ALEXANDRA FONTES DA COSTA

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS MASPIN, P63 E BCL2
EM TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO, CISTO DENTÍGERO
E AMELOBLASTOMA**

São Paulo

2007

Alexandra Fontes da Costa

**Análise imunoistoquímica das proteínas maspin, p63 e bcl2 em tumor
odontogênico queratocístico, cisto dentígero e ameloblastoma**

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: Prof^a. Dr^a. Marília Trierveiler Martins.

São Paulo

2007

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

Costa, Alexandra Fontes da

Análise imunoistoquímica das proteínas maspin, p63 e bcl2 em tumor odontogênico queratocístico, cisto dentígero e ameloblastoma / Alexandra Fontes da Costa; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2007.

72p.: tab., fig.; 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 – Proteínas – Análise imunoistoquímica 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 COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Costa AF. Análise imunoistoquímica das proteínas maspin, p63 e bcl2 em tumor odontogênico queratocístico, cisto dentígero e ameloblastoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

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

À minha mãe, que lutou por mim sempre, enquanto eu era criança, para que eu tivesse o melhor. E que agora luta ao meu lado para que eu alcance o que almejo. Exemplo de caráter e força que sempre levarei comigo.

Ao meu noivo André que com seu apoio, com sua ajuda e com seu o amor sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, compartilhando as alegrias e as tristezas durante esses 7 anos e durante os próximos 70 anos.

AGRADECIMENTOS

À **Marília**, que durante esses quase cinco anos de convivência diária foi mais do que somente minha orientadora, iniciou-me na pesquisa, corrigiu e sobe entender meus erros, apostou na minha capacidade até mesmo quando eu duvidava, me ensinou praticamente tudo que sei em pesquisa. Formamos uma parceria bem sucedida, onde o respeito sempre imperou. Talvez não conseguia exprimir em palavras toda a gratidão e admiração que tenho por você, mas espero que tenha conseguido expressar isso no dia-a-dia.

Aos professores, **Suzana, Fábio, Décio, Kárem, Marina e Andréa**, pelos ensinamentos e convivência com cada um de vocês, o que torna o dia-a-dia sempre um grande aprendizado.

À minha grande amiga **Renata** que não só esteve ao meu lado pessoalmente, mas também profissionalmente, não poderia deixar de agradecer os incontáveis momentos em que me socorreu.

À **Márcia**, uma grande e inesperada amizade surgiu entre nós, mas além disso amizade sempre esteve disposta a me ajudar nos momentos difíceis.

Aos amigos da pós-graduação: **Juliana, Patrícia, Camila, Flávia Caló, Flávia Pontes, Tatiana, Karen, Bruno, Cury, Fábio, Hélder, Roberto, Cristhiane Barbosa, Alexandre, Marina, Yonara, Kívia, Aluana, Paulo e Nathalie**.

Aos meus amigos **Thais e Paulo Brás** que nossa convivência com certeza torna tudo mais agradável.

Ao **Filipe**, a primeira pessoa com quem tive contato no departamento e que sempre esteve disposto a me ajudar e a me ensinar tudo que precisava durante todos os anos que convivemos juntos.

À **Edna e a Elisa** que foram fundamentais em todos os meus trabalhos.
Obrigada por tudo.

Zilda, Néia, Nair, Patrícia e Bia, obrigada pela paciência e pela ajuda.

À **CAPES** por seu importante apoio financeiro.

Fontes A. Análise imunoistoquímica das proteínas maspin, p63 e bcl2 em tumor odontogênico queratocístico, cisto dentígero e ameloblastoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Os cistos e tumores odontogênicos sempre tiveram grande importância dentro da Odontologia, seja pela grande prevalência clínica seja pelo grande acometimento do indivíduo afetado pela lesão. A nova classificação da Organização Mundial de Saúde trouxe a mudança de categoria do queratocisto, que recebe agora a nomenclatura de tumor odontogênico queratocístico, e que figura não mais na categoria de cisto odontogênico de desenvolvimento, mas sim de tumor odontogênico. Certa precipitação nessa mudança levou alguns autores a sugerirem a necessidade de estudos que esclareçam as características clínicas e histopatológicas dessa lesão para que se tenha uma classificação realmente precisa. O grande paradigma dessa lesão é: ao mesmo tempo em que apresenta características histológicas de um cisto, possui um comportamento clínico agressivo mais comumente observado nos tumores. O que realmente difere esta lesão das outras lesões que se inseriam no mesmo grupo é o padrão de crescimento diferenciado do tumor odontogênico queratocístico em relação às outras lesões císticas. Sendo assim, poderia se suspeitar que essa lesão possua um potencial proliferativo maior do que as outras que anteriormente pertenciam ao mesmo grupo, denotando uma regulação diferenciada do mecanismo proliferação-apoptose. Este estudo teve como objetivo comparar o tumor odontogênico queratocístico com uma lesão cística - o cisto dentígero - e com uma lesão tumoral - o ameloblastoma – por meio de marcadores imunoistoquímicos para supressão tumoral e anti-apoptose. Os resultados demonstraram

que a maior diferença entre essas lesões está principalmente na atividade apoptótica, já que somente o resultado de bcl2 foi estatisticamente significativo entre essas lesões.

Palavras-chave: Cisto; Tumor odontogênico; Supressão de tumor; Apoptose

Fontes A. Maspin, p63 e bcl2 in odontogenic keratocyst tumor, dentigerous cyst and ameloblastoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Odontogenic cysts and tumors have always had a great importance in Dentistry, for its high clinical prevail and for its noticeable invasive behavior. The new classification released by WHO rearranged keratocyst, that is named now odontogenic keratocystic tumor, classifying it no longer as a development cyst, but now as odontogenic tumor. Certain haste in this change brought some authors to suggest the necessity of more studies to clarify the features of such lesions to determine a more accurate classification. The greatest paradigm of this lesion is that it shows cyst-like histological characteristics and simultaneously it has an aggressive clinical behavior, which is more commonly observed in tumors. The main difference between this lesion and the others cystic lesions is the growth pattern, which suggests that the odontogenic keratocystic tumor has higher proliferative potential than other cystic lesions. The aim of this research was to compare odontogenic keratocystic tumor with a cystic lesion – dentigerous cyst – and with a tumoral lesion – ameloblastoma – using tumor suppressor and anti-apoptosis immunohistochemical expression. Results show that the more important difference among the analysed lesions is apoptosis activity, since only bcl2 staining was significantly different among them.

Keywords: Cyst; Odontogenic tumor; Tumor suppressor; apoptosis

SUMÁRIO

	p
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Tumor odontogênico queratocístico.....	14
2.2 Cisto dentífero.....	17
2.3 Ameloblastoma.....	19
2.4 Maspín.....	22
2.5 p63.....	25
2.6 bcl2.....	28
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Casuística e análise morfológica.....	33
4.2 Imunoistoquímica.....	34
4.3 Análise de resultados.....	35
4.4 Contagem de células.....	36
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Morfologia.....	38
5.2 Maspín.....	39
5.2.1 Tumor odontogênico queratocístico.....	39
5.2.2 Cisto dentífero.....	40
5.2.3 Ameloblastoma.....	40
5.2.4 Análise estatística.....	41
5.3 p63.....	41
5.3.1 Tumor odontogênico queratocístico.....	42
5.3.2 Cisto dentífero.....	43
5.3.3 Ameloblastoma.....	45
5.3.4 Análise estatística.....	46
5.4 bcl2.....	47
5.4.1 Tumor odontogênico queratocístico.....	47
5.4.2 Cisto dentífero.....	48
5.4.3 Ameloblastoma.....	48
5.4.4 Análise estatística.....	49

6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	72

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem, entre outras funções, o papel de homogeneizar conceitos, parâmetros e protocolos no que se refere a procedimentos e diagnósticos de doenças e enfermidades que acometem os seres humanos. Sendo assim, torna-se uma fonte confiável de dados para pesquisadores e para profissionais da saúde de todo o mundo.

Para que esses conceitos cheguem mais facilmente a todos os interessados, a OMS promove a publicação de livros nos quais são encontradas todas as informações relevantes, sendo uma das funções mais importantes dessas publicações uniformizar as classificações das doenças.

No ano de 2005, houve mais um lançamento desta coleção — um volume que trata das neoplasias de cabeça e pescoço (BARNES et al., 2005). Uma das novidades dessa publicação foi apresentar a nova classificação do queratocisto agora na categoria dos tumores odontogênicos e não mais de cisto odontogênico de desenvolvimento, recebendo a nova denominação de tumor odontogênico queratocístico (TOQ).

Casos de mudanças de conceitos, que supostamente estavam consolidados, podem gerar certa polêmica. Neste caso, embora ainda não discutida formalmente na literatura, esta nova classificação tem sido alvo de debate em diversos congressos nacionais e internacionais, apontando uma possível precipitação na mudança desta classificação e sugerindo a necessidade de mais estudos para que haja uma

reclassificação mais precisa e adequada. Esse tipo de discussão também mostra a grande quantidade de lacunas existentes no conhecimento sobre a biologia do TOQ.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A odontogênese tem início no embrião entre a sexta e a sétima semanas de vida intra-uterina, quando algumas áreas do epitélio bucal começam a proliferar numa proporção mais rápida do que as células das áreas adjacentes, formando uma faixa de epitélio que será o futuro arco dentário. A multiplicação das células epiteliais da camada basal provoca invaginação desse epitélio em direção ao ectomesênquima, que começa a sofrer uma condensação. A borda dessa banda epitelial divide-se em dois processos: um direcionado mais para vestibular – recebendo a denominação de lâmina vestibular – e outro direcionado mais profundamente (para lingual ou palatina) conhecido como lâmina dentária (TEN CATE, 2001).

