ALEXANDRE MEIRELES BORBA

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE BIOLÓGICA DO
TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO
EM DIFERENTES MOMENTOS**

São Paulo

2008

Alexandre Meireles Borba

**Avaliação da estabilidade biológica do tumor odontogênico
queratocístico em diferentes momentos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Marília
Trierveiler Martins

São Paulo

2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Borba, Alexandre Meireles

Avaliação da estabilidade biológica do tumor odontogênico queratocístico em diferentes momentos / Alexandre Meireles Borba; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2008.

56p.: fig., graf.,; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Tumores odontogênicos – Estabilidade biológica 2. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Borba AM. Avaliação da estabilidade biológica do tumor odontogênico queratocístico em diferentes momentos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

2)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

3)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao detentor da força maior, Deus, que me agraciou com a vida, com a liberdade de seguir meu destino. Dedico mais uma conquista em nome de tudo e de todos.

À minha família, meu maior tesouro, amor inigualável. Aos meus pais Aluísio e Aneliza, exemplos insuperáveis de amor, dedicação e confiança. Aos meus irmãos, por quem cada dia mais me orgulha essa dupla sorte: amigos e irmãos! À minha família alemã, Tatiana, Michael, Luisa e Gabriel; muitas saudades! À Paulinha, pela confiança, estímulo, admiração e amor.

À odontologia, ciência e profissão, campo aberto onde posso, de diferentes formas, fazer algo de bom ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À Marília, que se mostrou muito mais além de orientadora. Agradeço pela amizade, sinceridade, companheirismo e confiança. Agradeço pela participação na realização de muitos sonhos profissionais!

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Pela honra de agregar tantos exemplos profissionais; realmente motivador.

Aos professores e colegas que participaram na minha formação até o presente, desde a minha graduação em Cuiabá, passando pela Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo Hospital Universitário da USP e chegando até a FOUSP. Agradeço meus sempre admirados tutores, Márcia e Carlos Augusto; serão sempre lembrados como inspiração nas minhas conquistas. Ao meu amigo e colega Ophir, eterno R+; não preciso de mais palavras para explicar. À sempre exemplar amiga e colega, Mariana.

A todos meus amigos e colegas de pós-graduação da disciplina de Patologia Bucal. Muitas amizades me deram forças para seguir minha trajetória. Aos funcionários da FOUSP que, direta ou indiretamente, contribuíram durante meu curso. À Elisa e aos meus amigos, colegas de orientadora, Alexandra, Patrícia, Artur e Juliana, pelas batalhas imunoistoquímicas, pelos desafiadores momentos no microscópico mundo de Gulliver. Ao Fábio Coracin pela amizade, pelas longas discussões dos sonhados objetivos. A toda a equipe administrativa da FOUSP.

Aos companheiros de trabalho na UNIC, em especial a todos meus colegas e residentes do HGU. Agradeço o apoio na minha ausência.

Aos meus colegas de trabalho no MarienHospital Stuttgart. A oportunidade certa no momento certo.

À CNPq, pelo apoio financeiro dado pela bolsa do mestrado; com certeza uma maneira de viabilizar a ciência no Brasil.

Borba AM. Avaliação da estabilidade biológica do tumor odontogênico queratocístico em diferentes momentos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O tumor odontogênico queratocístico é um tumor odontogênico benigno recentemente classificado como tal pela Organização Mundial de Saúde. O alto índice de recidiva, a similaridade com outras lesões odontogênicas císticas e mutações genéticas associadas, estimulam continuamente estudos com finalidade de aprimorar o diagnóstico e o entendimento do comportamento desta lesão. As citoqueratinas, principal componente do citoesqueleto epitelial, têm sido utilizadas como possíveis marcadores no diagnóstico do tumor odontogênico queratocístico, apesar da discrepância dos resultados publicados. O gene *PTCH1*, com mutação já relatada associada ao tumor odontogênico queratocístico, expressa proteína de mesmo nome que parece estar associada com a etiologia ou com o prognóstico do tumor odontogênico queratocístico. Vinte casos de tumor odontogênico queratocístico foram submetidos à técnica de imunoistoquímica para detecção da expressão das citoqueratinas 10, 13, 17 e 19 e da proteína PTCH1. Cada caso foi representado por dois momentos distintos da mesma lesão, sendo metade dos casos representados por lesões sem história de recidiva e a outra metade constituída de casos com história de recidiva. A marcação obtida em cada um dos momentos foi comparada, verificando assim a estabilidade de expressão. A influência da inflamação na expressão imunoistoquímica também foi avaliada. As citoqueratinas 10 e 17 se mostraram com maior porcentagem de positividade (82,5% e 97,5%, respectivamente) e com maior estabilidade entre os momentos (65% e 95%, respectivamente). A proteína PTCH1 foi positiva em todos os momentos,

apresentando assim estabilidade total para os casos estudados. Não houve diferença estatisticamente significativa, para nenhum dos anticorpos utilizados, entre os grupos sem ou com história de recidiva ou de expressão nas áreas de inflamação. A estabilidade das citoqueratinas 10 e 17 sugere que estas possam ser utilizadas associadamente como auxiliar de diagnóstico do tumor odontogênico queratocístico. A proteína PTCH1 demonstrou alta positividade e estabilidade; porém não pôde ser relacionado ao comportamento do tumor odontogênico queratocístico.

Palavras-Chave: Tumores odontogênicos; Cistos odontogênicos; Marcadores biológicos; Imunoistoquímica; Neoplasias bucais

Borba AM. Biological stability evaluation of the keratocystic odontogenic tumor in different moments [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

The keratocystic odontogenic tumor is a benign odontogenic tumor recently classified as such by the World Health Organization. The high recurrence rate, the similarity with other odontogenic cystic lesions and the genetic associated mutations continuous stimulate studies intending diagnostic enhancement and behavior understanding of such lesion. The citokeratins, main component of the epithelial cytoskeleton, have been used as possible diagnostic markers of the keratocystic odontogenic tumor, in spite the discrepancy of the published results. The *PTCH1* gene, with already reported mutation associated with the keratocystic odontogenic tumor, expresses a protein with the same name that seems to be associated with the etiology or the prognosis of the keratocystic odontogenic tumor. Twenty cases of keratocystic odontogenic tumor were submitted to the immunohistochemical technique for detection of the expression of citokeratins 10, 13, 17 and 19 and the protein PTCH1. Each case was represented by two distinct moments of the same lesion, being half of the cases represented by lesion without recurrence history and the other half constituted of lesion with recurrence history. The obtained staining in each moment was compared, thus verifying the expression stability. The influence of inflammation in the immunohistochemical expression was also evaluated. The cytokeratins 10 and 17 demonstrated higher positivity percentage (82.5% and 97.5%, respectively) and greater stability among the moments (65% and 97.5%, respectively). The PTCH1 protein was positive in all moments, thus presenting total stability for the studied cases. There was no statistical difference, for none of the

antibodies, either among the groups without or with history of recurrence or in the expression in areas with inflammation. The stability of the cytokeratins 10 and 17 suggests that they can be used together as auxiliary for the diagnosis of the keratocystic odontogenic tumor. The protein PTCH1 demonstrated high positivity and stability; however it could not be related to the behavior of the keratocystic odontogenic tumor.

Keywords: Odontogenic tumors; Odontogenic cysts; Biological markers; Immunohistochemistry; Mouth neoplasms

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Tumor odontogênico queratocístico.....	14
2.2 Marcadores biológicos.....	17
2.2.1 Citoqueratinas 10, 13, 17 e 19.....	18
2.2.2 Gene PTCH.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Seleção e obtenção do material.....	27
4.2 Imunoistoquímica.....	28
4.3 Análise dos resultados.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Citoqueratinas 10, 13, 17 e 19.....	32
5.2 Gene PTCH.....	38
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

O manejo das lesões odontogênicas nem sempre é simples. A semelhança dos aspectos clínicos e radiográficos entre estas não necessariamente se reflete no mesmo tratamento. Um bom exemplo dessa situação é o tumor odontogênico queratocístico (TOQ). O TOQ, um tumor odontogênico benigno que apresenta alto índice de recidiva, muitas vezes se assemelha a lesões de comportamento menos agressivas, como o cisto dentífero.

O profissional de saúde dispõe de diversas opções para obtenção do diagnóstico, sendo a biópsia muito comumente utilizada. Entretanto, uma determinada lesão pode sofrer variações histológicas após sua manipulação, sendo isso já relatado para o TOQ. Também, exames mais específicos como a imunoistoquímica, compõem um arsenal que pode favorecer o patologista bucal no diagnóstico preciso de uma determinada lesão ou mesmo ajudá-lo a compreender melhor o seu comportamento.

O contínuo desenvolvimento de pesquisas com anticorpos já existentes e o surgimento de novos anticorpos, reforçam a imunoistoquímica como alternativa no desenvolvimento científico. O produto final dessa soma de conhecimentos é dado ao paciente, que se beneficia num melhor entendimento da sua situação atual.

Dentro desse contexto, o estudo do comportamento do TOQ frente à expressão imunoistoquímica de algumas citoqueratinas e de anticorpos que sugerem refletir possíveis alterações desta lesão encontra campo aberto para maiores conhecimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O processo de formação do dente, a odontogênese, tem início entre a sexta e a sétima semana de vida intra-uterina, originário de células epiteliais que revestem a cavidade bucal e de células ectomesenquimais derivadas da crista neural. Em uma seqüência de processos de mútua cooperação epitélio-mesenquimal, essas células se transformam em ameloblastos (produtores de esmalte) e odontoblastos (produtores de dentina), respectivamente. Os tumores odontogênicos, portanto, são processos neoplásicos ou hamartomatosos originários das células que normalmente teriam a função de formar parte do dente (SLOOTWEG, 2006).

Os tumores odontogênicos representam cerca de 0,002 a 0,003% de todas as lesões que acometem o corpo humano e quando comparados às patologias da região bucomaxilofacial, representam cerca de 2 a 3% destas. Inicialmente, o termo odontoma era utilizado para nomear todos os tumores presentes nessa região e inúmeras classificações foram feitas para tentar diferenciar as lesões entre si. A primeira delas, que começou com a terminologia de tumores odontogênicos, por Broca em 1869. Já a partir 1958, inseriu-se o conceito da interação epitélio-mesenquimal. No ano de 1971 foi feita a primeira classificação pela organização mundial de saúde (OMS) na qual os cistos odontogênicos também foram incluídos. Em 1992 foi lançada a segunda classificação da OMS e lesões ósseas relacionadas ao aparato odontogênico também foram adicionadas. Finalmente, em 2005 a nova classificação proposta trouxe algumas modificações (PHILIPSEN; REICHART, 2006).

De acordo com a atual classificação da OMS, os tumores odontogênicos são divididos de acordo com a célula que originaram a lesão e também classificadas como neoplasias benignas ou malignas. De maneira descritiva, segue abaixo a relação dos tumores benignos e malignos (BARNES et al., 2005):

- tumores benignos do epitélio odontogênico sem a participação do ectomesênquima (grupo representado pelo ameloblastoma, tumor odontogênico escamoso, tumor odontogênico epitelial calcificante, tumor odontogênico adenomatóide e tumor odontogênico queratocístico);
- tumores benignos do epitélio odontogênico com a participação do ectomesênquima (fibroma ameloblástico, fibro-dentinoma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico, odontoma, odontoameloblastoma, tumor odontogênico cístico calcificante e tumor dentinogênico de células fantasmas);
- tumores benignos do ectomesênquima com ou sem a participação do epitélio odontogênico (fibroma odontogênico, mixoma odontogênico e cementoblastoma)
- carcinomas odontogênicos (ameloblastoma metastático ou maligno, carcinoma ameloblástico, carcinoma epidermóide intra-ósseo, carcinoma odontogênico de células claras e carcinoma dentinogênico de células fantasmas);
- sarcomas odontogênicos (fibrossarcoma ameloblástico, fibro-dentinossarcoma ameloblástico e fibro-odontossarcoma).

2.1 Tumor odontogênico queratocístico

O queratocisto odontogênico foi primeiramente descrito por Philipsen em 1956 e até recentemente era classificado pela OMS como um cisto odontogênico de desenvolvimento. Por sugestão de diversos autores para que esta lesão fosse considerada como uma neoplasia benigna, a nova classificação, feita pela OMS em 2005, reclassificou-a dentre os tumores de epitélio odontogênico sem a participação do ectomesênquima odontogênico, com a nomenclatura atual de tumor odontogênico queratocístico (TOQ) (BARNES et al., 2005; GIULIANI et al., 2006; MAURETTE; JORGE; DE MORAES, 2006).

Sua origem está provavelmente relacionada com remanescentes da lâmina dental, sem que ainda esteja definido qual é o fator desencadeador da formação da lesão. Outra linha de pesquisa sugere a participação da camada basal do epitélio oral na sua formação, em especial nas lesões que acometem a região posterior da mandíbula (STOELINGA, 2001, 2005; GIULIANI et al., 2006).

Ainda não existem dados epidemiológicos referentes à porcentagem do TOQ dentre os tumores odontogênicos, porém, esta lesão correspondia a cerca de 10% dos cistos odontogênicos, acometendo mais frequentemente adultos nas segunda e terceira décadas de vida, na região de ramo e ângulo mandibular, com predileção pelo sexo masculino. Muitos casos não apresentam sintomatologia, sendo comumente identificados como um achado radiográfico. Quando clinicamente perceptível, o TOQ apresenta-se como aumento volumétrico frequentemente indolor. Radiograficamente demonstra-se como imagem radiolúcida unilocular ou multilocular, de contornos definidos e com a característica expansão ântero-

posterior. Geralmente apresenta-se como lesão única, mas é expressa de forma múltipla e de maneira mais agressiva na síndrome do carcinoma nevóide basocelular (também chamada de síndrome de Gorlin-Goltz) (CHIRAPATHOMSAKUL; SASTRAVAHA; JANSISYANONT, 2006; GIULIANI et al., 2006; MAURETTE; JORGE; DE MORAES, 2006).

O crescimento do TOQ se dá por uma combinação da pressão osmótica intracística, liberação de prostaglandina e fatores de crescimento, que causam reabsorção óssea na periferia do cisto (POGREL, 2005; GIULIANI et al., 2006).

Histologicamente apresenta uma fina cápsula de tecido conjuntivo, caracteristicamente livre de processo inflamatório, revestida por epitélio estratificado pavimentoso com cinco a oito camadas de células. A camada basal exhibe células cuboidais ou cilíndricas dispostas em paliçada e de núcleos polarizados, enquanto a superfície do epitélio é corrugada e constituída por paraqueratina (AUGUST et al., 2000; CHIRAPATHOMSAKUL; SASTRAVAHA; JANSISYANONT, 2006; GIULIANI et al., 2006).

O tratamento proposto para o TOQ tem variado consideravelmente entre os autores. De um modo geral, lesões uniloculares, de pequenas dimensões, localizadas em áreas dentadas, são tratadas como qualquer cisto odontogênico, sendo favorecidas pela sua localização. Maior importância tem se dado aos casos acometendo grandes porções da região posterior da mandíbula (ângulo, ramo e cabeça da mandíbula) ou regiões pósterio-superiores da maxila (CHAPELLE et al., 2004; STOELINGA, 2005).

Uma preocupação sempre existente no tratamento é o elevado índice de recidiva que o TOQ apresenta. Esse índice de recidiva é explicado pela remoção incompleta do cisto e sua cápsula, pelo desenvolvimento de novas lesões a partir de

proliferações da camada basal do epitélio oral ou pela contínua formação de novos cistos como freqüentemente visto nos caso da síndrome do carcinoma nevóide basocelular. Nas fenestrações ósseas, em 50% dos casos novos e em até 100% dos casos de recidiva, encontra-se grande número de ilhas epiteliais ou microcistos (BLANAS et al., 2000; STOELINGA, 2001, 2005; GIULIANI et al., 2006).

Muitas possibilidades de tratamento foram propostas na intenção de diminuir o índice de recidiva após a enucleação. Alguns autores propõem formas menos invasivas de tratamento como a descompressão ou a marsupialização. Outros acreditam que seja necessário um tratamento coadjuvante no intuito de tratar o leito cirúrgico após a enucleação do cisto. O tratamento físico da loja cirúrgica consiste na ostectomia periférica, com brocas ou manualmente, ou na aplicação de nitrogênio líquido (crioterapia), e o tratamento químico é realizado pela aplicação de solução de Carnoy (três mililitros de clorofórmio, seis mililitros de álcool absoluto, um mililitro de ácido glacial acético e um grama de clorito férrico) (LOESCHER, ROBINSON, 1998; BLANAS et al., 2000; STOELINGA, 2001; POGREL, 2005; GIULIANI et al., 2006).

Vários estudos mostram índices baixos de recidiva na enucleação associada a um tratamento da loja remanescente. Outras publicações defendem a marsupialização e a descompressão para casos em que outro tipo de tratamento poderia comprometer a integridade do remanescente ósseo. Stoelinga (2005) sugere métodos mais invasivos, como a remoção da mucosa sobre a fenestração óssea, com intuito de melhorar o prognóstico e diminuir a morbidade de repetidos procedimentos. Mesmo assim, o acompanhamento do paciente já tratado deve ser feito anualmente nos primeiros cinco anos, pela maior probabilidade de recorrências nesta época, e depois deve ser realizado a cada dois anos, por tempo indeterminado (STOELINGA, 2001; CHIRAPATHOMSAKUL; SASTRAVAHA; JANSISYANONT,

2006; POGREL, 2005; STOELINGA, 2005; MAURETTE; JORGE; DE MORAES, 2006; GIULIANI et al., 2006).

Em resumo, suas características de expansão rápida, extensão aos tecidos adjacentes, alta atividade mitótica, seu alto índice de recidiva e a identificação de alterações do gene PTCH1 (veja tópico a seguir), reforçaram a nova classificação do TOQ. Por esses motivos, o diagnóstico preciso é fundamental para que o devido tratamento seja estabelecido. Embora as características clínicas e radiográficas do TOQ sejam marcantes, essas mesmas características se apresentam em diversas outras patologias maxilofaciais, sendo então o exame histopatológico essencial para o diagnóstico (SHEAR, 2002; ZHAO; WEI; WANG, 2002; MORGAN; BURTON; QIAN, 2005; STOELINGA, 2005; GIULIANI et al., 2006; MAURETTE; JORGE; DE MORAES, 2006; MADRAS, LAPOINTE, 2008).

Fatores como a inflamação podem alterar os aspectos histopatológicos do TOQ dificultando ou até mesmo impossibilitando o seu diagnóstico preciso. Levando-se isso em consideração, conclui-se que sua incidência pode ser ainda maior do que a já conhecida (STOELINGA, 2005; GIULIANI et al., 2006; KOLAR et al., 2006).

2.2 Marcadores biológicos

Marcadores biológicos são utilizados no estudo da expressão tecidual, podendo ser relativos à proliferação celular ou a alterações celulares que possam indicar mudança comportamental da lesão, mais condizente com o comportamento neoplásico da mesma. A identificação de um marcador biológico estável implica em

benefícios além do diagnóstico. O TOQ representa uma das lesões odontogênicas com maior taxa de recidiva e que, paradoxalmente, é muitas vezes tratada como um simples cisto odontogênico. O diagnóstico permite tratamento adequado e acompanhamento em longo prazo. Tais benefícios levam ao diagnóstico precoce e identificação de recidivas quando estas ainda não causaram grande morbidade (BARRETO et al., 2000, 2002; COLEMAN et al., 2001; DA SILVA et al., 2002; PIATTELLI et al., 2003; AMORIM et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2004; KOCHAJI et al., 2005; LO MUZIO et al., 2005).

2.2.1 Citoqueratinas 10, 13, 17 e 19

As citoqueratinas (CKs) são filamentos intermediários que fazem parte do citoesqueleto de uma célula epitelial e são expressas de diversas maneiras no corpo humano, sendo também utilizadas como marcadores da diferenciação epitelial. A grande variedade é caracterizada pelas subunidades de polipeptídeos com variação de peso molecular e ponto isoelétrico. A expressão tecidual de CKs varia dentre tipos celulares, estágio de desenvolvimento, diferenciação tecidual e alterações patológicas; o meio ambiente ou o tecido conjuntivo subjacente ao epitélio também podem alterar as expressões epiteliais das CKs (AUGUST et al., 2000, 2003; MEARA et al., 2000; PRESLAND; DALE, 2000; DA SILVA et al., 2002; SHEAR, 2002; UPASANI; VAIDYA; BHISEY, 2004; STOLL et al., 2005).

A complexidade da cavidade bucal dos seres humanos é ótimo exemplo da influência da diferenciação epitelial na expressão de CKs. Os diferentes tipos de

epitélio bucal, queratinizado ou não queratinizado, apresentam diferentes níveis de diferenciação e queratinização e a expressão de CKs varia conseqüentemente (UPASANI; VAIDYA; BHISEY, 2004).

August et al. (2003) relataram que os epitélios odontogênicos diferem entre si pelos diferentes tipos de CKs e que o TOQ geralmente produz CK10 e 11. A CK10 é restrita às camadas suprabasais do epitélio pavimentoso estratificado, sendo produzido por todas as células suprabasais de um epitélio bastante diferenciado e, portanto, funcionando como marcador da diferenciação em carcinomas epidermóides. A expressão de CK10, entretanto não se mostra a mesma nos estudos publicados e muita controvérsia é vista entre os autores (SHEAR, 2002; AUGUST et al., 2003; CRIVELINI et al., 2003; STOLL et al., 2005).

A CK13 é também comumente encontrada nas camadas suprabasais do epitélio pavimentoso estratificado e em epitélio glandular. Entretanto, devido a um padrão não específico de marcação, não pode ser usada como padrão de distinção entre lesões odontogênicas (MEARA et al., 2000; CRIVELINI et al., 2003).

A CK17 é comumente expressa em células basais e mioepiteliais de epitélios complexos e epitélios de transição. Meara et al. (2000) e Stoll et al. (2005) demonstraram utilidade na sua aplicação para diagnóstico entre lesões odontogênicas. Tumores de origem epitelial podem apresentar expressão de CK17 e isso tem sido demonstrado nos TOQs.

A CK19 é encontrada em algumas células basais do epitélio estratificado bucal, na maioria dos epitélios simples e também no epitélio odontogênico normal e alterado. Atua como importante marcador de lesões malignas, porém, assim como todas as outras CKs supradescritas, há muita controvérsia sobre sua presença e padrões de expressão (SHEAR, 2002; STOLL et al., 2005).

August et al. (2000) realizaram análises imunoistoquímica e imunocitoquímica de lesões odontogênicas as quais foram submetidas à marcação pela CK10. Dos 18 casos estudados, eles puderam predizer o diagnóstico de todos os casos de TOQ por meio de amostra obtida via aspiração intra-cística com agulha fina e submetida à marcação imunocitoquímica para CK10, posteriormente confirmadas pelas características histológicas e imunoistoquímicas de marcação suprabasal do espécime final. Apesar de duas outras lesões apresentarem uma dispersa marcação para CK10, mas sem o mesmo padrão obtido nos casos de TOQ (lesões que posteriormente foram diagnosticadas como cisto dentígero e cisto radicular), os autores concluíram que a técnica de aspiração por agulha fina intra-lesional combinada a técnica de imunoistoquímica para CK10 são ferramentas valiosas no diagnóstico do TOQ.

Meara et al. (2000) analisaram uma série de marcadores imunoistoquímicos, dentre estes as CKs13, 17 e 18, na tentativa de se estabelecer uma diferença na expressão de CK entre lesões císticas dos maxilares. Como resultado eles demonstraram que a marcação foi similar nos TOQs relacionados ou não à síndrome do carcinoma nevóide basocelular, apesar de algumas sutis diferenças; as demais lesões estudadas, ameloblastoma e cisto dentígero, tiveram marcação mais fraca e dispersa. Em conclusão, os autores consideraram que um patologista experiente é essencial na confirmação do diagnóstico, mas que os aspectos imunoistoquímicos (especialmente para CK17) podem auxiliar na diferenciação entre lesões císticas odontogênicas.

Um estudo retrospectivo foi feito por Shear (2002) sobre as pesquisas imunoistoquímicas realizadas entre os anos de 1987 e 2000. Uma crítica importante foi quanto a falta de padronização de metodologia das, nem sempre em

discordância. De fato, as pesquisas imunoistoquímicas demonstram muita sensibilidade à técnica para marcação adequada; outros autores inclusive reforçaram os problemas na preparação dos cortes obtidos de tecidos calcificados e no uso de diferentes anticorpos monoclonais para uma mesma CK (MEARA et al., 2000; SHEAR, 2002).

Em uma comparação da imunoexpressão do TOQ e do cisto odontogênico ortoqueratinizado, da Silva et al. (2002) apresentaram positividade do TOQ para as CKs10 e 13 nas camadas superficiais e paraqueratinizadas do epitélio; a CK14 foi expressa somente na camada basal mas, segundo os autores, sem padrão de consistência. Os resultados foram indicativos de um processo mais abrupto e menos maduro de queratinização do TOQ, em especial se comparado a queratinização do cisto odontogênico ortoqueratinizado.

August et al. (2003) avaliaram 14 casos de TOQ usando o mesmo protocolo para CK10 relatado previamente (AUGUST et al., 2000) e então estudaram a “desdiferenciação” (um processo de reversão da diferenciação) depois de descompressão do conteúdo cístico. Após um período variando entre seis e doze meses, nove lesões não apresentavam mais as características histológicas compatíveis com TOQ. Interessantemente, foi demonstrado que mesmo quando o epitélio da lesão não mais apresentava suas características de TOQ, alguns cistos satélites o faziam, sendo inclusive positivos para marcação de CK10.

Na tentativa de diferenciar a expressão de CKs entre o cisto radicular, cisto dentígero e o TOQ, Stoll et al. (2005) demonstraram que a associação entre a positividade para CK17 e negatividade para CK19 pôde diferenciar os TOQ das demais lesões estudadas em 93,3% dos casos.

Vargas et al. (2007) usaram a técnica de aspiração por agulha fina para avaliar as células obtidas e se estas poderiam determinar o diagnóstico do TOQ. Após realizarem imunocitoquímica do material obtido, relataram que a CK19 é útil no processo de diagnóstico do TOQ.

2.2.1 Proteína PTCH1

Em 1996, o gene *patched* homólogo 1 (*Drosophila*), representado pela sigla *PTCH1* e localizado na região cromossômica 9q22.1-q31, foi identificado como responsável pelo desenvolvimento da síndrome do carcinoma nevóide basocelular. Tal gene produz a proteína transmembrana PTCH1, atuando como supressora de tumor, no controle da proliferação celular induzida pela proteína SHH codificada pelo gene *sonic hedgehog* homólogo (*Drosophila*). A proteína PTCH1 liga-se à proteína SMO, codificada pelo gene *smoothed* homólogo (*Drosophila*), e inibe o estímulo à proliferação celular. Quando a SHH se liga à PTCH1, a SMO torna-se livre e ativa, passando então a propagar o estímulo de proliferação celular ativando a proteína GLI1. Quando o *PTCH1* sofre mutação, a proteína produzida não consegue inibir a ativação da SMO, permitindo a proliferação celular sem controle (BARRETO et al., 2000, 2002; TOFTGÅRD, 2000; OHKI et al., 2004; KOCHAJI et al., 2005; XUAN et al., 2006; ZHANG et al., 2006).

Toda a via de sinalização SHH-PTCH1 tem grande importância no desenvolvimento do tubo neural, do esqueleto e de órgãos de mamíferos. Também é atribuída à mesma via de sinalização papel fundamental no processo de

odontogênese, participando na definição da forma do dente (BARRETO et al., 2000; TOFTGÅRD, 2000; OHKI et al., 2004). Na fase adulta, essa via de sinalização está relacionada à regulação do processo de reparo de um tecido lesado (XUAN et al., 2006)

O *PTCH1* parece estar relacionado à etiologia do TOQ, sendo que alguns indivíduos já carregam consigo uma alteração congênita neste gene. A teoria de etiopatogênese sugere que apenas seja necessário um segundo evento de mutação no outro alelo para que surja a lesão do TOQ (LEVANAT et al., 2000; KOCHAJI et al., 2005; SUN; LI; LI, 2008).

Mutações ou deleções do gene *PTCH1* foram descritos em casos de TOQ relacionados à síndrome do carcinoma nevóide basocelular e também inclusive em casos esporádicos não associados (BARRETO et al., 2000; OHKI et al., 2004). Na tentativa de melhor entender o papel do *PTCH1* nos TOQs, alguns trabalhos têm demonstrado diferentes resultados na apresentação imunoistoquímica da proteína PTCH1 no TOQ não-sindrômico (ZEDAN et al., 2001, BARRETO et al; 2002; OHKI et al., 2004).

Na presença de alterações do gene *PTCH1* – mutações ou deleções –, a resposta imunoistoquímica é incerta. Barreto et al. (2002) apresentaram um caso em que havia mutação do *PTCH1*, esperando resposta negativa ao anticorpo, e obtiveram positividade, sugerindo então que os TOQs possam surgir como consequência de haploinsuficiência do gene. Já Kochaji et al. (2005) salientaram que o gene *PTCH1* mutado tem como característica o aumento na produção da proteína PTCH1, apesar desta ser incapaz de cumprir sua função; em outras palavras, postularam que a mutação afeta a função e não a expressão da proteína PTCH1.

Barreto et al. (2002) desenvolveram e utilizaram anticorpo para a proteína PTCH1 demonstrando marcação epitelial positiva em diversas lesões odontogênicas, inclusive no TOQ, e em fragmentos de mucosa bucal normal. Já Ohki et al. (2004) utilizaram pela primeira vez um anticorpo para a proteína PTCH1 desenvolvido comercialmente (Santa Cruz Biotechnology) e apresentaram marcação não só restrita ao epitélio de TOQs e fragmentos de gengiva normal, mas também envolvendo fibroblastos do tecido conjuntivo subjacente, fato este justificado pelos autores como mecanismo de interação epitélio-mesenquimal similar ao visto durante a odontogênese. Tal processo de interação foi reforçado por Zhang et al. (2006), que postularam que as proteínas SHH, PTCH1 e SMO teriam função autócrina no epitélio e parácrina no tecido conjuntivo subjacente.

Diferentemente dos resultados de outros autores, Kochaji et al. (2005) demonstraram negatividade para a proteína PTCH1 em fragmentos de mucosa oral; outras lesões císticas odontogênicas, o TOQ, o cisto dentígero e o cisto radicular apresentaram marcação positiva em 88%, 67% e 25%, respectivamente. Além disso, relacionaram casos de TOQ com recidiva e marcação positiva para a proteína PTCH1. Diante dos resultados obtidos, os autores atribuíram à proteína PTCH1 um papel mais relacionado à complicação clínica (leia-se recidiva) do que à patogênese (mesmo por que algumas lesões se desenvolveram mesmo sem a mutação do *PTCH1*).

Diversos tumores odontogênicos (não incluindo o TOQ), exclusivos do epitélio odontogênico ou do epitélio odontogênico com participação do mesênquima, foram relatados como até 100% positivos para SHH, PTCH1 e SMO (ZHANG et al., 2006).

Com a contínua publicação de casos, sindrômicos ou não, apresentando mutação no gene *PTCH1*, existe uma expectativa em se entender a relação entre ele

e o TOQ. Apesar da freqüente expressão da PTCH1 no TOQ, há a necessidade de se confirmar se sua expressão imunoistoquímica é mantida mesmo sob influência de fatores locais, como a inflamação (SUN; LI; LI, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho objetiva a identificação de marcadores biológicos estáveis, que possam ser utilizados por meio da técnica de imunoistoquímica, para auxiliar o diagnóstico do tumor odontogênico queratocístico (TOQ), mesmo na presença de fatores modificadores da arquitetura epitelial, como a inflamação. Com este intuito, serão estudadas as citoqueratinas (CKs) 10, 13, 17 e 19 e a proteína PTCH1 em dois momentos distintos de casos de TOQ. Também é proposta a identificação do padrão de expressão da proteína PTCH1 no TOQ, relacionando-o com o comportamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme parecer de aprovação número 149/07 (ANEXO A).

4.1 Seleção e obtenção do material

Foi utilizado o acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A obtenção das amostras foi feita a partir de casos que tenham tido ao menos dois momentos distintos (por exemplo, biópsia incisional e enucleação). Foram obtidos vinte casos de tumor odontogênico queratocístico (TOQ) não associados à síndrome do carcinoma nevóide basocelular; cada caso teve seu diagnóstico revisado e confirmado e era composto por duas amostras de momentos distintos (A e B), porém com a mesma localização. Os 20 casos representavam dez em que não havia história de recidiva e dez com história compatível com recidiva, obtida da ficha de encaminhamento para exame anátomo-patológico.

Em seguida, foram recuperados os blocos de parafina contendo o material fixado em formol, das lesões selecionadas.

4.2 Imunoistoquímica

Cortes histológicos foram obtidos e preparados, a partir do material embocado em parafina, com espessura de 3µm e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas para aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lâmina.

Para a realização das reações imunoistoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-PTCH1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e citoqueratinas (CKs) 10, 13, 17 e 19 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) separadamente. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e, a seguir, foram reidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica, feito com as lâminas totalmente imersas em solução de ácido cítrico 10 mM, pH 6,0, colocadas em banho de água aquecido a 95 °C, durante 30 minutos.

Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água corrente, durante 10 minutos, então passaram por água destilada e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

Repetida a lavagem em água, os cortes foram imersos em solução de TRIS pH 7,6, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na sequência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6. Os anticorpos

foram diluídos em solução tampão de TRIS, pH 7,6, acrescido de albumina bovina a 1%, em uma diluição de 1:100 para a CK10 e 1:50 para os demais anticorpos, sendo incubados sobre os cortes durante dezoito horas a 4 °C para as CKs10, 17 e 19 e por uma hora em temperatura ambiente para os demais anticorpos. Os cortes submetidos ao anticorpo anti-PTCH1, antes da incubação do anticorpo primário, foram incubados por 1 hora com a solução de TRIS-BSA para redução de marcação inespecífica.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o sistema o kit LSAB+ (DAKO, Carpinteria, CA, USA) em incubações de 30 minutos cada.

As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Após, foram desidratados, diafanizados e montados em lâminula.

A incubação dos anticorpos primários contra as CKs10, 17 e 19 foi feita manualmente e para os demais anticorpos assim como os demais passos até a contracoloração foram realizados automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

4.3 Análise dos resultados

Todos os casos foram submetidos à análise através da microscopia de luz. Foram consideradas positivas as células que apresentaram coloração acastanhada no citoplasma. Em seguida, as camadas epiteliais atingidas pela marcação foram relacionadas. Cada caso consistiu em duas amostras de momentos distintos; os casos foram analisados e relacionados entre si e entre os grupos sem e com história de recidiva. A estabilidade foi determinada pela mesma expressão de um determinado anticorpo em ambos os momentos.

A presença de inflamação em cada caso foi descrita e a perda ou manutenção da expressão de um determinado anticorpo especificamente na área de inflamação foi relacionada.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente. Para todos os resultados, foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2), com exceção da análise entre os grupos com e sem recidiva para todas as CKs, onde foi utilizado o teste de McNemar binomial por ser uma distribuição não paramétrica.

5 RESULTADOS

Cada um dos 20 casos teve dois momentos distintos estudados (A e B), totalizando assim 40 amostras. Os casos foram avaliados em microscópio de luz nos aumentos de 4x, 10x e 40x, identificando se houve positividade de expressão celular e, quando positivo, a localização celular da marcação e a localização da marcação dentre as camadas epiteliais. A média de tempo entre os momentos do grupo sem recidiva foi de 5,6 meses e para o grupo com recidiva foi de 34,1 meses.

Os casos de tumor odontogênico queratocístico (TOQ) eram representados por cavidade cística revestida por um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado em geral de espessura média (por volta de 6 a 10 camadas) sendo a camada basal formada por células epiteliais colunares dispostas em paliçada e a camada de paraqueratina fina e corrugada. Envolvendo a periferia do epitélio, observou-se tecido conjuntivo, que na sua maior parte era do tipo denso. Áreas de infiltrado inflamatório subjacente ao epitélio do TOQ foram consideradas quando apresentava inflamação intensa ou moderada e representaram 57,5% das amostras. Células inflamatórias esparsas foram consideradas eventos normais do estroma de tecido conjuntivo. Cistos satélites foram encontrados em apenas duas amostras (amostra B do caso 4 e amostra A do caso 18).

5.1 Citoqueratinas 10, 13, 17 e 19

A marcação das 40 amostras (20 casos) para as citoqueratinas (CKs) foi citoplasmática e restrita ao epitélio, embora as camadas marcadas tenham variado. Devido à impossibilidade de comparação entre as CKs e por uma amostragem pequena, não houve significância estatística para os resultados a seguir.

A expressão de CK10 foi observada como positiva em 33 das 40 amostras (82,5%), sendo positiva em 15 das 20 amostras (75%) que correspondiam ao momento A e em 18 das 20 amostras (90%) que correspondiam ao momento B. Em 77,5% das amostras, apenas a camada superficial do epitélio foi marcada (figura 5.1).

Figura 5.1 – Momento A do caso cinco mostrando marcação superficial característica da CK10, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

A CK13 apresentou marcação positiva em 19 das 40 (47,5%), sendo sete das 20 amostras (35%) positivas no momento A e 12 das 20 amostras (60%) positivas no

momento B. A marcação ocorreu na região suprabasal em 35% das amostras e apenas na camada superficial em 22,5% das amostras (figura 5.2).

Figura 5.2 – Momento B do caso quatro demonstrando marcação para CK13 de dois terços superficiais do epitélio (aumento de 10x)

A expressão da CK17 apresentou-se positiva em 39 das 40 amostras (97,5%), sendo positiva em 19 das 20 amostras (95%) do momento A e em todas as amostras do momento B. Em 82,5% das amostras, todas as camadas epiteliais foram marcadas; nas demais amostras, houve marcação das camadas suprabasais (figura 5.3).

Figura 5.3 – Momento A do caso cinco mostrando marcação de todo o epitélio, característica da CK17, em aumento de 10x (A) e 40x (B)

A CK19 apresentou-se positiva em 16 das 40 amostras (40%), sendo positiva em sete das 20 amostras (35%) do momento A e em nove das 20 amostras (45%) do momento B. Marcação suprabasal foi vista em 27,5% das amostras e todo o epitélio em 12,5% das amostras (figura 5.4).

Figura 5.4 – Momento B do caso quatro demonstrando marcação esporádica (A, aumento de 10x) e ausência de marcação (B, aumento de 40x) para CK19

Apenas os valores de positividade para as CKs10 e 17 foram estatisticamente significativos, considerando $p < 0,01$. Entretanto, além de analisar a expressão de

CKs entre os momentos, a estabilidade de expressão entre os momentos, para cada caso, foi também avaliada. Em seguida, os casos foram separados entre grupos sem história de recidiva e com história de recidiva (gráficos 5.1 a 5.4).

Gráfico 5.1 – Representação da positividade das CKs dentre as 40 amostras

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CK 10	X					X								X				X	X	
CK 13	X		X		X	X			X	X	X	X		X	X	X		X	X	
CK 17		X											X	X	X	X	X			X
CK 19	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X				X		X	X	

Gráfico 5.2 – Estabilidade de cada caso para cada uma das CKs estudadas; a letra X representa marcação negativa e o quadrado vermelho representa caso estável, porém com ambas as amostras negativas

Gráfico 5.3 – Representação da estabilidade das CKs entre os momentos dos 20 casos

Gráfico 5.4 – Relação da estabilidade dentre os grupos, para cada CK

Dos casos positivos para as CKs estudadas, foi feita uma análise comparando-se a marcação e a presença de inflamação. Não foi encontrado padrão relacionado à inflamação que pudesse justificar a marcação, pois amostras com ou sem inflamação se mostraram tanto positivas como negativas. Considerando que

57,5% das amostras apresentavam inflamação, foi analisado se os casos que eram positivos para uma determinada CK mantinham tal positividade nas áreas de inflamação. O resultado foi uma maior manutenção da positividade nas áreas de inflamação para a CK10, seguida das CKs13, 19 e 17. Entretanto, não houve significância estatística para tal resultado (figura 5.5 e gráfico 5.5).

Figura 5.5 – Momento B do caso dois exemplificando a ausência de marcação para CK13 em uma mesma amostra, em tecido sem (A) ou com (B) inflamação, em aumento de 10x

Gráfico 5.5 – Relação de casos positivos e com positividade na área de inflamação; o n corresponde ao número total de amostras positivas e com inflamação para cada CK

5.1 Proteína PTCH1

A reação de imunoistoquímica para o anticorpo anti-PTCH1 demonstrou padrão de marcação epitelial e citoplasmático, porém com variação nas camadas epiteliais marcadas. Foi observada positividade em todas as 40 amostras (100%). A estabilidade também foi de 100% pois todas as amostras mantiveram a mesma expressão positiva em ambos os momentos. Houve predominância de marcação em todo epitélio, seguida de marcação nas camadas suprabasais e marcação superficial. A marcação de camada epitelial também foi analisada entre os grupos. Análise estatística não apresentou significância estatística (figura 5.6, gráficos 5.6 e 5.7).

Figura 5.6 – Momento B do caso 16 demonstrando marcação de todo epitélio para PTCH1 (A) e marcação das camadas suprabasais de cistos satélites no momento B do caso quatro (B), em aumento de 40x e 10x respectivamente

Gráfico 5.6 – Relação da expressão de PTCH1 dentre as 40 amostras

Gráfico 5.7 – Porcentagem de amostras positivas, em cada grupo, para a PTCH1 em cada padrão de marcação epitelial

Apenas três casos do grupo sem recidiva e dois do grupo com recidiva não apresentaram marcação envolvendo a camada basal em nenhum dos momentos.

Dois casos, em cada um dos grupos, apresentaram marcação envolvendo a camada basal em ambos os momentos (gráfico 5.8).

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
PTCH1				X		X		X	X	X	X	X	X	X		X	X			X
	X				X	X				X		X				X		X		

Gráfico 5.8 – Descrição das amostras, em cada caso, que apresentaram marcação da proteína PTCH1 em todo o epitélio, representada pela letra X

A inflamação como possível modificador da expressão da PTCH1 também foi analisada. Para isso, os casos foram diferenciados entre sem ou com inflamação e, quando a inflamação era presente, foi verificado se a expressão se mantinha nas áreas de inflamação. Todas as 23 amostras com inflamação também eram positivas para PTCH1, representando 55% das amostras, sendo que apenas uma destas não manteve sua expressão nas áreas de inflamação (momento B do caso 17). Se analisarmos somente as amostras positivas e com inflamação, a PTCH1 manteve estabilidade de expressão nas áreas inflamadas em 95,65% dos casos (gráfico 5.8).

Gráfico 5.8 – Distribuição da associação entre presença de inflamação e manutenção da positividade para PTCH1 nas áreas de inflamação

6 DISCUSSÃO

Para entendimento do objetivo e dos resultados dessa pesquisa, algumas perguntas são importantes. Por exemplo, qual a dificuldade de diagnosticar clinicamente o tumor odontogênico queratocístico (TOQ)? Qual a dificuldade de diagnosticar histologicamente o TOQ? De que maneira a técnica de imunoistoquímica pode auxiliar no diagnóstico?

Para a primeira pergunta, é importante lembrarmos que diversas lesões podem acometer o complexo maxilofacial e apresentar características clínico-radiográficas semelhantes ao TOQ. No cotidiano, isso se reflete mais comumente na distinção entre o TOQ e o ameloblastoma unicístico, o cisto dentígero e o cisto radicular. Nem todos os TOQs têm abundância na produção de queratina a ponto dessa característica ser observada clinicamente durante uma punção aspirativa ou uma biópsia incisional, por exemplo. Isso faz com que o diagnóstico de TOQ não possa ser excluído em lesões císticas na região maxilo-mandibular que durante a punção apresentem apenas de líquido citrino.

A similaridade mais encontrada é a localização do ameloblastoma unicístico e do TOQ, mais freqüentemente na região posterior da mandíbula. Ambas as lesões também podem estar associadas com um dente incluso, assim como visto com o cisto dentígero (STOELINGA, 2005; PHILIPSEN; REICHART, 2006).

Quanto ao aspecto histopatológico, a dificuldade no diagnóstico pode ser vista principalmente pela presença de inflamação. O problema começa pelo fato de ser comum que o TOQ sofra metaplasia para um epitélio não-queratinizado, sendo a inflamação responsável pelo fato (KAPLAN; HIRSHBERG, 2004). Em um estudo

publicado por Kaplan e Hirshberg (2004) foi relatado que aproximadamente 75% dos 45 TOQs estudados apresentavam algum grau de inflamação associada, com 64% dos casos apresentando áreas de metaplasia para epitélio não-queratinizado. Segundo os autores, a inflamação pode ser explicada pelo achado freqüente de fenestrações ósseas que permitem contigüidade da lesão cística com a mucosa bucal ou mesmo por comunicação com o ligamento periodontal de dentes adjacentes à lesão. Outro estudo demonstrou que nem sempre a área escolhida para biópsia incisional é ideal, pois cerca de um terço da área epitelial total dos casos analisados de TOQ não era representativo da lesão, com metaplasia do epitélio (PADILLA; MURRAH, 2004).

Uma vez que o TOQ pode se manifestar clinicamente de forma semelhante a outras lesões císticas que acometem a região maxilofacial e sabendo-se que por vezes as características histológicas do TOQ são perdidas por fatores extrínsecos – como a inflamação, por exemplo – as pesquisas buscam maneiras de identificar o TOQ mesmo sob circunstâncias adversas. Isso se justifica frente ao comportamento mais agressivo do TOQ quando comparado a cistos odontogênicos, como o cisto dentígero e o cisto radicular, e pela possibilidade de se oferecer tratamento adequado ao TOQ com prognóstico mais favorável do que se tratado como simples lesão cística (BLANAS et al., 2000; STOELINGA, 2001; POGREL, 2005).

Quando a técnica de imunoistoquímica é aplicada ao TOQ, é necessário saber se o anticorpo selecionado tem expressão estável mesmo após manipulação e se fatores como a inflamação alterariam o seu padrão de marcação.

Pela diversidade de composição de CKs nos epitélios, cada epitélio acaba tendo um conjunto de CKs que, ao identificá-las, conseguimos lhe conferir uma identidade. Isso não tem sido diferente para lesões odontogênicas e por isso

diversos trabalhos procuram estabelecer CKs confiáveis o suficiente para caracterizar uma determinada lesão.

Neste estudo, a inflamação se mostrou presente em mais da metade das amostras. Pode-se constatar que cada CK reagiu de maneira diferente, mesmo por que, cada CK tinha um determinado número de amostras positivas associados à inflamação. Entretanto, houve uma quantidade maior de amostras com positividade associada a áreas de inflamação do que a não marcação nessas mesmas áreas, em especial para a CK10, que teve seus casos positivos com marcação associada à inflamação em 100% das amostras. Contudo, devido a ausência de diferença estatisticamente significativa, todas as CKs mantiveram-se estáveis na presença de inflamação. Já na utilização do anticorpo anti-PTCH1, a marcação se mostrou bastante estável independentemente da presença de inflamação, dado este visto pela perda da expressão da proteína PTCH1 nas áreas de inflamação em apenas um caso dos 23 casos em que havia inflamação.

Na prática clínica, isso vem confrontar os dados relatados por Padilla e Murrah (2004). Para que se entenda essa aplicabilidade, é só imaginar um caso de TOQ que tenha grande presença de inflamação e por essa razão tenha perdido sua arquitetura peculiar. Ao se aplicar a técnica de imunoistoquímica para evidênciação das CKs10 e 17, considerando os dados obtidos neste trabalho, tem-se mais de 80% de probabilidade de que a marcação seja positiva para ambas as CKs. Mesmo se houver inflamação associada, há também uma probabilidade maior de 80% de que essa positividade se reflita nessa área.

Apesar de diversos autores já terem mostrado expressão de CKs nos TOQs, nem sempre existe a preocupação quanto à estabilidade de expressão das CKs se manter após manipulação. Isso é bastante importante, pois se não houver

estabilidade, talvez os resultados negativos só sejam negativos por que as lesões foram manipuladas. A mesma linha de raciocínio se aplica às lesões positivas em biópsias incisionais, que se não houver positividade do marcador, será negativa em amostras posteriores e comprometerá a reprodutibilidade da metodologia.

Com certeza há controvérsia relacionada à expressão de CKs, pois uma expressão fraca foi encontrada neste trabalho para a CK10, diferentemente da forte expressão citada por August et al. (2000, 2003), reforçando assim a instabilidade já citada por outros autores (SHEAR, 2002; STOLL et al., 2005). De fato, August et al. (2003) demonstraram que após uma média de nove meses de manipulação, nove de 14 dos casos estudados perderam a expressão para CK10. A presente pesquisa demonstrou que apenas 65% dos casos apresentaram estabilidade para a CK10, ou seja, apenas 13 dos 20 casos tiveram os mesmo resultados para CK10 em ambos os momentos, não havendo diferença significativa entre os grupos. Porém, a CK10 parece não ser influenciada pela presença de inflamação; na presente pesquisa, todos os casos positivos com inflamação mantiveram a positividade desta CK mesmo nas áreas inflamadas.

Na literatura, apenas um trabalho foi encontrando comparando a estabilidade de expressão de CKs no TOQ, o qual avaliou a CK10 (AUGUST et al., 2003). Outros demonstraram que a CK17 foi a mais expressa nos TOQs e sugeriram que a mesma CK serviria como ferramenta de diagnóstico diferencial com cistos odontogênicos (STOLL et al., 2005). A CK17 também apresentou a maior estabilidade no presente trabalho, tendo sido negativa em apenas um caso no seu momento primário, momento este em que também foi negativo para as demais CKs estudadas. É importante notar que a preservação do tecido e sua viabilidade para imunoistoquímica foram comprovadas pela realização de marcação, pela mesma

técnica e método, para toda a família de CKs, utilizando-se o anticorpo anti-AE1/AE3.

Dois trabalhos basearam suas conclusões em resultados opostos para CK19, negativo e positivo, como ferramenta de diferenciação do TOQ de cistos odontogênicos (STOLL et al., 2005; VARGAS et al., 2007). Nos dados aqui obtidos, a CK19 apresentou estabilidade próxima à obtida pela CK10 (60% e 65%, respectivamente). Porém, dos 12 casos estáveis para CK19, oito foram negativos em ambos os momentos. Sendo assim, a previsibilidade de resultado – o comportamento esperado para uma reação imunoistoquímica – é imprecisa. Diferentemente dos trabalhos que sugeriram tanto a negatividade para CK19 (STOLL et al., 2005) quanto a positividade (VARGAS et al., 2008) em todos os casos de TOQ, os resultados aqui obtidos não conseguem sugerir previsibilidade.

Finalmente, a CK13 também se apresentou instável em 13 dos 20 casos estudados nesta pesquisa. Apesar da CK13, assim como a CK10, serem inerentes a epitélio queratinizado, não houve semelhança no resultado apresentado entre as duas CKs, mostrando que a CK13 é mesmo bastante instável e imprevisível, como já relatado anteriormente (STOLL et al., 2005).

O descobrimento da associação entre mutação do gene *PTCH1* e sua relação com a síndrome do carcinoma nevóide basocelular realmente motivou diversos estudos. Por consequência, os TOQs tanto vistos associados à síndrome, assim como os não associados, suscitaram pesquisas. Apesar da mutação do gene *PTCH1* ser mais freqüentemente identificada nos casos associados à síndrome do carcinoma nevóide basocelular, tal mutação também já foi comprovada em casos esporádicos de TOQ (BARRETO et al., 2000; OHKI et al., 2004).

Quando há mutação do gene *PTCH1*, o surgimento do TOQ está provavelmente associado a um mecanismo de haploinsuficiência desse gene. Já quando não há mutação comprovada, talvez haja mutação em outro gene da via de sinalização à qual pertence o *PTCH1*, fato esse ainda não comprovado devido ao pouco tempo de estudo dos genes envolvidos nessa via de sinalização (LEVANAT et al., 2000; SUN; LI; LI, 2008).

Já foi sugerido que, em pacientes com a síndrome do carcinoma nevóide basocelular e sem a mutação no gene *PTCH1*, deve-se investigar a possibilidade de mutação do gene *SMO*, o que levaria à produção da proteína SMO refratária à supressão exercida pela *PTCH1* (ONISCU et al., 2004). Entretanto, outros autores pesquisaram mutações do *SMO* em TOQ e, não identificando nenhuma alteração, sugeriram que tal mutação seja um evento extremamente raro (SUN; LI; LI, 2008).

A evidenciação imunoistoquímica da proteína *PTCH1* mostra-se bastante variada. O primeiro trabalho aplicado em TOQ utilizou um anticorpo produzido pelo próprio pesquisador, fato que já compromete a reprodutibilidade da pesquisa (BARRETO et al., 2002). No mesmo trabalho, pele e mucosa oral foram positivas à marcação, apesar de menos intensamente do que no resultado obtido no TOQ, o qual teve apenas marcação suprabasal. Lesões de carcinoma basocelular foram negativas ao anticorpo, fato justificado pelo autor como sendo devido à mutação do *PTCH1* e a não produção da proteína na região da lesão. Outros autores, entretanto, demonstraram negatividade de marcação de fragmentos de mucosa oral (KOCHAJI et al., 2005).

A marcação não só do epitélio, mas também do tecido conjuntivo subjacente foi descrita por Ohki et al. (2004) e reforçada por Zhang et al. (2006). Porém, durante o processo de otimização do anticorpo anti-*PTCH1* na presente pesquisa, observou-

se que a coloração do tecido conjuntivo, em especial os fibroblastos, era alterada quando o anticorpo estava muito concentrado, marcando inclusive o núcleo de células. Como se trata de uma proteína transmembrana, optou-se por incubação prévia com soro bovino por uma hora e então diluir o anticorpo até que apenas o citoplasma, e conseqüentemente o tecido conjuntivo apresentou sua aparência normalizada.

A alteração de expressão ou da função da proteína PTCH1 pode estar diretamente relacionada com o desenvolvimento do TOQ, fato este que representa um objetivo a mais nessa pesquisa, Não só é importante saber como essa proteína se comporta após a manipulação, refletindo assim na sua estabilidade, mas mais importante é tentar identificar um padrão de marcação do PTCH1 e relacionar tal marcação com prognóstico. Os dados aqui obtidos mostram que houve positividade em todas as amostras, conseqüentemente, mostrando estabilidade entre todos os casos. Além disso, praticamente todas as amostras em que havia inflamação foram positivas para a PTCH1, com exceção da amostra 17B.

Com relação ao padrão de marcação da proteína PTCH1, viu-se que mais comumente todas as camadas foram marcadas. Este é um dado de grande relevância se for comparado com a afirmação de Zedan et al. (2001) que sugeriu que se a marcação do PTCH1 envolver a camada basal, essa é uma característica de TOQs associados à síndrome, os quais têm maior velocidade de crescimento e maior índice de recidiva.

Portanto, a marcação mais freqüentemente suprabasal ainda reflete os achados descritos para os TOQs não associados à síndrome, que apresentam um comportamento mais indolente. Entretanto, a maioria das amostras apresentou marcação em todo o epitélio, incluindo então a camada basal, e estas teriam um

comportamento mais relacionado ao TOQ sindrômico. Este comportamento foi mais visto no grupo com recidiva, mas com diferença pequena (5%) comparando os grupos.

Não houve significância estatística que pudesse sugerir que o grupo com recidiva tenha mostrado comportamento mais agressivo que o grupo sem recidiva. O grupo sem recidiva não necessariamente representa lesões com comportamento menos agressivo. Uma recidiva pode ainda não ter tido tempo de se manifestar de maneira perceptível. É sabido que um paciente que tenha tido um TOQ deve ser acompanhado por tempo indeterminado, pois recidivas podem acontecer mesmo após 20 anos do tratamento inicial. Outro dado importante é que os casos do grupo com recidiva não necessariamente refletem lesões com alto poder recidivante; podem também representar lesões que foram tratadas inadequadamente no primeiro momento (ZEDAN et al., 2001; STOELINGA, 2005).

Pelo anticorpo PTCH1 ter sido positivo em diversas lesões odontogênicas, como o ameloblastoma, o cisto radicular, o cisto dentígero e o próprio TOQ, este anticorpo não pode ser utilizado como auxiliar no diagnóstico. Talvez a união entre as sugestões de Levanat et al. (2000) e Kochaji et al. (2005) seja importante; o PTCH1 está envolvido com o prognóstico da lesão, mais diretamente com sua probabilidade de recidiva, e quando apresentar marcação da camada basal, sugere um comportamento mais agressivo. Entretanto, o presente trabalho, não foi possível apresentar dados que sustentem essa teoria.

7 CONCLUSÕES

A estabilidade das CKs10 e 17 sugere que estas possam ser utilizadas associadamente na identificação do TOQ. Já as CKs13 e 19 não se mostraram estáveis, não apresentando padrão de previsibilidade de resultado que fizesse com que estas CKs pudessem ser utilizadas como auxiliar no diagnóstico do TOQ. Não houve diferença da expressão de CKs entre os grupos com ou sem história de recidiva.

O anticorpo PTCH1 demonstrou alto índice de positividade e estabilidade, viabilizando futuras pesquisas na tentativa de melhor compreensão do seu papel relacionado ao TOQ. Por meio dos dados obtidos, não foi possível relacionar a expressão do PTCH1 com o comportamento do TOQ.

REFERÊNCIAS¹

Amorim RF, Godoy GP, Galvao HC, Souza LB, Freitas RA. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Oral Dis* 2004;10(5):265-70.

August M, Faquin WC, Troulis M, Kaban LB. Differentiation of odontogenic keratocysts from nonkeratinizing cysts by use of fine-needle aspiration biopsy and cytokeratin-10 staining. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(9):935-40.

August M, Faquin WC, Troulis MJ, Kaban LB. Dedifferentiation of odontogenic keratocyst epithelium after cyst decompression. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61(6):678-83.

Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the head and neck. Lyon:IARC; 2005.

Barreto DC, Bale AE, De Marco L, Gomez RS. Immunolocalization of PTCH1 protein in odontogenic cysts and tumors. *J Dent Res* 2002;81(11):757-60.

Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH1 gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;79(6):1418-22.

Blanas N, Freund B, Schwartz M, Furst IM. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(5):553-8.

Chapelle KA, Stoelinga PJ, de Wilde PC, Brouns JJ, Voorsmit RA. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;42(5):381-90.

Chirapathomsakul D, Sastravaha P, Jansisyanont P. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(1):5-9.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de Periódicos segundo as bases Medline.

Crivelini MM, de Araújo VC, de Sousa SO, de Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis* 2003;9(1):1-6.

Coleman H, Altini M, Ali H, Doglioni C, Favia G, Maiorano E. Use of calretinin in the differential diagnosis of unicystic ameloblastomas. *Histopathology* 2001;38(4):312-7.

da Silva MJ, de Sousa SO, Correa L, Carvalhosa AA, De Araujo VC. Immunohistochemical study of the orthokeratinized odontogenic cyst: a comparison with the odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(6):732-7.

de Oliveira MD, de Miranda JL, de Amorim RF, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 2004;33(6):354-9.

Giuliani M, Grossi GB, Lajolo C, Bisceglia M, Herb KE. Conservative management of a large odontogenic keratocyst: report of a case and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(2):308-16.

Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2004;40(10):985-91.

Kochaji N, Goossens A, Geerst A, Bottenberg P. PTCH1 expression in odontogenic cysts, a cause of pathogenesis or reason for clinical complications. *Oral Oncol Extra* 2005;41(10):284-8.

Kolar Z, Geierova M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdy P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006;35(2):75-80.

Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Oresković S, Manojlović S. Involvement of PTCH1 gene in various noninflammatory cysts. *J Mol Med* 2000;78(3):140-6.

Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, Rubini C, Pieramici T, Fior A, et al. p63 expression in odontogenic cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(6):668-73.

Loescher AR, Robinson PP. The effect of surgical medicaments on peripheral nerve function. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36(5):327-32.

- Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *J Can Dent Assoc* 2008;74(2):165-165h
- Maurette PE, Jorge J, de Moraes M. Conservative Treatment Protocol of Odontogenic Keratocyst: A Preliminary Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(3):379-83.
- Meara JG, Pilch BZ, Shah SS, Cunningham MJ. Cytokeratin expression in the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(8):862-5.
- Morgan TA, Burton CC, Qian F. A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(5):635-9.
- Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, Takahashi N, Ooya K. PTC gene mutations and expression of SHH, PTC, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(6):584-92.
- Oniscu A, James RM, Morris RG, Bader S, Malcomson RD, Harrison DJ. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. *J Pathol* 2004;203(4):909-17.
- Padilla R, Murrah V. The potential for sampling error in incisional biopsies of odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(2):202.
- Philipsen HP, Reichart PA. Classification of odontogenic tumours. A historical review. *J Oral Pathol Med* 2006;35(9):525-9.
- Piattelli A, Fioroni M, Iezzi G, Rubini C. Calretinin expression in odontogenic cysts. *J Endod* 2003;29(6):394-6.
- Pogrel MA. Treatment of keratocysts: the case for decompression and marsupialization. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(11):1667-73.
- Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(4):383-408.

Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. *Oral Oncol* 2002;38(3):219-26.

Slootweg PJ. Odontogenic tumours — An update. *Curr Diagn Pathol* 2006;12(1):54-65.

Stoelinga PJ. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30(1):14-25.

Stoelinga PJ. The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with carnoy solution. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(11):1662-6.

Stoll C, Stollenwerk C, Riediger D, Mittermayer C, Alfer J. Cytokeratin expression patterns for distinction of odontogenic keratocysts from dentigerous and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34(9):558-64.

Sun LS, Li XF, Li TJ. PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *J Dent Res* 2008;87(6):575-9.

Toftgård R. Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(12):1720-31.

Upasani OS, Vaidya MM, Bhisey AN. Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. *Oral Oncol* 2004;40(3):236-56.

Vargas PA, da Cruz Perez DE, Mata GM, de Almeida OP, Jones AV, Gerhard R. Fine needle aspiration cytology as an additional tool in the diagnosis of odontogenic keratocyst. *Cytopathology* 2007;18(6):361-6.

Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* 2006;19(8):1139-47.

Zedan W, Robinson PA, Markham AF, High AS. Expression of the Sonic Hedgehog receptor "PATCHED" in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts. *J Pathol* 2001;194(4):473-7.

Zhang L, Chen XM, Sun ZJ, Bian Z, Fan MW, Chen Z. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral Oncol* 2006;42(4):398-408.

Zhao YF, Wei JX, Wang SP. Treatment of odontogenic keratocysts: a follow-up of 255 Chinese patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(2):151-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 149/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE BIOLÓGICA DO TUMOR ODONTOGÊNICO QUERACÍSTICO EM DIFERENTES MOMENTOS"**, de responsabilidade do Pesquisador **ALEXANDRE MEIRELES BORBA**, sob orientação da Professora Doutora **MARÍLIA TRIERVEILER MARTINS**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de novembro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP