1986), alterações na integridade da membrana basal poderiam ocorrer em consequência da ação de enzimas proteolíticas elaboradas por células inflamatórias. O trabalho de OLIVEIRA *et al.*, (2002) também confirma que dentre os cistos radiculares avaliados, quando o infiltrado inflamatório (mesmo intenso) encontrava-se distante do epitélio, a expressão de laminina era mais intensamente marcada. Por outro lado, quando comparada ao grupo cujo infiltrado inflamatório variava de moderado a intenso e estava localizado em áreas da cápsula em íntima relação com o epitélio, estes exibiram marcação descontínua e moderada.

Outro importante estudo que avaliou a expressão de laminina em cistos radiculares foi o de Ayoub *et al.*, (2011). Dentro de um universo de 13 cistos radiculares, dez casos apresentaram imunopositividade para laminina-1 na membrana basal e três casos tiveram imunomarcação negativa para laminina-1; nestes casos, a inflamação era intensa na parede do tecido conjuntivo dos cistos. Estes resultados estão de acordo com Furuyana *et al.*, (2008), quando afirmou em seu estudo avaliativo do papel da IL-1 β e TNF- α na formação da membrana basal, que a capacidade das células epiteliais em formar membrana basal contínua é perdida na presença de citocinas inflamatórias, responsáveis pelo aumento da secreção das metaloproteinases da matriz (MMP-9) e (MMP-2). Estes dados corroboram os resultados do presente trabalho onde apenas no grupo dos cistos radiculares levemente inflamados houve a marcação de laminina.

Um fator importante a ser considerado quando ocorrem divergências entre os estudos que avaliaram a expressão de laminina, segundo Gurgel et al., (2010) é a utilização de métodos imuno-histoquímicos diferentes. OLIVEIRA., *et al* (2002) utilizou o método da estreptavidina biotina com pepsina a 1% na temperatura de 37° C por 60 minutos e encontrou como resultado na maioria dos cistos radiculares um padrão de marcação linear e descontínuo. Poomsawat., *et al* (2006) utilizaram o método da estreptavidina biotina com pepsina a 0,4% a 37° C por 60 minutos e obtiveram uma marcação linear e contínua na maioria dos cistos radiculares. O presente estudo utilizou a mesma técnica, porém com Proteinase K a 5% na temperatura de 37° C por uma hora e obteve a marcação da laminina somente no grupo dos cistos radiculares levemente inflamados, sendo esta fraca e focal.

A perda da laminina segundo Garcia *et al.*, (2006), pode ocorrer de forma gradual, à medida em que uma lesão aumenta o seu grau de malignidade. Aggarwal., *et al* (2011) relatam um caso de carcinoma mucoepidermoide central oriundo de um cisto dentígero e enfatizaram o crescimento agressivo e o potencial neoplásico deste cisto. A ausência de marcação do cisto dentígero pode ser justificada por este fato, ou, segundo Brannor., (1977) e Browne., (1971), podem ocorrer falhas no mecanismo de controle da degradação dos componentes da membrana ou mesmo falhas na síntese destes componentes. Desta forma, estes dados podem justificar a ausência de marcação observada no grupo de cisto dentígero.

Assim o conteúdo inflamatório na parede dos cistos radiculares parece influenciar na expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, apesar de não ter sido observada relação positiva entre o aumento da intensidade da inflamação e a expressão deste anticorpo. Sugere-se que o denso acúmulo de células inflamatórias mononucleares na parede desses cistos possam ocasionar danos diretos nas células epiteliais. Além disso verificou-se melhor preservação de colágeno tipo IV e de laminina na membrana basal de cistos com paredes levemente inflamados.

Novos estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar e/ou correlacionar este padrão de proliferação celular com infiltrado inflamatório presente nas cápsulas císticas. As interações celulares entre o epitélio e os componentes da membrana basal, incluindo o estudo dos outros tipos de colágeno também deverão ser avaliadas. Talvez, esta elucidação possa contribuir para o entendimento da variação biológica de ocorrência de lesões císticas radiculares ora circunscritas ora de grandes extensões.

9. CONCLUSÕES

1. A presença e a intensidade do conteúdo inflamatório na parede dos cistos radiculares parecem modificar a expressão dos fatores de proliferação no epitélio de revestimento cístico, sendo esta maior nos cistos radiculares levemente inflamados.
2. A expressão de componentes da membrana basal, laminina e colágeno tipo IV é maior nos cistos radiculares com leve infiltrado inflamatório.
3. A intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear parece não interferir no comportamento do colágeno tipo IV da matriz extracelular nos cistos radiculares.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, D.R. Recent studies on the structure and pathology of basement. **J. Pathol.** V. 129. P.257 - 278. 1986
- AGGARWAL, P; SAXENA, SUSMITA, S. Agressive growth and neoplastic potential of dentigerous cysts with particular reference to central mucoepidermoid carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** .v.49 .n.6 p.36-39. 2011.
- AGUILO, L.; GANDIA, J. L. Dentigerous Cyst of mandibular second premolar in a five-year- old girl, related to a non-vital primary molar removed one year earlier: a case report. **J. Clin. Pediatric Dent.**, v. 22, p. 155-158, 1998.
- ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula. In: ALBERTS, B. *et al.* **Junções celulares, adesão celular e a matrix intracelular**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004. cap. 19.
- AL-TALABANI, N. G.; SMITH, C. J.Experimental dentigerous cysts and enamel hipoplasia: their possible significance in explaining the pathogenesis of human dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 82-91, 1980.
- ANAVI, Y.; GAL, G.; MIRON, H.; CALDERON, S.; ALLON, D. M. Descompression of odontogenic cystic lesions: Clinical long-term study of 73 cases. **Oral Surg. Oral Med.Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.112, n. 2, p. 164-169, Aug. 2011.
- ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. Marcadores biológicos: PCNA e KI-67 - breve revisão. **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v.2, n.1, p.54-60, jan./jun.1999.
- AVELAR, R. L.; ANTUNES, A. A.; CARVALHO, R. W. F.; BEZERRA, P. G. C.; OLIVEIRA NETO, P. J.; ANDRADE, E. S. S. Odontogenic Cysts: a clinicopathological study of 507 cases. **J. Oral Sci.**, v. 51, n. 4, p. 581-586, 2009.
- AYOUB, M. S.; BAGHDADI, H. M.; EL-KHOLY, M. Immunohistochemical detection of laminin-1and Ki-67 in radicular cyst and keratocystic odontogenic tumors. **BMC Clin. Pathol.**, v.11, n.4, Mar. 2011.
- BABÁL, P.; SOLER, P.; BROZMAN, M.; JAKUBOUSKY, J.; BEYLY, M.; BASSET, F. In situ characterization of cells in periapical granuloma by monoclonal antibodies. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 64, p. 348-352, 1987.
- BANERJEE, M.; VIRTANEN, I.; PALGI, J.; KORSGREN, O.; OTONKOSKI, T. Proliferation and plasticity of human beta cells on physiologically occurring laminin isoforms. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v. 355, n.1, p.78-86, 2012.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.8, n.2, jun. 2007.

BIRGIT, KRUSELÖSLER;RAIHANATOU, DIALLO;CHRISTOPH, GAERTER;KARL-LUDWIG, MISCHKE;ULRICH, JOOS;JOHANNES, KLEINHEINZ. Central giant cell granuloma of the jaws: A clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology** Volume 101, Issue 3 , Pages 346-354, March 2006.

BORGES, L.B.; FECHINE, F.V.; MOTA, M.R.L.; SOUSA, F.B.; ALVES, A.P.N.N. Odontogenic Lesions of the Jaw: a clinical- pathological study of 461 cases. **RGO-Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v.60, n.1, p.71-78, Jan./Mar. 2012.

BRACKS, I. V. **Análise da distribuição quantitativa de mastócitos e macrófagos e da expressão da interleucina-6 em lesões periradiculares inflamatórias**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2012.

BRANNON RB. The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases Part II. Histologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; v. 43, n.2 p. 233-55, 1977.

BROWNE RM. The odontogenic keratocyst: histological features and their correlation with clinical behavior. **Br Dent J**; v. 131, p.249-59, 1971.

CARVALHO, R.W.F.; AVELAR, R.L.; ARAÚJO, F.A.C.; ANDRADE, S.E.S.; LAUREANDRO FILHO, J. R.; VASCONCELOS, B. C. E. Cisto Dentígero: Um estudo epidemiológico de 192 casos. **Pesq. Brasileira.Odontopediatria Clín. Integrada**, João Pessoa, v. 11, n. 3; p. 335-339, jul./set. 2011.

CAKARER, S. *et al.* Decompression, enucleation, and implant placement in the management of a large dentigerous cyst. **J. Craniofac. Surg.**, v. 22, n. 3, p. 922-924, May 2011.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, v. 218, n. 2, p. 213-234, June 2000.

CONSOLARO, A.; RIBEIRO, F. C. Periapicopatias: etiopatogenia e inter-relação dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: LEONARDO, M.R.; LEAL, J. M. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. 3. ed. São Paulo: Panamericana, 1998

CRUVINEL, W. D.; MESQUITA JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUSA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário- Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e

celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 4, p.434-461, 2010.

DELLA COLLETA R, JORGE JUNIOR J, LOPES MA, *et al.* Expressão de laminina no germe dental do primeiro molar de ratos em desenvolvimento. **RPG**. V.4. P. 87-92. 1997.

EL-GEHANI, R.; ORAFI, M.; ELARBI, M.; SUBHASHRAJ, K. Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: A study of 405 cases. **J. Cranio-Maxillofac. Surg.**, v. 37, p. 370-375, 2009.

ENGBRING, J.A, KLEINMAN, H.K. The basement membrane matrix in malignancy. **J. Pathol.** Jul; 200(4): 465-70, 2003.

FIGUEIREDO, L. S. **Tratamento conservador de tumor odontogênico cístico calcificante**: revisão de literatura. Monografia (Graduação) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FONATSCH, C.; DUCHROW, M.; RIEDER, H. Assignment of the human Ki-67 genes (MK 167) to 10q25-qter. **Genomics**, v. 11, n.1 p. 476-477, 1991.

FREITAS, A.; ROSA, J. E.; SOUSA, I. F. **Radiologia odontológica**. 5. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

FREITAS, D. Q.; MONTEBELLO FILHO, A.; ALMEIDA, S. M.; BÓSCOLO, F. N. Displasia cemento-óssea florida: relato de dois casos com diferentes condutas. **Revista Mineira de Estomatologia**, v.1, n.5, p.6-11, 2006.

FUKADA, S. Y.; SILVA, T. A.; GARLET, G. P.; ROSA, A. L.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, n.1, p. 25-31, fev. 2009.

FURUYAMA A, TAKESHI HOSOKAWA T, MOCHITATE K: Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α have opposite effects. **Matrix Biology**. V.27. P.429-440. 2008.

GARCIA, A.S; HERNÁNDEZ, M.M.A; SÁNCHEZ, E.F; GONZALEZ, R.J; VILLARDÓN, P.G; HERNÁNDEZ, J.J.C; SOPELANA ,A.B. E-cadherin, laminin and colagem IV expression. In the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. V.11. P.100-5. 2006.

GARAY, H. M.; ALVES, J.; OCHIUCCI, J. M.; BELIZÁRIO, J. E. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. **Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenvol.**, v. 30, p.60-70, jan./jun. 2003.

GONZÁLEZ S, PÉREZ-COTAPOS ML, BOLTE C, et al. Avances en la estructura y función de la membrana basal. **Dermatol Chile**. V.10. P. 181-4. 1994.

GROSSMANN, S. M.; MACHADO, V.C.; XAVIER, G. M.; MOURA, M. D.; GOMEZ, R.S.; AGUIAR, M.C.F.; MESQUITA, R. A. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in Brazilian population. **Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 104, p. e 35-41, 2007.

GUEDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol.**, v.133, n.4, p.1710-1715, Oct. 1984.

GUIMARÃES, PAULO RICARDO BITTENCOURT. Métodos Quantitativos Estatísticos. 1ª Edição. Ed. Iesde Brasil. P.18, 19. 2008.

GÜLER, N.; ÇOMUNOĞLU, N.; CABBAR, F. Ki-67 and MCM-2 in dental follicle and odontogenic cyst: the effects of inflammation on proliferative markers. **Scientific World Journal**, v.2012, n.1, p.1-8, Feb./Apr. 2012.

GURGEL, C.A.S; RAMOS,E.A.G; MELO, L.A; SCHLAUPFER, C.B; SOUSA, R.O; OLIVEIRA, M.C. Immunolocalisation of laminin-1 in keratocystic odontogenic tumors. **Acta Histochemica**. V.112. P. 624-629. 2010

HEHN, J.F. Elementos básicos da inflamação. **Rev. Bras. Med.**, v.12, n.4, ago. 2011.

JONES, A. V.; CRAIG, G. T.; FRANKLIN, C. D. Rang and Demographics of Odontogenic Cyst Diagnosed in a UK Population Over a 30 – year Period. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 35, p. 500-507, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KALASKAR, R.R.; TIKU,A.; DAMLE, S. G. Dentigerous cyst of anterior maxilla in a young child- A case report. **J. Indian Soc. Ped. Prev. Dent.**, v. 25, p.187-190, 2007.

KANNAN, S.; BALARAM, P.; CHANDRAN, G.J.; PILLAI, M.R.; MATHEW, B.; NALINAKUMARI, K.R. et al. Alterations in expressions of basement membrane proteins during tumor progression in oral mucosa. **Histopathology**, v.24, n.6, p.531-537, June 1994.

KARAMMANIS, S; T.KITHARAS; TSOUKALAS, D, et al. Implant placement after marsupialization of dentigerous cyst. **J Oral Implantol**. V.32. P. 313-136. 2006.

KICH, E.; ENOKIYA, Y.; MURAMASTU, T.; HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; ABIKO, Y. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factor in odontogenic Keratocysts and dentigerous cyst. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 280-286, 2005.

KRUSE-LOSLEDER, B.; DIALLO, R.; GAERTNER, C.; MISCHKE, K.L.; JOOS, U.; KLEINHEINZ, J. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.101, n.3, p.346-354, Mar. 2006.

KUMAMOTO, H.; YAMAUCHI, K.; YOSHIDA, M.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n.2, p.114-120, 2003.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. K. **Robbins e Cotran: patologia - bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, n.9, p.1121-1129, Oct. 2007.

LEVINE, A. J.; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 69, n.3, p. 409-416, Mar. 1994.

LIMA, G. M. **Análise Imunohistoquímica de Marcadores de Proliferação Celular e da P53 em Cistos Dentígeros, Queratocistos e Ameloblastomas unicísticos**. 2003. 79 f. Tese (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

LIN, L.M.; HUANG, G.T.; ROSENBERG, P.A. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cyst, and regression of apical cyst after periapical wound healing. **J. Endod.**, v.33, n.8, p. 908-916, 2007.

LIOTTA, L. A. Tumor invasion and metastases: role of basement membrane. **Am. J. Pathol.**, v. 117, n.3, p. 339-348, 1984.

MANOR, E.; BRENNAN, P. A.; BODNER, L. Cytogenetic of jaw cysts- a pilot study. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 50, p. 440-442, 2012.

MARTINS, C. A. **Deteção Imunohistoquímica de Fatores Relacionados à Proliferação Celular e ao Mecanismo da Apoptose em cistos Radiculares e Dentígeros**. 2009. 67 f. Tese (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MARTINS FILHO, P. R. S.; BRASILEIRO, B. F.; PIVA, M. R.; SILVA, L. C. F.; REINHEIMER, D. M.; MARZOLA, C. Cisto radicular na maxila relato de um caso clínico cirúrgico. **Revista Ato**, v. 40, p. 881-889, 2009.

MEGHI, S.; QURESHI, W.; HENDERSON, B.; HARRIS, M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch. Oral Biol.**, v. 41, n. 6, 1996.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; CRUVINEL, W.M. Aspectos Celulares e moleculares da inflamação. **Rev. Bras. Med.**, v.12.n.3 p. 66-81, 2010.

MOTTA JÚNIOR, A. G.; FIDEL, R. A. S.; FIDEL, S. R. Tratamento Endodôntico com lasertaerapia de lesão cística de grande volume na mandíbula- relato de caso. **Rev. Sul- Bras. Odontol.**, v. 6, n. 3, p. 316-320, set. 2009.

MOTAMEDI, M.H; TALES, K.T. Management of extensive dentigerous cyst . **Br Dent J** . V. 198. P. 203-206. 2005.

MUGLALI, M.; KOMERIK, N.; BULUT, E.; YARIM, G.F.; CELEBI, N.; SUMER, M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. **J. Oral Pathol. Med.**, v.37, n.3, p.185-189, Mar. 2008.

NANAMI, R.; SAMPAIO, C.; OLIVETE, J.; PIZZATTO, E.; MORESCA, R.; GIOVANINI, A. F. Prevalência de cistos maxilares diagnosticados em centro de referência brasileiro. **Rev. Sul-Brasileira de Odontologia**, v.6, n.2, p.143-146, jun. 2009.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia oral e maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2009.

OCHSENIUS, G.; ESCOBAR, E.; GODOY, L.; PEÑAFIEL, C. Odontogenic Cyst : Analysis of 2.944 cases in Chile. **med. oral patol. oral cir. bucal**, v. 12, n. 2, 2007.

OLIVEIRA, M. D. C.; SOUZA, L. B.; PINTO, L. P.; FREITAS, R. A. Estudo imuno-histoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos. **Pesqui. Odontol. Brasil.**, v.16, n.2, p.157-162, abr./jun. 2002.

OLIVEIRA, M.G.; LAUXEN, I.S.; CHAVES, A.C.M.; RADOS, P.V.; SANT'ANA FILHO, F. Odontogenic Epithelium: Immunolabeling of Ki-67, Egfr, and Survivin in Pericoronal Follicles, Dentigerous Cysts and Keratocystic Odontogenic Tumors. **Head Neck Pathol.**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

PASSI, S.; GAUBA, K.; AGNIHOTRI, A.; SHARMA, R. Dentigerous cyst in primary dentition: a case report. **J. Indian Soc. Pedod. Prev.Dent.**, v. 26, p.168-170, 2008.

PETERSON, L.J.; ELIS, E.; HUPP, J. R.; TUCKER, T.R. **Oral and maxillo Facial sugery**. St. Louis: Editora Mosby, 1998.

PIATTELLI, A.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; FAVERO, G. A.; STROCCHI, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF- beta 1) in odontogenic cysts. **Int. Endod. J.**, London, v. 37, n.1, p.7-11, Jan. 2004.

PIANTELLI, A.; ARTESEL, L.; ROSINI, S.; QUARANTA, M.; MUSIANI, P. Immune cells in periapical granuloma: Morphological and Immunohistochemical Characterization. **J. Endod.**, v.17, p: 26-29, n. 1, Jan. 1991.

PINHO, M. S. L. Como as proteínas regulam a proliferação celular? **Rev. Bras. Coloposcopia**, v.19, n.3, p.223-225, 1999.

POOMSAWAT, S.; PUNYASING, J.; WEERAPRADIST, W. Expression of basement membrane components in odontogenic cyst. **Oral Dis.**, v.12, n.3, p.290-296, May 2006.

PROCKT, A.P.; SCHEBELA, C.R.; MAITO, F.D.M.; SANT'ANA-FILHO, M.; RADOS, P.V. Odontogenic Cysts: Analysis of 680 cases in Brazil. **Head Neck Pathol.**, v. 2, p.150-156, 2008.

PULHEZ, D.A. **Análise imunohistoquímica de granulomas periapicais, cistos radiculares e cistos residuais.** 2004. 53 f. Tese (Mestrado em Estomatologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. São Paulo. 2004.

QUINDERÉ, L.B.; NONAKA, C.F.W.; SOUZA, L.B.; PINTO, L.P. Expressão imunohistoquímica de colágeno IV, tenascina-C e fibronectina em lesões centrais e periféricas de células gigantes. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, v. 26, n. 2, p. 226-231, 2008.

RAMALHO, L. M. P.; YURGEL, L. S.; MACHADO, D. C.; SANT'ANA FILHO, M. Expressão imuno-histoquímica da ciclina D1, Ki-67 e PCNA em carcinomas espinocelulares de boca: análise comparativa da zona central e da zona de invasão tumoral. **Rev. Odonto Ciência**, v.15, n.31, p.71-86, dez. 2000.

RAPPOLEE, D. A; BRENNER, C. A., SCHULTZ, R., MARK, D; WERB, Z. Developmental expression of PDGF, TGF-a, and TGF-b genes in preimplantation mouse embryos. **Science**. V.241. P. 1823-1825.1988.

ROBLETO, G.B.V. Linfócitos. **Rev. Fac. Med. UNAM**, v. 52, n.6, nov./dez, 2009.

RIBEIRO JR., P. D.; GONÇALVES, E. S.; SIMIOLI NETO, E.; PACENKO, M. R. Abordagens cirúrgicas do cisto periodontal apical: considerações sobre qual técnica utilizar. **Revista SalusVita**, Bauru, v.23, n.2, p. 303-316, 2004.

ROCHA, D. A. P.; SOUZA, L. B.; PINTO, L. P. Análise comparativa da proliferação celular entre carcinomas de células orais HPV-positivos e HPV-negativos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43, n.4, p. 269-274, ago. 2007.

RUIZ, P. A.; AMORIM, R. F. B.; SOUZA, L. B.; CARVALHO, R. A. Fatores relacionados à regressão não-cirúrgica dos cistos radiculares. **Rev. Bras. Patol. Oral.**, v.2, n.1, p.49-56, jan./mar. 2003.

SANDHU, S. V.; NARANG, R. S.; JAWANDA, M.; RAI, S. Adenomatoid odontogenic tumor associated with dentigerous cyst of the maxillary antrum: a rare entity. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v.14, n.1, p.24-28, Jan./June 2010.

SANTOS, L. C. S.; RAMOS, E. A. G.; MEIRA, T. M.; FIGUEIREDO, C. R. L. V.; SANTOS, J. N. Etiopatogenia do cisto radicular. Parte I. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.5, n.1, p.69-74, jan./abr. 2006.

SANTOS, L.S.S.; AZEVEDO, R.A.; MEIRA, T.U.; RAMOS, E.A.G.; FIGUEIREDO, C.R.C.U.; SANTOS, J. N. Etiopatogenia do Cisto Radicular. Parte II. **R. Cienc. Méd. Biol.**, Salvador, v.8, n.2, p. 219-224, maio/ago. 2009.

SAUAIA, T. S.; PINHEIRO, E. T.; IMURA, N.; ZAIA, A. A. Cistos peri-radulares: uma proposta de tratamento. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v.48, n.3, p.130-134, jul./set. 2000.

SCOOT, R.E. Differentiation, differentiation/gene therapy and cancer. **Pharmacol. Therap.**, v.73, n.1, p.51-65, 1997.

SELVAMANI, M.; DONOGHUE, M.; BASANDI, P.S. Analysis of 153 cases of odontogenic cysts in a South Indian Sample Population: a retrospective study over a decade. **Braz. Oral Res.**, v. 26, n. 4, p. 330-334, 2012.

SHARIFIAN, M. J.; KHALILI, M. Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007. **J. Oral Sci.**, v.53, n.3 p. 361-367, 2011.

SHEAR, M.; SPEIGHT, P. M. **Cistos da região bucomaxilofacial**. 4ª. ed. 228p. São Paulo: Editora Santos, 2011.

SHEAR, M. **Cysts of the oral regions**. 3rd ed. Oxford: Ed. Wright, 1992.

SHINOHARA, M.; NAKAMURA, S.; HARADA, T.; SHIMADA, M.; OKA, M. Mode of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma: improved grading based on immunohistochemical examination of extracellular matrices. **Head Neck**, v.18, n.2, p.153-159, Mar./Apr.1996.

SILVEIRA, E. J. D.; PIVA, M. R.; GALVÃO, H.C.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43, n.3, p.203-209, jun. 2007.

SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; AMADEI, S.U.; CARMO, E.D.; CARVALHO, Y. R. Cisto Dentígero inflamatório relacionado a dente permanente: considerações etiopatológicas. **Rev. Odontol. Unesp**, v. 38, n. 3, p.143-147, 2009.

SOARES, A.F.; LEMOS, J.C.; GALVÃO, H.C.; FREITAS, R.A.; SOUZA, L.B. Expressão das MMPs-1, -2 e -9 em cistos radiculares com ou sem tratamento endodôntico. **Odontol. Clín.-científica**, v. 6, n.3, p. 249-254, set. 2007.

SOARES, J.; SANTOS, S; SILVEIRA, F. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. **Int. Endod.J.**, v.39, n.7, p. 566-575, 2006.

SOUZA, L. F. P.; SOUZA, V. F.; SILVA, L. D. G.; SANTOS, J. N. Expressão da laminina na membrana basal em carcinoma escamocelular oral. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.73, n. 6, p. 768-774, nov./dez. 2007.

SOUZA, L.P; NÚÑEZ, M.A.G; NONAKA, C.F.W; MEDEIROS, M.C.; TORRES, T.F.; EMILIANO, G.B.G. Odontogenic Cysts: Demographic Profile in Brazilian Population over a 38- Year Period. **Med. Oral. Patol. Cir. Bucal**, v. 15, n. 4, p. 583-590, 2010.

THOSAPORN, W.; IAMAROON, A.; PONGSIRIWETS, A comparative cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized, odontogenic cyst, dentigerous cyst and ameloblastoma. **Oral Dis.**, v. 10, n.1, p.22-26, 2004.

VASCONCELOS, R.G.; QUEIROZ, L. M. G.; ALVES JÚNIOR, L. C.; GERMANO, A. R.; VASCONCELOS, M.G. Abordagem Terapêutica em Cisto Radicular de Grandes Proporções- Relato de Caso. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v.16, n. 3, p. 467-474, 2012.

VIEIRA, F. L. D.; GUIMARÃES, M. A. M.; AARESTRUP, F. M.; VIEIRA, B. J. Avaliação do índice proliferativo de Ki-67 em amostras de carcinoma de células escamosas da mucosa bucal e correlação com a graduação histológica. **Odontol. Clín.-Científica**, Recife, v.8, n.4, p.359-363, out./dez. 2009.

VIER, F.V.; FIGUEIREDO, J.A.P. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. **Int. Endod. J.**, London, v.35, n.8, p.710-719, ago. 2002.

WALDRON, C. A.Odontogenic cysts and tumors. In: NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Oral and maxillofacial pathology**. Philadelphia: Saunders, 2002. p. 589-609.

WILLOUGHBY, S.G; HOPPS, R.M; JOHNSON, N.W. Changes in the rate of Epithelial Proliferation of rat oral mucosa in response to acute inflammation induced by turpentine. **Archs Oral Biol**. V.31. N. 3.P. 193-199. 1986.

ZUCCARI, D. A. P. C.; CASTRO, R.; JARDIM, B.V.; MANCINI, U.M.; POLACHINI, G.M. Immunohistochemical and molecular expression. of lamminin-332 gamma-2 chain in canine mammary tumors. **Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.1, p.28-35, 2011.

ANEXO 1 – Protocolo do Comitê de Ética



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 320/10

Fortaleza, 20 de dezembro de 2010

Protocolo COMEPE nº 290/ 10

Pesquisador responsável: Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Título do Projeto: “Estudo da expressão de fatores de proliferação celular e de componentes da membrana basal em lesões periapicais”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 09 de dezembro de 2010.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO 2 – Declaração da Academia Cearense da Língua Portuguesa

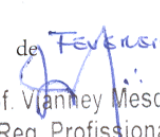


ACADEMIA CEARENSE DA LÍNGUA PORTUGUESA

DVLCISONAM ET CANORAM LINGVAM CANO

Declara-se, para constituir prova junto ao (à) PROG. MESTRADO EM PATOLOGIA
do (da) FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ,
que, por intermédio do acadêmico titular infra-assinado, foi procedida à correção gramatical e estilística
do (da) DISSERTAÇÃO intitulado (da) "EST. DA REL. DO INFILT. INFLAMAT.
MONON. E EXPRESSÃO DE Ki-67, Cdx. IV E LAMININA EM CISTOS RADIOMAIRES",
da autoria de RENATA VERA CARVALHO MOURÃO OYA,
orientado (a) pelo (a) PROF.ª DR.ª ANA PAULA NEGREIROS NUNES ALVES,
razão por que se firma a presente, a fim de que surta os efeitos legais, nos termos do novo Acordo Orto-
gráfico Lusófono, vigente desde 01.01.2009.

Fortaleza, 07 de Fevereiro de 2013


Prof. Vianney Mesquita
Reg. Profissional
CE 00489 JP

Prof. João VIANNEY Campos de MESQUITA
Acadêmico Titular da Cadeira número 37 da ACLP.
Escritor e docente Adjunto IV da Universidade Federal do Ceará
Reg. Prof. MTE00489JP.