Ao longo do comprimento da lâmina dentária, a atividade proliferativa contínua levará à formação de uma série de tumefações epiteliais localizadas – 10 pontos no arco superior e 10 pontos no arco inferior – que correspondem às posições dos futuros dentes decíduos. A contínua proliferação e progressiva histodiferenciação das células ectodérmicas do órgão dental e do ectomesênquima adjacente darão origem ao germe dental (TEN CATE, 2001).

Ao final da odontogênese, ocorre uma desagregação das estruturas epiteliais que participaram na formação dos diferentes tecidos do dente e espera-se que, com o crescimento, essas células paulatinamente desapareçam. Durante esse processo não é incomum os remanescentes epiteliais da odontogênese originarem lesões a partir de estímulos variados, sendo os cistos e tumores odontogênicos as mais comuns.

Cistos são patologias representadas por uma cavidade revestida por epitélio que usualmente contém em seu interior material líquido ou semi-sólido (SHAFER, 1985) e neoplasia é: massa anormal de tecido cujo crescimento é incordenado em relação aos tecidos normais e que persiste de maneira excessiva mesmo após o término do estímulo que provocou a alteração (ROBBINS et al., 1983). No entanto, para que estruturas responsáveis pela odontogênese normal participem da formação de um tumor é necessário que haja interações indutivas variadas entre o epitélio odontogênico e o ectomesênquima odontogênico (WALDROW, 2002).

Na prática, vê-se que os cistos são muito mais comuns do que os tumores odontogênicos. Possivelmente porque os cistos podem ter sua formação por meio de um mecanismo mais simples do que uma neoplasia. Independentemente da complexidade da sua formação, cada um deles possui a sua relevância, seja por uma alta incidência clínica ou por importante acometimento dos locais atingidos.

2.1 Tumor odontogênico queratocístico

Os tumores odontogênicos foram classificados pela OMS em 2005 em três grupos: tumores do epitélio odontogênico, tumores odontogênicos mistos e tumores do ectomesênquima odontogênico (BARNES et al., 2005). Os tumores do epitélio odontogênico são compostos apenas por epitélio odontogênico, sem qualquer participação do ectomesênquima odontogênico. Os tumores odontogênicos mistos são compostos por epitélio odontogênico e elementos mesênquimais. Os tumores do

ectomesênquima odontogênico são compostos principalmente pelos elementos mesênquimais. Embora o epitélio odontogênico possa ser incluído nessas lesões, ele não parece ser essencial na sua patogênese (WALDROW, 2002).

Tumor odontogênico queratocístico (TOQ) é a nova denominação do queratocisto segundo a classificação de 2005 da OMS. Esta lesão foi descrita pela primeira vez em 1956 por Phillipsen como sendo um cisto de desenvolvimento (SASTRAVAHA; JANSISYANONT; CHIRAPATHOMSAKUL, 2006). Agora, não só recebe nova denominação, como deixa o grupo dos cistos odontogênicos de desenvolvimento e passa a pertencer ao grupo dos tumores odontogênicos.

Esta é uma lesão benigna, intra-óssea, uni ou multilocular que, radiograficamente, mostra-se radiolúcida. Em geral, é assintomática e é freqüentemente descoberta em exames radiográficos de rotina. Tende a crescer no sentido ântero-posterior através dos espaços medulares do osso (BARNES et al., 2005). Tem como característica a destruição óssea local, existindo possibilidade de recorrência. Segundo estudo de Sastravaha 2006, em 5 anos, 28,6% de seus casos sofreram recidiva, tendo essa taxa diminuída para 14,3% em 10 anos. Pode ainda ter uma agressividade relevante (SHEAR, 2002a).

Acomete indivíduos em uma larga faixa etária e é mais propenso a atingir a mandíbula do que a maxila. Em geral, aparece solitariamente, porém, pode se apresentar como lesões múltiplas na síndrome do carcinoma nevóide de células basais ou síndrome de Gorlin-Goltz (GORLIN, 1987).

Histologicamente, é formado por um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com 5 a 8 camadas de células. As células da camada basal são cubóides e possuem núcleos basofílicos, em geral, com polaridade invertida. Não há

infiltrado inflamatório, e a junção epitélio-conjuntivo é normalmente plana. Na camada suprabasal, podem ser vistas algumas mitoses e algumas ilhas ou cordões e até mesmos, cistos filhotes podem ser encontrados na cápsula (BARNES et al., 2005).

Essa neoplasia tem origem no epitélio odontogênico, provavelmente nos remanescentes da lâmina dental. Sua malignização é rara, mas considerada como possível (KESZLER; PILONI, 2002; MAKOWSKY; MCGUFF; VAN SICKELS, 2001). Isso ocorreria, segundo alguns autores, devido a uma expressão anormal de genes supressores de tumor e oncogenes no epitélio de revestimento, além de uma possível alteração dos mecanismos de apoptose e de proliferação celular (LO MUZIO et al., 1999; PIATELLI et al., 2001).

Proteínas, como Ki-67, PCNA e p53, que mostram intensa positividade em lesões com alto potencial proliferativo, como é o caso das neoplasias, também estão presente em maior intensidade no TOQ do que nos cistos odontogênicos. Isso ocorre de forma mais discrepante, quando se estuda os TOQ associados à síndrome do carcinoma nevóide de células basais.

Estudos mostraram evidências de mutações, comuns em algumas neoplasias, no gene PTCH, um supressor de tumor, em TOQ associados à síndrome do carcinoma nevóide de células basais. Mutações em PTCH poderiam ser responsáveis por uma migração e por uma diferenciação anormal das células, além de serem responsáveis por uma interferência na apoptose, o programa de morte celular, o que provocaria uma desregulação da proliferação celular, podendo facilitar a carcinogênese. Mutações do gene PTCH unidas a uma superexpressão de ciclina D1 poderiam interferir no controle de proliferação do epitélio do TOQ esporádico assim como já

ocorre no associado à síndrome do carcinoma nevóide de células basais (LO MUZIO et al., 1999).

Além disso, quando comparado aos cistos odontogênicos, o TOQ mostra uma alta expressividade para fator de crescimento epitelial, mostrando potencial de crescimento diferenciado dos cistos (LI et al., 1996). Todas as evidências de mutações, de expressão de fator de crescimento e de marcadores de proliferação celular reforçariam a classificação de neoplasia benigna para o TOQ (SHEAR, 2002b).

2.2 Cisto dentígero

A categoria dos cistos odontogênicos — a qual pertencia o TOQ — é subdividida, segundo sua origem, em duas classes: os inflamatórios e os de desenvolvimento, sendo esta última a subdivisão em que o TOQ se inseria.

Os cistos inflamatórios, até pela sua origem freqüentemente vinculada ao processo de cárie, são mais comuns do que os de desenvolvimento, embora existam mais subtipos histológicos nesta última categoria. Somente os cistos de origem inflamatória têm sua etiologia conhecida, que é o estímulo dos fatores liberados pela inflamação sobre os remanescentes epiteliais da odontogênese.

Dentre os cistos de desenvolvimento, o mais comum é o cisto dentígero, que, embora não tenha sua patogênese totalmente esclarecida, pode se desenvolver a partir do acúmulo de líquido entre a coroa do dente e o epitélio reduzido do órgão do esmalte (NEVILLE et al., 2004).

Na maioria das vezes, o cisto dentígero tem pequenas proporções e não apresenta dor. A sintomatologia dolorosa pode ocorrer em casos em que há um aumento de volume devido à presença de infecção.

Radiograficamente, mostra-se como uma lesão radiolúcida, unilocular, com margens bem definidas envolvendo a coroa de um dente não erupcionado. Embora radiograficamente algumas vezes o cisto se mostre multilocular, sabe-se que, cistos dentígeros verdadeiros são macroscópica e histopatologicamente formados por uma única cavidade e que estas imagens podem ser formadas por algumas trabéculas ósseas remanescentes. Isso faz com que muitas vezes seja difícil o diagnóstico entre um cisto dentígero e um ameloblastoma unicístico (LI et al., 2000; PIATELLI et al., 1998; ROBINSON; MARTINEZ, 1977; TOZAKI; HAYASHI; FUKUDA, 2001).

As características histopatológicas do cisto dentígero variam dependendo da presença ou não de inflamação. O cisto dentígero não inflamado possui uma cápsula de tecido conjuntivo denso, frouxamente arranjado, com um revestimento epitelial composto de duas a quatro camadas de células pavimentosas não-queratinizadas, tendo plana a sua interface entre o epitélio e o conjuntivo. Já quando esse cisto apresenta-se inflamado possui uma cápsula mais colagenizada, com infiltrado inflamatório crônico podendo ser variável. O epitélio que envolve a cápsula pode estar hiperplásico com projeções epiteliais (NEVILLE et al., 2004).

2.3 Ameloblastoma

Não mais pertencendo à categoria dos cistos odontogênicos, o TOQ pertence agora ao grupo dos tumores odontogênicos, que podem ser neoplásicos ou hamartomatosos. No caso das neoplasias, elas podem ser compostas por epitélio odontogênico e/ou por ectomesênquima odontogênico, que raramente possuem um perfil maligno (BARNES et al., 2005). O ameloblastoma, o tumor odontogênico de maior significado clínico (BARNES et al., 2005), é uma neoplasia benigna, localmente invasiva de origem no epitélio odontogênico, com uma forte tendência à recidiva (MELROSE, 1999; SALO; KAINULAINEN; PARIKKA, 1999), de crescimento lento e raramente apresentando metástases (BARNES et al., 2005). Alguns autores relatam sobre a existência de ameloblastomas malignos, que atualmente têm sido subclassificados como: ameloblastoma metastático e carcinoma ameloblástico (EVERSOLE, 1999). Estudos recentes detectaram alterações genéticas nesses tipos de neoplasias, porém os mecanismos de oncogênese, citodiferenciação e progressão neoplásica ainda são obscuros (HEIKINHEIMO et al., 2002; JÄÄSKELÄINEN et al., 2002).

Os ameloblastomas originam-se de remanescentes da lâmina dentária e do órgão dental em desenvolvimento. Acomete igualmente homens e mulheres, tendo predileção por regiões posteriores da mandíbula. Acontecem em três situações clínicas mais frequentes: sólido, — o mais comum —, unicístico e periférico. Sua frequência relativa se iguala a de todos os outros tumores odontogênicos juntos, excluindo-se os odontomas (WALDROW, 2002).

Os padrões histológicos mais comuns entre os ameloblastomas do tipo sólido são o padrão plexiforme, o padrão folicular e o padrão acantomatoso.

O padrão folicular é o mais comum, e apresenta ilhas de epitélio em um estroma de tecido conjuntivo denso maduro. As ilhas de epitélio consistem em um centro constituído de células arranjadas frouxamente, circundadas por uma camada única de células colunares alongadas, com núcleos localizados em oposição à membrana basal (polaridade invertida) (SALO; KAINULAINEN; PARIKKA, 1999). Em outras áreas, as células periféricas podem ser mais cubóides e lembrar células basais. A formação cística é comum e pode variar de microcistos, que se formam nas ilhas epiteliais, a grandes cistos macroscópicos, que podem variar de alguns a muitos milímetros em diâmetro (WALDROW, 2002).

O padrão acantomatoso ocorre quando há áreas de metaplasia escamosa, muitas vezes associadas com a formação de queratina, nas porções centrais das ilhas epiteliais de um ameloblastoma folicular, o que frequentemente faz com que o confundam com um tumor odontogênico escamoso ou até mesmo com um carcinoma epidermóide (BARNES et al., 2005).

O padrão plexiforme consiste em longos cordões ou placas de epitélio odontogênico anastomosados. Esses cordões ou placas são circundados por células colunares ou cúbicas que envolvem células epiteliais arranjadas frouxamente. O estroma de sustentação tende a ser vascular e arranjado frouxamente. A formação cística é rara nessa variedade (NEVILLE et al., 2004).

Tanto os cistos como os tumores odontogênicos são de grande importância na Odontologia, seja por sua comum aparição na clínica — como é o caso dos cistos —

seja pelo importante acometimento de grandes áreas, com tratamentos difíceis e mutiladores aos quais são submetidos os pacientes.

O padrão de crescimento destas lesões se mostra como um grande diferencial entre elas. Diversos estudos com marcadores de proliferação celular - como Ki-67 e IPO-38 - demonstraram que lesões com comportamento clínico mais invasivo possuem maiores taxas de proliferação, mostrando índices bem inferiores desses marcadores no cisto dentígero em relação ao ameloblastoma, por exemplo, (MATTHEWS, MASON, BROWNE, 1988; THOSAPORN, IAMAROON, PONGSIRIWET, 2004). Além disso, outro fator que colabora para determinar certo percurso de uma lesão é o índice de apoptose. Na presença de marcadores anti-apoptóticos na camada basal de uma lesão o esperado seria a formação de uma massa tumoral causada por uma proliferação celular não combatida pela morte celular, porém a manutenção dos índices de apoptose nas camadas superficiais é fundamental para impedir este processo. Como relatado por Kichi et al., 2005 sobre a não-formação de uma massa sólida de células e sim de uma cavidade cística no TOQ. Mesmo possuindo níveis de bcl2 elevados na camada basal o TOQ possui um alto índice de apoptose nas células da superfície, o que impediria de crescer como uma massa sólida.

O poder de crescimento de uma lesão seria então consequência do equilíbrio da relação entre os responsáveis por suprimir o crescimento e os responsáveis por promover o crescimento. Alguns autores descrevem que os padrões de crescimento das lesões estão relacionados com um padrão anormal de expressão de genes supressores de tumor e de oncogenes, o que alteraria os processos de apoptose e de proliferação celular (LO MUZIO et al., 1999; PIATELLI et al., 2001). Ou seja, a carcinogênese depende da capacidade das células de se proliferar e à capacidade da

apoptose em frear o crescimento desordenado destas células, o que o torna, um importante mecanismo de homeostase do tecido (LO MUZIO et al., 1999; KIMI et al., 2001). Porém, como citado anteriormente, a maioria das pesquisas realizadas neste campo não tem se focado muito nestes processos, deixando uma lacuna a ser preenchida.

Atualmente, existem vários métodos que podem ser utilizados para o estudo dos processos de proliferação e de apoptose. Sem dúvida, um dos mais consagrados é a imunoistoquímica, método pelo qual por meio de uma reação antígeno-anticorpo, pode-se verificar a presença de determinadas proteínas presentes em um tecido. Hoje, há uma vasta gama de opções de anticorpos capazes de detectar as mais diversas proteínas. Além disso, este método tem a grande vantagem de estudar a proteína alvo *in situ*, em uma célula com as interações célula-célula e da célula com o estroma, sofrendo os mesmo processos do tecido como um todo, o que não ocorre, por exemplo, na cultura de células ou no método de PCR, no qual, as células ou o DNA são estudados separadamente do conjunto.

2.4 Maspin

Maspin (do inglês: Mammary Serine Protease Inhibitor) é uma proteína pertencente à superfamília das serpinas, que são inibidoras de proteinases. Sua história é relativamente recente, tendo seu primeiro relato em 1994, quando foi observada em

células epiteliais de tecido mamário saudável e, em seguida, em tecido mamário neoplásico (ZOU et al., 1994).

Após esse primeiro estudo a proteína maspin foi detectada em diversos outros tecidos normais, como nos testículos, na próstata, no timo, nos intestinos, na pele, na placenta e na cavidade oral (PEMBERTON et al., 1997; REIS-FILHO et al., 2002), além de estar presente ainda, com variação em sua expressão, em vários tipos de carcinomas como próstata, ovário, pulmão, tireóide, intestino e oral (AKIYAMA et al., 2003; KIM et al., 2004; SOOD et al., 2002; YASUMATSU et al., 2001).

Vários estudos demonstram uma alta expressão dessa proteína em células epiteliais normais, diminuída em neoplasias e ausente em metástases (MAASS et al., 2001b; ZOU et al., 1994).

Já se demonstrou em carcinomas de mama e de próstata, que quanto mais alto o nível de maspin encontrado nas células epiteliais do tumor, menos agressivo ele se apresenta (SHENG et al., 1996; ZOU et al., 1994;). Alguns estudos em câncer de cabeça e pescoço (XIA et al., 2000; YASUMATSU et al., 2001) e carcinoma de mama (HOJO et al., 2001; MAASS et al., 2001a) relacionaram a presença de maspin com um melhor prognóstico. Segundo estudo realizado por Xia et al. (2000), tem-se que a alta expressão da proteína maspin possui uma significativa associação com uma maior sobrevida dos pacientes em estágios avançados de carcinoma epidermóide. Em outro estudo, agora realizado por Yasumatsu et al. (2001), também se relacionou o prognóstico com a expressão da proteína e constatou-se que o decréscimo em sua expressão era um fator significativo no aumento do potencial de metástase em carcinoma epidermóide de língua nos estágios I e II.

Além disso, tem-se tentado relacionar o prognóstico da doença com a presença de maspin no citoplasma ou no núcleo das células. No caso de carcinoma de laringe, a localização nuclear da maspin foi relacionada com um bom prognóstico (MARIONI et al., 2005). Essa localização também melhoraria a resposta de células tumorais à quimioterapia (DIETMAIER et al., 2006).

Já foi demonstrado que as alterações de expressão de maspin não estão associadas a mutações do gene, embora alterações da região promotora tenham sido identificadas, ZHANG et al. (1997), demonstraram que os sítios Ets e Ap1, presentes na região promotora do gene, estão ativados em células normais e inativados em neoplasias malignas.

A desregulação epigenética participa freqüentemente da carcinogênese por meio da inibição de supressores de tumor em associação com a hipermetilação do DNA. Vários estudos mostraram que alterações no estado de metilação da região promotora do gene maspin ocorrem em diferentes patologias. A hipermetilação desse gene provoca seu silenciamento em diversos tipos de carcinomas, como mama, tireóide, pele e cólon (BETTSTETTER et al., 2005; BOLTZE et al., 2003; REIS-FILHO et al., 2002), e pode ser um dos responsáveis pelo aparecimento precoce de câncer de mama (FUTSCHER et al., 2004). Há ainda indícios de que a proteína p53 poderia regular diretamente a expressão de maspin e de que um aumento dessa regulação em estágios precoces da progressão neoplásica poderia aumentar a sensibilidade das células a apoptose (JIANG et al., 2002, LIU et al., 2004). Em situações nas quais a p53 estivesse inativada, essa regulação poderia se dar através da proteína p63 (SPIESBACH et al., 2005).

Mais recentemente, alguns estudos apontam para outras funções da maspin como modular a apoptose através dos níveis de proteínas da família bcl 2 em neoplasias de mama, por meio de um bloqueio parcial feito pela maspin nos inibidores das caspases 8 e 9 (ZHANG; SHI, ZHANG, 2005); impedir a osteólise e dificultar as metástases em casos de carcinoma de próstata, por meio da interferência da maspin na uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase) (CHER et al., 2003).

O estudo da apoptose em células de neoplasia de mama mostrou que, quando os níveis de bcl2 aumentavam na célula, como resposta, havia também um aumento da expressão de maspin, que elevava os níveis de proteínas pró-apoptóticas da família bcl2. Essas proteínas promoveriam uma maior liberação do citocromo c, que ativaria as vias das caspases 8 e 9, cujos inibidores estariam bloqueados pela maspin, opondo-se ao estímulo anti-apoptótico da alta expressão de bcl2 (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005).

2.5 p63

A proteína p63 pertence à mesma família das proteínas p53 e p73, todas elas codificadas pelo mesmo gene, reconhecidamente importante na carcinogênese (BOURDON et al., 2005; MILLS, 2005; MOLL; SLADE, 2004). Essa proteína possui duas isoformas conhecidas, que podem ter alguma diferença funcional, a TAp63 e a Δ Np63. Cada uma dessas isoformas possui promotores diferentes, o que aumenta a

complexidade do mecanismo de atuação dessa proteína (BENARD; DOUC-RESY; AHOMADEGBE, 2003).

A p63 é essencial ainda na morfogênese epidermal, incluindo a formação de anexos como dentes, cabelos, glândulas mamárias e lacrimais (MOLL; SLADE, 2004). Possui também importante papel no desenvolvimento e na proliferação epitelial de diversas estruturas, como, as crânio-faciais (TSUJITA-KYUTOKU et al., 2003). Também é responsável pelo programa inicial de estratificação epitelial (KOSTER et al., 2004). Em estudo feito em combaias livres de p63, demonstrou-se que os fetos nasceram vivos, mas com graves conseqüências no desenvolvimento crânio-facial, assim como na estratificação do epitélio da cavidade oral, da pele, do esôfago, da mama, da uretra e da próstata (CHEN; HSUE; LIN, 2003).

Por pertencerem à mesma família, a p63 e a p53 possuem funções muito parecidas, até mesmo no papel que exercem na apoptose, sendo que a p63 seria fundamental nos processos de apoptose mediados pela p53 (FLORES et al., 2002). Embora haja uma grande semelhança estrutural e funcional entre as duas, existem também diferenças importantes. Por exemplo, a p53 freqüentemente está mutada nas neoplasias em humanos, o mesmo não ocorrendo com a p63, que possui seu gene preservado em casos de neoplasias (LIEFER et al., 2000; MOLL; SLADE, 2004; WESTFALL et al., 2005). Mutações ou deleções são raramente relacionadas ao gene p63, fazendo com que não seja considerado um gene supressor de tumor clássico (MOLL; SLADE, 2004). Muito pelo contrário, na maioria das neoplasias, a expressão da proteína está mantida e, em algumas situações, está até mesmo sobreexpressa.

Em neoplasias que mostraram redução nos níveis de p63, sugere-se que esse fato esteja relacionado a uma aceleração do processo de carcinogênese (KOGA et al., 2003; URIST et al., 2002).

Além dos estudos de p63 relacionados à carcinogênese, existem também estudos que observam o papel dessa proteína em lesões não malignas, que apresentam como comportamento clínico serem localmente invasivas e recidivantes, como é o caso dos ameloblastomas, patologia na qual a p63 esteve expressa tanto nos casos benignos quanto naqueles que provocaram metástase, que obtiveram expressão semelhante à das células do germe dental (KUMAMOTO; OHKI; Ooya, 2005). No TOQ que também apresenta esse perfil clínico de invasividade local e recidivas, a p63 esteve positiva e dispersa por todo o epitélio (LO MUZIO et al., 2005). Quando se comparou a expressão de p63 em lesões de TOQ com e sem recidiva mostrou-se que nos casos em que não houve recidiva, a p63 se manteve expressa nas camadas basal e parabasal, enquanto naquelas lesões em que houve recidiva a expressão foi por todas as camadas (FOSCHINI et al., 2006).

Tanto a maspin quanto à p63 são consideradas supressores de tumor, interferindo direta ou indiretamente na carcinogênese. Estudos vêm demonstrando que essa característica estaria ligada à relação que ambas podem ter no processo de apoptose, porém em situações diferentes (FLORES et al., 2002; ZHANG; SHI; ZHANG, 2005).

No caso de lesões odontogênicas, nas quais pode haver tanto um processo restrito quanto um processo expansivo, esses mecanismos de supressão tumoral e de apoptose podem estar presentes. Afinal, um crescimento exacerbado pode denotar a incapacidade dos mecanismos de supressão tumoral e de morte celular de agir

eficientemente nesta situação. Sendo assim, lesões com padrões de crescimento tão diferentes como o cisto dentífero e o ameloblastoma devem possuir comportamentos diferentes também em relação à expressão de supressores de tumor e da intensidade do processo de apoptose.

2.6 bcl2

A família bcl2 é dividida em dois grupos: os anti-apoptóticos (bcl2, bcl2L1, bcl-XL e boo entre outros) e os pró-apoptóticos (bax, bak, bad, bid e bok entre outros).

Os genes anti-apoptóticos produzem proteínas, dentre elas a bcl2, que inicialmente são encontradas na membrana da mitocôndria, na membrana do retículo endoplasmático e até mesmo no núcleo (THOMADAKI; SCORIAS, 2006). O papel destas proteínas é estabilizar a membrana mitocondrial, prevenir a liberação do citocromo c e, subseqüentemente, ligar-se ao Apaf-1 (fator de ativação da apoptose) (COSULICH, SAVORY, CLARKE, 1999; KLUCK et al., 1997). Ao contrário das proteínas anti-apoptóticas, as pró-apoptóticas localizam-se no citosol ou no citoesqueleto. Quando há algum sinal de morte, elas tendem a interagir com as anti-apoptóticas, anulando suas funções e ativando assim a maquinaria da apoptose.

Bcl2 é um proto-oncogene, identificado pela primeira vez em linfomas B não-Hodking (TSUJIMOTO et al., 1984). Promove a carcinogênese prevenindo a morte e aumentando a taxa de divisão celular, contendo a célula na fase G0/G1 do ciclo celular (GUO; HAY, 1999). A expressão de proteínas inibidoras de apoptose é induzida por

vários estímulos, como drogas quimioterápicas (SRINIVAS et al., 1998), queda do fator de crescimento neural ou corticóides (KOBZDEJ et al., 2000).

O gene *bcl2* produz uma proteína, de mesmo nome, de 26 KDa com um único domínio hidrofóbico em C-terminal, que possibilita a sua localização na parte externa da membrana mitocondrial e, em menor extensão, do envelope do retículo endoplasmático (THOMADAKI; SCORIAS, 2006). Ela possui, em sua estrutura química, todos os domínios BH, sendo que BH1, BH2, BH3 constituem a parte hidrofóbica por meio da qual ela se liga às proteínas pró-apoptóticas, formando homo ou heterodímeros (DANIAL; KORSMEYER, 2004; OPFERMAN; KORSMEYER, 2003;).

É expressa em uma grande variedade de tecidos fetais, entretanto, em adultos, sua expressão é restrita a células com proliferação e diferenciação mais rápida. Altos níveis de *bcl2* são detectados em células B maduras, em muitos neurônios em desenvolvimento de ratos, em timo, e em poucas células de córtex, de fígado e de linfonodo assim como em jovens células embrionárias de rim (MERRY et al., 1994).

Nas glândulas mamárias, é expressa em não-grávidas ou em grávidas em período inicial e perde sua expressão em grávidas em período adiantado de gestação (SCHORR et al., 1999).

O gene *bcl2* pode ser altamente regulado por interleucina 7 ou pela proteína p53 (SLEE; O'CONNOR; LU, 2004; VON FREEDEN-JEFFRY et al., 1997). Entretanto, quando este é regulado pela fosforilação do resíduo Ser mediado pela via da MAPkinase ou pela via CPP32, ele perde sua atividade anti-apoptótica (HARADA et al., 1997).

Tem sido reportado que, em células de mamíferos, a *bcl2* se liga à Apaf-1, seqüestrando a caspase 9, o que promoveria o bloqueio do início da cascata

proteolítica. Em vários casos, a bcl2 age prevenindo a ruptura da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c, inibindo mais tarde a associação com a Apaf-1 e, conseqüentemente, a ativação da caspase 9 (COSULICH, SAVORY, CLARKE, 1999).

Imunoistoquimicamente a bcl2 tem se mostrado positiva em carcinomas de nasofaringe, de pulmão, de intestino, de próstata, de mama e da cavidade oral (LORO et al., 1999; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2005).

Embora a expressão de bcl2 seja encontrada em diversos tipos de carcinoma, sabe-se que sua presença também é importante na formação de estruturas de tecidos saudáveis, já que a bcl2 está expressa, igualmente, tanto no epitélio normal quanto no carcinoma de língua em estagio inicial (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2005). O mesmo acontece na tubulogênese do sistema urinário, em que a presença de bcl2 é fundamental para a formação de ductos durante o período embrionário, porém pode ser responsável pela formação de cistos nesse mesmo sistema quando há uma superexpressão durante outras fases.

Altas taxas de bcl2 são responsáveis pelo desenvolvimento da doença renal cística (NAGATA et al., 1996). Ou seja, da mesma maneira que a alta expressão de bcl2 é importante nos estágios iniciais da tubulogênese, a mesma alta expressão contribui para a cistogênese em estágios nos quais esse sistema já está maduro.

Embora seja uma proteína bastante pesquisada, raros são os estudos direcionados a lesões de origem odontogênica. Esta proteína foi alvo de estudo em TOQ onde bcl2 foi expressa apenas na camada basal e no cisto dentígero onde raros casos mostraram alguma expressão de bcl2, porém a amostra utilizada foi pequena e o estudo não tinha como objetivo comparar as duas lesões (KICHI et al., 2005).

Sendo assim, embora a bcl2 seja um anti-apoptótico e inicialmente possa ser relacionada apenas à parte nociva de sua função, estudos demonstram que, no período adequado essa função é necessária, e muitas vezes essencial.

Na tentativa de melhor esclarecer lacunas no conhecimento sobre o TOQ, seria importante um estudo que comparasse o essa lesão com lesões pertencentes ao seu atual e ao seu antigo grupo de classificação. Dentre as lesões pertencentes a estes grupos poderíamos citar como uma lesão reconhecidamente cística o cisto dentígero e como uma lesão sabidamente neoplásica, o ameloblastoma.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem por objetivo estudar as expressões imunoistoquímicas das proteínas maspin, p63 e bcl2 em tumores odontogênicos queratocísticos e comparar os achados com a expressão das mesmas proteínas em ameloblastomas e cistos dentígeros.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme parecer de aprovação número 161/06 (ANEXO A).

4.1 Casuística e análise morfológica

Para este estudo foram selecionados 20 casos de cada uma das lesões — tumor odontogênico queratocístico (TOQ), cisto dentígero e ameloblastoma — pertencentes aos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. O material encontrava-se fixado em formol e emblocado em parafina.

Foi feita uma seleção prévia da amostra através de estudo morfológico em cortes de 5 µm corados pelo método da hematoxilina e eosina, optando-se por aqueles com os aspectos histopatológicos mais representativos das três lesões.

4.2 Imunoistoquímica

Para a realização das reações imunoistoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-maspin (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), anti-p63 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) e anti-bcl2 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) separadamente. Foram preparados, a partir do material embocado em parafina, cortes de 3µm, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas para aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lâmina. 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, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica, feito com as lâminas totalmente imersas em solução de ácido cítrico 10mM, 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 imerso em solução de TRIS pH 7,6, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na seqüência 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 e foram incubados sobre os cortes durante 30 minutos. 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 min 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. Todos os passos desde a utilização dos anticorpos primários até a contracoloração foram realizados automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

4.3 Análise de resultados

As reações de imunoistoquímica foram analisadas semi-quantitativamente, considerando-se cada uma das camadas do epitélio isoladamente e, logo após, o epitélio como um todo, recebendo cada corte uma graduação final. As células foram consideradas positivas ou negativas para o marcador, sendo obedecida uma graduação para a análise da quantidade de células marcadas. Sendo:

- 0: sem positividade
- Grau 1: até 5% das células positivas;
- Grau 2: de 5 a 50% das células positivas;

- Grau 3: mais de 50% das células positivas.

4.4 Contagem de células

Os resultados para a proteína p63 foram analisados, também, quantitativamente, tendo a positividade sido considerada somente em células que apresentavam marcação de coloração acastanhada no núcleo da célula, e não se considerando a diferença de intensidade da cor.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz com aumento final de 400x, sob um foco fixo e com clareza de campo. As imagens obtidas foram transferidas para um monitor de TV acoplado a um sistema computadorizado, que permite a individualização do campo através da utilização do *software* Imagelab-Softium desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO), do Departamento de Estomatologia da FOU SP.

O sistema computadorizado utilizado consiste de um processador Pentium 200MHZ com placa de aquisição de imagem. As imagens do campo foram obtidas em um microscópio de luz LABORLUX-LEITZ, acoplado a um sistema de câmera JVC, modelo TK 870U e transferidas para um monitor de TV MULTISYNC M700.

Após a transferência de imagem para o monitor, foi realizada a contagem manual das células positivamente marcadas para a proteína p63. Os campos analisados foram selecionados na região do tecido que histopatologicamente apresentavam mais característica da lesão estudada. A contagem foi estabelecida em:

positiva para as células que apresentavam a marcação e negativa para as células que não apresentavam coloração acastanhada. Um total de pelo menos 500 células foram contadas em cada caso.

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

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) mas apresentando, em muitos casos áreas de espessamento. A camada basal era formada por células epiteliais colunares dispostas em paliçada e a camada de paraqueratina era fina e corrugada. Envolvendo a periferia do epitélio, observou-se tecido conjuntivo, na sua maior parte denso, mas por vezes pouco colagenizado. A relação epitélio/conjuntivo mostrou-se plana em todos os casos. Com freqüência foi observado infiltrado inflamatório mononuclear em áreas focais do tecido conjuntivo de suporte.

Os casos de cisto dentígeros eram representados por uma cápsula cística constituída por tecido conjuntivo denso e revestido por epitélio estratificado com poucas camadas de cúbicas ou pavimentosas. Quando presente, o infiltrado inflamatório crônico era, geralmente discreto, e em áreas restritas da cápsula.

Os casos de ameloblastoma selecionados pertenciam apenas aos subtipos folicular e plexiforme. No subtipo folicular as ilhas neoplásicas eram representadas por dois tipos celulares: na periferia das ilhotas células colunares dispostas em paliçada e com núcleos de polaridade invertida, e no centro as células adotavam um padrão frouxo

de disposição e morfologia estrelária, emitindo muitas projeções citoplasmáticas. Por vezes observava-se degeneração cística ou metaplasia escamosa no centro das ilhotas. No subtipo plexiforme essas ilhas neoplásicas se intercomunicavam formando grandes plexos e trabéculas. O estroma era constituído por tecido conjuntivo denso que exibia, muitas vezes, infiltrado inflamatório mononuclear discreto e difuso.

5.2 Maspin

Todos os casos estudados, das três lesões, apresentaram marcação para a proteína maspin, sendo que o padrão de marcação foi nuclear e citoplasmática ou somente citoplasmática.

5.2.1 Tumor odontogênico queratocístico

Dos 20 casos de TOQ selecionados para o estudo da expressão da proteína maspin, todos receberam graduação 3, sendo que 19 casos obtiveram marcação de quase todas as células. A marcação no TOQ apresentou-se tanto nuclear quanto citoplasmática, sendo alguns casos somente citoplasmática (Figura 5.1A).

Embora rara, a presença de inflamação não mostrou nenhuma interferência na marcação.

5.2.2 Cisto dentífero

Dos 20 casos de cisto dentífero selecionados para o estudo da expressão da proteína maspin, todos foram graduados em 3, sendo que 17 destes apresentaram todas as células positivas.

O padrão de marcação da proteína maspin no cisto dentífero foi citoplasmático em todos os casos (Figura 5.1B).

A presença de inflamação não mostrou nenhuma variação no padrão de marcação para esta proteína.

5.2.3 Ameloblastoma

Dos 20 casos selecionados de ameloblastoma para o estudo da expressão imunoistoquímica da proteína maspin, todos mostraram-se positivos, tanto nas células da camada basal quanto nas células arranjadas mais frouxamente ao centro. Essa positividade foi graduada em 3, sendo que, na maioria dos casos, quase a totalidade das células apresentaram marcação (Figura 5.1C).

Nos casos em que foi possível observar pequenas ilhas de células neoplásicas isoladas na periferia da lesão, estas foram totalmente negativas para a proteína maspin (Figura 5.1D).

Não foi possível notar diferença no padrão de marcação dentre os subtipos histológicos estudados — o plexiforme e o folicular. Áreas de metaplasia escamosa exibiram exuberante marcação para essa proteína, enquanto áreas de degeneração cística importante mostraram redução da marcação nas camadas superiores.

Em relação à localização da marcação encontrada, a maioria dos casos obteve marcação de núcleo e citoplasma, com alguns casos apresentando marcação citoplasmática.

5.2.4 Análise estatística

Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão da proteína maspin tanto no TOQ comparado ao cisto dentífero quando no TOQ comparado com ao ameloblastoma (teste Kruskal-Wallis, $p>0.5$).

Figura 5.1 - marcação imunoistoquímica para a proteína maspin. A - tumor odontogênico queratocístico; B - cisto dentígero; C - ameloblastoma; D - ilhotas neoplásicas da periferia do ameloblastoma negativas para o marcador (todas 200X no original)

5.3 p63

Todos os casos estudados, independentemente do tipo de lesão, demonstraram algum tipo de positividade para esta proteína, e sempre com o padrão de marcação nuclear.

5.3.1 Tumor odontogênico queratocístico

Na análise semiquantitativa, dos 20 casos de TOQ selecionados para o estudo da expressão da proteína p63, 6 receberam graduação 3, 10 graduação 2 e 4 graduação 1. Todos os casos graduados como 1 e 2 obtiveram marcação restrita às camadas do terço inferior do epitélio. Já para a análise quantitativa a porcentagem de células variou de 1 a 80% e os dados podem ser analisados na Tabela 5.1 (Figura 5.2A).

Nas lesões que apresentavam a presença de cistos filhotes, estes se mostravam intensamente positivos.

Observou-se ainda que lesões que possuíam o padrão histológico típico do TOQ obedeciam a uma marcação quase que exclusivamente na camada basal. A presença de inflamação não mostrou nenhuma variação no padrão de marcação para esta proteína.

Tabela 5.1- p63 porcentagem de células marcadas positivamente para a proteína p63 no tumor odontogênico queratocístico

Caso	Nº de Células		%
	Positivas	Total	
1	208	512	40,6
2	101	505	20
3	16	530	3
4	357	510	70
5	5	500	1
6	204	508	40,1
7	420	525	80
8	108	540	20
9	101	501	20,1
10	209	522	40
11	372	530	71,6
12	205	507	40,4
13	416	520	80
14	315	515	61,1
15	350	500	70
16	21	524	4
17	205	508	40,3
18	180	502	35,8
19	155	506	30,6
20	16	512	3,1

5.3.2 Cisto dentífero

Na análise semiquantitativa, dos 20 casos de cisto dentífero selecionados para o estudo da expressão da proteína p63, 12 foram graduados em 3, sendo que somente 3 casos obtiveram positividade em todas as células, 4 casos obtiveram graduação 2, e 4 obtiveram graduação 1. Já para a análise quantitativa a porcentagem

de células variou de 1 a 100% e os dados podem ser analisados na Tabela 5.2 (Figura 5.2B).

Nos locais em que o epitélio se apresentava com duas camadas de células, a marcação era sempre negativa.

A presença de inflamação não mostrou nenhuma variação no padrão de marcação para esta proteína.

Tabela 5.2- p63 porcentagem de células marcadas positivamente para a proteína p63 no cisto dentífero

Caso	Nº de Células		%
	Positivas	Total	
1	500	500	100
2	500	500	100
3	500	500	100
4	370	522	70,8
5	245	517	47,3
6	428	533	80,3
7	102	507	20,1
8	12	509	2,3
9	200	502	39,8
10	330	551	59,8
11	460	511	90
12	455	505	90
13	312	519	60,1
14	309	514	60,1
15	305	503	60,6
16	245	510	48
17	6	515	1,1
18	22	536	4,1
19	465	506	91,8
20	20	524	3,8

5.3.3 Ameloblastoma

No grupo de ameloblastomas selecionados para o estudo da expressão imunoistoquímica da proteína p63, houve heterogeneidade da marcação. Na análise quantitativa a porcentagem de células variou de 1 a 100% e os dados podem ser analisados na Tabela 5.3 (Figura 5.2C).

Na análise semiquantitativa, metade dos casos estudados receberam graduação 3, apenas 4 dos 10 casos graduados como 3 obtiveram marcação em todas as células, tendo os outros 6 casos uma porcentagem em torno de 75% de células positivas na análise quantitativa.

Em 8 dos 20 casos estudados, a graduação recebida foi 2, a média das porcentagens de células marcadas desses casos ficou em torno de 39% na análise quantitativa. O padrão de marcação neste grupo foi de positividade das células da camada basal e negatividade das células mais centrais.

Apenas 2 casos dentre os 20 demonstraram raras células positivas para esta proteína (graduação 1). Nas áreas de metaplasia escamosa e nas ilhotas mais distantes (Figura 5.2D), a expressão de p63 foi negativa.

Não foi possível notar diferença no padrão de marcação dentre os subtipos histológicos estudados — o plexiforme e o folicular.

Tabela 5.3- p63 porcentagem de células marcadas positivamente para a proteína p63 no ameloblastoma

Caso	Nº de Células		%
	Positivas	Total	
1	500	500	100
2	500	500	100
3	500	500	100
4	500	500	100
5	227	506	44,6
6	335	511	65,5
7	249	521	47,7
8	257	534	48,1
9	234	520	45
10	420	514	81,7
11	5	505	0,9
12	335	507	66
13	348	509	68,3
14	255	518	49,2
15	8	542	1,4
16	205	512	40
17	156	519	30
18	255	523	48,7
19	355	503	70,5
20	450	501	89,8

5.3.4 Análise estatística

Não houve diferença estatisticamente significativa na análise semiquantitativa da expressão da proteína p63, tanto no TOQ comparado ao cisto dentífero quando no TOQ comparado com ao ameloblastoma (teste Kruskal-Wallis, $p>0.5$), o mesmo

acontecendo na análise quantitativa (teste t de Student $p > 0.5$) Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre as lesões, tanto na análise semiquantitativa quanto na análise quantitativa, houve uma maior diferença entre a média dos postos entre o TOQ e o cisto dentígero do que entre o TOQ e o ameloblastoma.

Figura 5.2 - marcação imunoistoquímica para a proteína p63. A - tumor odontogênico queratocístico; B - cisto dentígero; C - ameloblastoma; D - ilhotas neoplásicas da periferia do ameloblastoma negativas para o marcador (todas 200X no original)

5.4 bcl2

Todos os casos estudados, de todas as lesões, obtiveram algum tipo de marcação para essa proteína. Nos casos de marcação de grau 1, a expressão foi restrita à camada basal na maioria dos casos. Quando a expressão de bcl2 atingia camadas mais altas era devido a um acompanhando ao espessamento do epitélio. O padrão de marcação foi exclusivamente citoplasmático.

5.4.1 Tumor odontogênico queratocístico

Dos 20 casos de TOQ selecionados para o estudo da expressão da proteína bcl2, nenhum foi graduado em 3, 16 receberam graduação 2 e 4 receberam graduação 1.

Nos casos com graduação 1, toda a marcação foi restrita à camada basal do epitélio. Já nos que receberam a graduação 2, quando era observado um espessamento do epitélio camadas mais superiores obtiveram marcação. Inflamação não foi um fator representativo na mudança de padrão de marcação para esta proteína (Figura 5.3A).

5.4.2 Cisto dentífero

Dos 20 casos de cisto dentífero selecionados para o estudo da expressão da proteína bcl2, 14 obtiveram graduação 3, sendo 13 destes casos possuíam todas as células positivas para o marcador. Quatro casos receberam graduação 2 e 2 tiveram graduação 1 (Figura 5.3B).

A presença de inflamação não mostrou nenhuma variação no padrão de marcação para esta proteína.

5.4.3 Ameloblastoma

Dos 20 casos de ameloblastoma selecionados para o estudo da proteína bcl2, 19 obtiveram graduação 3, sendo que todas as células destes foram positivas para a marcação imunoistoquímica (Figura 5.3C). Essa positividade incluiu as ilhotas de epitélio odontogênico localizadas mais distantes do centro da lesão (Figura 5.3D) . Apenas 1 caso obteve graduação 2 sendo que as células marcadas positivamente estavam dispersas por toda lesão.

5.4.4 Análise estatística

Houve diferença estatisticamente significativa tanto entre o TOQ e o cisto dentífero quanto entre o TOQ e o ameloblastoma. Porém, houve uma diferença ligeiramente maior entre o TOQ e o ameloblastoma do que entre o TOQ e o cisto dentífero (teste de Kruskal-Wallis $p < 0.5$)

Tabela 5.4 – Porcentagem de casos positivos para cada uma das proteínas estudadas nas três lesões

Proteína	Lesão	1	2	3
maspin	TOQ	0%	0%	100%
	Cisto dentífero	0%	0%	100%
	Ameloblastoma	0%	0%	100%
p63	TOQ	20%	50%	30%
	Cisto dentífero	20%	20%	60%
	Ameloblastoma	10%	40%	50%
bcl2	TOQ	20%	80%	0%
	Cisto dentífero	10%	20%	70%
	Ameloblastoma	0%	5%	95%

Figura 5.3 - marcação imunoistoquímica para a proteína bcl2. A - tumor odontogênico queratocístico; B - cisto dentígero; C - ameloblastoma; D - ilhotas neoplásicas da periferia do ameloblastoma positivas para o marcador (todas 200X no original)

6 DISCUSSÃO

Para se compreender o comportamento clínico de uma lesão é necessário que se entenda o seu caráter biológico. Alguns paradoxos aparecem quando o caráter biológico não consegue explicar o comportamento clínico. Isso é perfeitamente aplicável ao tumor odontogênico queratocístico (TOQ) em que suas características histopatológicas não são compatíveis com seu comportamento . Por isso havia uma certa polêmica sobre essa lesão mesmo antes da mudança promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Alguns autores já levantavam a hipótese de o TOQ não ser um cisto e sim uma neoplasia (LO MUZIO et al., 2005; SHEAR, 2002a, 2002b, 2002c). Embora alguns estudos tenham sido feitos na tentativa de preencher as dúvidas existentes sobre essa lesão, não existe ainda um consenso, talvez porque na maioria desses estudos o TOQ não seja o principal alvo de interesse e apareça como uma entre outras lesões estudadas (KICHI et al., 2005; LO MUZIO et al., 2005; THOSAPORN, IAMAROON, PONGSIRIWET, 2004). Essa falta de consenso pode ser a razão de a nova classificação da OMS não ter sido tão aceita e sugerindo-se a necessidade de mais estudos para que realmente haja um maior conhecimento sobre o comportamento biológico dessa lesão.

A mudança de categoria sofrida pelo TOQ é atribuída ao fato de seu comportamento destoar das outras lesões do mesmo grupo, já que possui um caráter de invasividade local e pode alcançar maiores dimensões do que a média dos cistos. Essas características demonstrariam uma capacidade de crescimento diferenciado

desta lesão em que os mecanismos de proliferação e apoptose estejam sendo regidos de uma maneira diferente. A presença do equilíbrio entre o crescimento, a diferenciação e a morte celular é importante para a homeostase de qualquer organismo (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993).

Se a característica mais discrepante do TOQ em relação às outras lesões císticas é o padrão de crescimento, o mais importante seria é compreender os mecanismos controladores desse processo, sejam eles por meio da estimulação da proliferação celular sejam por meio do impedimento da apoptose, por qualquer das vias haverá a promoção do crescimento permitindo que a lesão alcance um caráter mais expansivo e muitas vezes agressivo.

Cada uma das lesões estudadas neste trabalho possui um padrão de crescimento específico: o ameloblastoma apresenta atividade proliferativa intensa comum às neoplasias; já o cisto dentígero possui um potencial proliferativo bem mais restrito, o que caracteriza sua natureza cística.

Possuir um potencial proliferativo mais ou menos intenso pode estar diretamente relacionado com o equilíbrio proliferação-apoptose. Na regulação desse mecanismo podem agir diversos fatores que estimulam ou inibem cada um desses processos. São várias as proteínas que tanto podem agir no impedimento da proliferação através de mecanismos de supressão tumoral como podem agir promovendo o crescimento através da inibição da apoptose.

Em lesões que possuem variantes malignas como é o caso do ameloblastoma, segundo alguns autores, ocorreria uma expressão anormal de genes supressores de tumor e oncogenes no epitélio de revestimento, provocada por uma

interferência nos processos de apoptose e proliferação celular (LO MUZIO et al., 1999; PIATELLI et al., 2001).

Por isso o conhecimento sobre os componentes que pertencem à regulação dos processos biológicos também é fundamental para que se consiga desvendar lacunas ainda obscuras no conhecimento das lesões. A comparação entre as lesões aqui estudadas poderia ser um meio pelo qual tentar-se-ia solucionar algumas dúvidas em relação às suas diferenças comportamentais. Entre os recursos mais utilizados com esta finalidade está a imunoistoquímica.

Alguns estudos já tiveram como objetivo comparar várias lesões odontogênicas (KICHI et al., 2005; LO MUZIO et al., 2005; THOSAPORN, IAMAROON, PONGSIRIWET, 2004). Lo Muzio et al. (2005) estudaram a presença de p63 no TOQ e em outras lesões odontogênicas císticas, observando uma maior intensidade de p63 em TOQ em relação a outras lesões o que ajudaria a explicar o comportamento mais agressivo desta lesão se comparada com as demais. Ainda em relação à p63, esta foi estudada em ameloblastomas e esteve tão expressa nos benignos quanto nos que provocaram metástases (KUMAMOTO; OHKI; OOYA, 2005).

Em contrapartida aos supressores de tumor, que freiam o crescimento, têm-se os marcadores de anti-apoptose, como o bcl2, que impedem a morte celular colaborando para o aumento da proliferação. Bcl2 também teve suas expressões estudadas em lesões odontogênicas císticas. Estudo com TOQ e com o cisto dentígero mostraram a positividade de bcl2 na camada basal do TOQ e de sua pequena expressão no cisto dentígero (KICHI et al., 2005).

Porém, um estudo que reunisse ameloblastoma, TOQ e cisto dentígero com objetivo de comparar a expressão de proteínas supressoras de tumor e anti-apoptóticas

ainda não figura entre as publicações existentes. Maspin, p63 e bcl2 estão direta e indiretamente relacionadas entre si. Existem fortes indícios do papel da p53 na regulação da proteína maspin e a p63 poderia em algumas situações substituir p53 nessa regulação (SPIESBACH et al., 2005). Assim como a maspin poderia modular a apoptose atuando nos níveis de bcl2, por meio de um bloqueio parcial nos inibidores das caspases 8 e 9 (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005). Ou seja, a p63 substituindo a p53 na regulação de maspin e a proteína maspin regulando os níveis de apoptose atuando na expressão de bcl2.

Embora a proteína maspin seja cada vez mais estudada em diversos tipos de carcinoma e venha ganhando um importante status de marcador prognóstico, não há estudos de lesões de origem odontogênica com esta proteína (AKIYAMA et al., 2003; BETTSTETTER et al., 2005; BOLTZE et al., 2003; KIM et al., 2004; MARIONI et al., 2005; REIS-FILHO et al., 2002; SOOD et al., 2002; YASUMATSU et al., 2001). Mesmo sendo uma proteína com grande variabilidade de expressão nas diversas lesões estudadas, a maspin mostrou neste estudo um mesmo padrão de marcação em todas as lesões. Sua expressão foi graduada em 3 em todos os casos de todas as lesões e a monotonia da marcação chamou a atenção.

Embora o ameloblastoma, assim como as outras lesões, tenha se mostrado intensamente positivo, as ilhotas mais distantes do centro da lesão, que possuem um potencial invasivo maior, foram negativas para a marcação de maspin. Isso sugeriria que os locais com maior poder de invasividade teriam a função supressora de tumor desta proteína comprometida. Assim como uma das principais funções da maspin é a interferência na motilidade, sua ausência pode facilitar o desprendimento das células destas ilhotas e a invasividade da neoplasia.

A diferença de expressão da p63, assim como da maspin, não foi estatisticamente significativa entre as lesões estudadas. Porém, no caso da p63, a heterogeneidade da marcação foi um marco. A expressão da p63 foi heterogênea tanto dentro de cada tipo de lesão quanto entre as lesões. No TOQ, a expressão da p63 seguiu um certo padrão, no qual a maioria dos casos mostrou positividade nas camadas basal e parabasal, assim como o já relatado na literatura em estudo com TOQ com e sem recidiva, no qual os casos que não apresentaram recidiva também tinham sua expressão restrita a essas camadas (FOSCHINI et al., 2006). Em outro estudo com TOQ, essa marcação foi difusa por todas as camadas, sendo que as camadas superiores dessa lesão sempre foram negativas para a marcação (LO MUZIO et al., 2005).

A marcação de p63 nos ameloblastomas obteve em sua maioria graduações 2 e 3 com bastante heterogeneidade. Assim como no caso da expressão da maspin, na p63, também houve a negatividade das ilhotas mais distantes, com potencial mais invasivo. Ou seja, já que se sugere que a p63 exerça algum papel na regulação da maspin (SPIESBACH et al., 2005), talvez a ausência das duas proteínas nessas células possa ser um fenômeno interligado.

Dentre todas as lesões, a que mais recebeu graduação 3 para p63 foi o cisto dentígero, sendo que a camada mais superficial mostrou-se negativa.

De todos os marcadores estudados, o único que apresentou diferença estatisticamente significativa na sua expressão nas três patologias foi o bcl2. Houve maior diferença entre o TOQ e o ameloblastoma do que entre o TOQ e o cisto dentígero. Sendo que a diferença entre o ameloblastoma e o cisto dentígero foi praticamente a mesma do que a diferença entre o ameloblastoma e o TOQ.

A expressão de bcl2 no TOQ foi restrita às camadas basal e parabasal, aquelas que possuem maior índice proliferativo do epitélio. Esse padrão já foi observado em outro estudo, no qual notou-se que a proteína bcl2 tinha sua presença restrita à camada basal do TOQ (KICHI et al., 2005). A expressão da bcl2 na camada parabasal só ocorreu nos casos em que se notava um espessamento do epitélio. Quando o epitélio apresentava-se normal, essa expressão era restrita à camada basal.

A expressão de bcl2 no ameloblastoma foi muito exuberante, sendo que apenas um caso não recebeu graduação 3. As ilhotas de epitélio odontogênico, que se mostraram negativas para os marcadores de supressão tumoral, mostraram positividade para bcl2 equivalente ao restante da lesão. Os resultados são coerentes ao afirmarem que, no local onde o crescimento da lesão é mais ativo, há o desaparecimento da expressão dos supressores de tumor e uma superexpressão do marcador anti-apoptótico. Ou seja, o crescimento da lesão é favorecido pelo estímulo anti-apoptótico e pela ausência da função supressora do crescimento.

No caso do cisto dentígero, houve também uma expressão de bcl2 intensa, ao contrário, do que Kichi et al. (2005) mostraram em seu estudo, em que raros casos de cisto dentígero mostraram marcação, representada por poucas células. Porém, esse mesmo autor sugere que a apoptose está significativamente envolvida no processo de formação do cisto, sendo que a apoptose acontece também ao final da diferenciação da pele e dos queratinócitos orais (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; MARUOKA; HARADA; MITSUYASU, 1997; MCCALL; COHEN, 1991). A literatura relacionada à tubulogênese renal também mostra que a bcl2 tem função essencial na formação dos tubos do sistema renal durante a embriogênese, e que, durante a fase adulta, a superexpressão

dessa proteína provocaria a formação de cistos nesse mesmo sistema, provocando até mesmo doenças com características císticas (NAGATA et al., 1996).

Como a homeostase de um tecido depende da regulação balanceada da proliferação, da diferenciação e da morte celular é natural que, quando ocorra a desregulação de alguns desses mecanismos, alterações sejam favorecidas.

Nos casos das lesões aqui estudadas, sugere-se que os índices de apoptose tenham um valor maior do que os de supressores de tumor. Principalmente os que não possuem mutações e se mostraram muito parecidos em todas as lesões. A literatura mostra a necessidade da apoptose tanto quanto da proliferação, porém, em algumas situações, um aumento da apoptose em um período adequado se torna fundamental para o desenvolvimento normal de determinadas estruturas (NAGATA et al., 1996; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2005).

Isso nos permite sugerir que a superexpressão de bcl2 possa ser responsável pela formação da cavidade cística do cisto dentífero, mas os mecanismos de supressão tumoral, também bastante exacerbados, inibem a progressão dessa lesão. O fato de no TOQ, a expressão de bcl2 ser restrita às camadas mais baixas sugere que, diferentemente de muitas neoplasias, a proliferação no TOQ está restrita à camada basal, ou seja, aquela que tem a função fisiológica de se dividir para manter o epitélio. Já a presença de apoptose nas camadas superficiais do epitélio do TOQ, observada em estudo com o método de TUNEL, garante a formação de um cisto e não de uma massa sólida de células (KICHI et al., 2005).

A malignização do ameloblastoma e do TOQ, embora rara, mostra um padrão anormal da expressão dos genes supressores de tumor e oncogenes nessas lesões (LO MUZIO et al., 1999; PIATELLI et al., 2001). A intensa presença de bcl2 no

ameloblastoma não teria uma contrapartida eficaz dos supressores de tumor, o que provocaria uma proliferação celular não balanceada por morte celular, já que existe um grande estímulo anti-apoptótico que provavelmente não é controlado corretamente pelos supressores de tumor, formando assim uma massa mais compacta, mas constituída também por cistos.

Sendo assim, segundo as expressões dessas proteínas e dos aspectos clínicos o TOQ estaria mais próximo do cisto dentífero do que ameloblastoma.

7 CONCLUSÃO

A partir da análise quantitativa e qualitativa, nenhuma das proteínas mostrou-se eficaz na função de diferenciar as lesões de tumor odontogênico queratocístico, de cisto dentífero e de ameloblastoma.

REFERÊNCIAS¹

- Akiyama Y, Maesawa C, Ogasawa S, Terashima M, Masuda T. Cell-type-specific repression of the maspin gene disrupted frequently by demethylation at the promoter region on gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *Am J Pathol* 2003;163(5):1911-9.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lion: IARC Press; 2005.
- Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003;21(3):182-91.
- Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rummele P, Blaszyk H, Hartmann A. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol* 2005;205(5):606-14.
- Boltze C, Scheneider-Stock R, Quedow C, Hinze R, Mawrin C, Hribaschek A et al. Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer. *J Mol Med* 2003;12(4):479-84.
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005;19(18):2122-37.
- Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *Oral Dis* 2003;9(5):235-40.
- Cher ML, Biliran HR, Bhagat S, Meng Y, Che M, Lockett J et al. Maspin inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(13):7847-52.¹

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

Cosulich SC, Savory PJ, Clarke PR. Bcl-2 amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol* 1999;9(3):147-50.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116(2):205-19.

Dietmaier W, Bettstetter M, Wild PJ, Woenckhaus M, Rummele P, Hartmann A, et al. Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2247-54.

Eversole LR. Malignant epithelial odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1999;16(4):317-24.

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, Mckeeon F, Jacks T. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002;416(6880):560-4.

Foschini MP, Cocchi R, Marucci G, Pennesi MG, Magrini E, Ligorio C et al. High DeltaNp63 isoform expression favours recurrences in odontogenic keratocyst--odontogenic keratocystic tumour. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(7):673-5.

Futscher BW, O'Meara MM, Kim CJ, Rennels MA, Lu D, Gruman LM, et al. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. *Neoplasia* 2004;6(4):380-9.

Gorlin RJ. Nevroid basal- cell carcinoma syndrome. *Medicine(Baltimore)* 1987;66:98-113.

Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(6):745–52.

Haake AR, Polakowska RR. Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol* 1993;101(2):107-12.

Harada K, Ishibashi S, Miyashita T, Osuga J, Yagyu H, Ohashi K, et al. Bcl-2 protein inhibits oxysterol-induced apoptosis through suppressing CPP32-mediated pathway. *FEBS Lett* 1997;411(1):63-6.

Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I et al. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res* 2002;81(8):525-30.

Hojo T, Akiyama Y, Nagasaki K, Maruyama K, Kikuchi K, Ikeda T et al. Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. *Cancer Lett* 2001;171(1):103-10.

Jääskeläinen K, Jee KJ, Leivo I, Saloniemi I, Knuutila S, Heikinheimo K. Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136(1):31-7.

Jiang N, Meng Y, Zhang S, Mensah-Osman E, Sheng S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21(26):4089-98.

Keszler A, Piloni MJ. Malignant transformation in odontogenic keratocysts. Case report. *Med Oral* 2002;7(5):331-5.

Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):280-6.

Kim S, Han J, Kim J, Park C. Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. *Cancer Res* 2004;64(19):6900-5.

Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2001;30(7):434-42.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275(5303):1132-6.

Kobzdej M, Matuszyk J, Ziolo E, Strzadala L. Changes in glucocorticoid-induced apoptosis and in expression of Bcl-2 protein during long-term culture of thymic lymphoma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000;48(1):43-6.

Koga F, Kawakami S, Fujii Y, Saito K, Ohtsuka Y, Iwai A et al. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5501-7.

Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev* 2004;18(2):126-31.

Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of p63 and p73 in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2005;34(4):220-6.

Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY. Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1385-92.

Li TJ, Browne RM, Prime SS, Paterson IC, Matthews JB. P53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. *J Oral Pathol Med* 1996;25(5):249-55.

Liu J, Yin S, Reddy N, Spencer C, Sheng S. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. *Cancer Res* 2004;64(5):1703-11.

Liefer KM, Koster MI, Wang XJ, Yang A, Mckeen F, Roop DR. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res* 2000;60(15):4016-20.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res* 1999;78(7):1345-53.

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.

Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 1999;30(9):1097–105.

Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. Clin Biochem 2001a;34(4):303-7.

Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, JonaT W, Nagasaki K, et al. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. J Pathol 2001b;195(3):321-6.

Makowski GJ, McGuff S, Van Sickels JE. Squamous cell carcinoma in a maxillary odontogenic keratocyst. J Oral Maxillofac Surg 2001;59(1):76-80.

Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G et al. Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. Histopathology 2005;46(5):576-82.

Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T. Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. Biochem Biophys Res Commun 1997;238(3):886-90.

Matthews JB, Mason GI, Browne RM. Epithelial cell markers and proliferating cells in odontogenic jaw cysts. J Pathol 1988;156(4):283-90.

McCall CA, Cohen JJ. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. J Invest Dermatol 1991;97(1):111-4.

Melrose RJ. Benign epithelial odontogenic tumors. Semin Diagn Pathol 1999;16(4):271-87.

Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. Development 1994;120(2):301-11.

Mills AA. p53: link to the past, bridge to the future. Genes Dev 2005;19(18):2091-9.

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res 2004;2(7):371-86.

Nagata M, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Loh D, Watanabe T. Apoptosis during an early stage of nephrogenesis induce renal hypoplasia in bcl-2-deficient mice. *Am J Pathol* 1996;148(5):1601-11.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003;4(5):410-5

Pemberton PA, Tipton AR, Pavloff N, Smith J, Erickson JR, Mouchabeck ZM et al. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. *J Histochem Cytochem* 1997;45(12):1697-706.

Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubinic C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncol* 1998;34(5):408-12.

Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. p53 protein expression in odontogenic cysts. *J Endodod* 2001;27(7):459-61.

Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. Maspin expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *Virchows Arch* 2002;441(6):551-8.

Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Pathol* 2005;86(6):375-81.

Robbins SL, Cotran RS, Hinz MK, Barnet ML, Tomich CE. *Patologia estrutural e funcional*. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1983.

Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. *Cancer* 1977;40(5):2278-85.

Salo T, Kainulainen T, Parikka M. Expression of laminin-5 in ameloblastomas and human fetal teeth. *J Oral Pathol Med* 1999;28(8):337-42.

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

Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999;4(2):153-64.

Shafer WG. *Tratado de patologia bucal*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1985.

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

Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocystic: is it a benign cystic neoplasm? Part 2: Proliferation and genetic studies *Oral Oncol* 2002b;38(4):323-31.

Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocystic: is it a benign cystic neoplasm? Part 3: Immunohistochemistry of cytokeratin and the epithelial cell markers. *Oral Oncol* 2002c;38(5):407-15.

Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93(21):11669-74.

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004;23(16):2809-18.

Sood EA, Fletcher MS, Gruman LM, Coffin JE, Jabbari S, Khalkhali-Ellis Z et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2924-32.

Spiesbach K, Tannapfel A, Mossner J, Engeland K. Tap63gamma can substitute for p53 in inducing expression of the maspin tumor suppressor. *Int J Cancer* 2005;114(4):555-62.

Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, Panicker KR, Pillai MR. Bcl-2 protein and apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Med* 1998;1(4):755-9.

Ten Cate AR. *Histologia bucal*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: function and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(1):1-67.

Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis* 2004;10(1):22-6.

Tozaki M, Hayashi K, Fukuda K. Dynamic multislice helical CT of maxilomandibular lesion distinction of ameloblastoma from other cystic lesions. *Radiol Med* 2001;19(5):225-30.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226(4678):1097–9.

Tsujita-Kyutoku M, Kiuchi K, Danbara N, Yuri T, Senzaki H, Tsubura A. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 2003;30(1):11-7.

Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 2002;161(4):1199-206.

Von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997;7(1):147–54.

Waldrow CA. Odontogenic cysts and tumors. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM et al. eds. *Oral & maxillofacial pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002.

Westfall MD, Joyner AS, Barbieri CE, Livingstone M, Pietenpol JA. Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle* 2005;4(5):710-6.

Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000;19(20):2398-403.

Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, et al. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001;23(11):962-6.

Zhang M, Maass N, Magit D, Sager R. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. *Cell Growth Differ* 1997;8(2):179-86.

Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. *BMC Cancer* 2005;5(1);50.

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 1994;263(5146):526-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 161/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **“Análise imunoistoquímica das proteínas maspin, p63, Bcl2 e ssDNA e estudo comparativo dos índices de apoptose pelo método de TUNEL em ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico e cisto dentigero”**, de responsabilidade da Pesquisadora **Alexandra Fontes da Costa**, 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 2006

Prof.Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP