GABRIEL FUKUNAGA KATO

Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRB em
ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos

São Paulo

2015

GABRIEL FUKUNAGA KATO

**Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRB em
ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos**

Versão Original

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 e Estomatologia
Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2015

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.

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

Kato, Gabriel Fukunaga.

Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRB em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos / Gabriel Fukunaga Kato ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2015.

55 p. : fig., tab. ; 30 cm.

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

Versão original.

1. Ameloblastoma. 2. Tumores odontogênicos. 3. p53. 4. pRB. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Kato GF. Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRB em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos pacientes e aos colegas cirurgiões-dentistas que, diante das incertezas inerentes aos processos neoplásicos que acometem a cavidade oral, buscaram tais respostas através do saber científico e da prática clínico-laboratorial pertinentes à Patologia Bucal.

A minha querida mãe pelo meu imenso carinho, respeito e imensa gratidão. Além de seu exemplo pessoal, profissional e constante incentivo para a atividade universitária.

Ao meu querido pai, pelo meu imenso carinho, respeito e imensa gratidão. Obrigado por ter me apoiado e acreditado nas minhas decisões profissionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, pela acolhida à minha orientação e à total disponibilidade para a transmissão da formação inerente ao ensino e pesquisa pertinentes à respectiva Pós-Graduação.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada, cujos conhecimentos e experiências compartilhadas foram fundamentais para trilhar o curso de mestrado.

Aos docentes da disciplina de Estomatologia Clínica, em especial ao Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves, pelo pleno incentivo à dedicação aos estudos em Patologia Bucal, bem como pela continuidade dos estudos em nível *Stricto sensu*.

Às colegas Nathalia Paiva, Talita Cardoso, Maria Luiza Watanabe, Cristina Carvalhaes, Flavia Rosin, cujo trabalho em conjunto e convivência ao longo do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) no 1º semestre de 2014 junto a disciplina de Patologia Oromaxilofacial foi extremamente enriquecedor para a formação enquanto futuro docente.

Às biólogas Eliza Santos, Adriana Costa e Juvani Saturno, pelo imenso comprometimento com suas funções e total solidariedade ao longo das atividades laboratoriais que desempenhei durante o mestrado.

Aos meus pais, Flávio e Regina, minha plena gratidão em especial ao total apoio às minhas decisões quanto à carreira profissional e aos seus encorajamentos que tanto me foi necessário para persistir e perseverar durante o curso de mestrado.

Ao meu irmão, Rafael, minha imensa admiração por sua força, exemplo de superação e integridade que, serviu-me de inspiração e motivação para enfrentar os desafios inerentes da vida.

Aos colegas de convívio acadêmico durante a trajetória iniciada na Iniciação Científica que acompanharam as minhas conquistas acadêmicas que

tornaram possível a realização do objetivo de ingresso no mestrado: Rodrigo do Nascimento Lopes e Ana Paula Molina Vivas, atuais dentistas titulares no Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center; Luana E. Bomfin, egressa da área de concentração em Patologia Bucal da FOUSP; Ana Paula Silva, egressa do Programa de Pós-Graduação do A.C. Camargo Cancer Center.

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica Aplicada: Luis Pagotto, Priscila Tobouti, Lilian Quirino, Bruno Sedassari, Gabriela Nagata, Lara Gimenez, Douglas Magno, Carina Esteves, Theo Coferai, Rogerio Duarte, Daniella Antunes e tantos outros demais colegas deste riquíssimo grupo, ensejo minha máxima estima pelo sucesso profissional e minha eterna gratidão pelo convívio acadêmico enriquecedor durante meu período enquanto aluno de mestrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Tumores odontogênicos: conceitos clínico-patológicos de acordo com a classificação da OMS	13
2.2 Proteína p53	15
2.3 pRB e as 'proteínas-bolsos'	17
2.4 'Cross-talk' entre os genes RB1 e p53 na regulação do ciclo celular	19
2.5 Ameloblastoma	21
2.6 Tumor Odontogênico Queratocístico	24
2.7 Marcadores imuno-histoquímicos em tumores odontogênicos relacionados ao ciclo celular e genes supressores de tumor: anti- p53 e anti-pRB	26
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Caracterização do estudo	29
4.2 Critério de inclusão	29
4.3 Critério de exclusão	29
4.4 Coleta de dados clínicos	30
4.5 Ensaio de imuno-histoquímica	30
4.6 Quantificação	32
4.7 Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Achados clínicos e histopatológicos	37

5.2 Achados imuno-histoquímicos	37
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	44
Referências	45
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	52
Anexo B – Dados clínicos e histopatológicos	54
Anexo C – Contagem das imuno-marcações para os anticorpos anti-p53 e anti-pRB	55

RESUMO

Kato GF. Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRB em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

Tumores odontogênicos constituem grupo abrangente de afecções tumorais, sendo ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos as lesões benignas de maior frequência, cujas características biológicas são pouco conhecidas. Objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil imuno-histoquímico das proteínas pRB e p53 em ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico. Foram avaliadas amostras de material parafinado de 21 casos de ameloblastoma e de 20 casos de tumor odontogênico queratocístico para ensaio de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-pRB e anti-p53. A contagem da imuno-marcação foi realizada a partir de fotografias de alta resolução processadas no software ImageJ para quantificação manual em campo de 1000 células. A localização da imuno-marcação para ambos anticorpos foi semelhante, sendo em ameloblastomas predominantemente nas células da periferia e, em tumores odontogênicos queratocísticos, nas camadas suprabasais. Quantitativamente, as porcentagens de células marcadas foram estatisticamente maior nos ameloblastoma para anti-p53 ($p=0,01$) e maior nos tumores odontogênicos queratocísticos para anti-pRB ($p=0,04$). Não houve correlação estatística entre a porcentagem de células marcadas para anti-p53 e anti-pRB nos ameloblastomas, porém, esta correlação foi positiva e moderada nos tumores odontogênicos queratocísticos ($r=0,537$; $p=0,018$). Nota-se ligeira diferença na quantificação das imuno-marcações para o anti-p53 e anti-pRB. Tais resultados devem ser ponderados pela reduzida casuística, porém, sugerem perfis distintos em mecanismos biológicos determinantes para ambos os tumores.

Palavras-chaves: Ameloblastoma. Tumores odontogênicos. p53. pRB.

ABSTRACT

Kato GF. Evaluation of immunohistochemistry expression of the proteins p53 and pRB in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumor [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

Odontogenic tumors are a comprehensive group of tumor diseases, being ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors the most frequent benign odontogenic tumors. Their biological characteristics are little known. The aim of present study was to evaluate the immunohistochemical profile of pRB and p53 proteins in 21 cases of ameloblastomas and 20 cases of keratocystic odontogenic tumors for anti-pRB and anti-p53 antibodies. The quantification of immunostaining was performed manually with high-resolution photographs processed in the ImageJ software to quantify positive cells in a 1000 cells-field. The location of immunostaining for both antibodies was similar. In ameloblastomas, positive cells are located mainly in the peripheral layers, whereas in keratocystic odontogenic tumors the positive cells are located in the suprabasal layers. Quantitatively, the percentage of labeled cells was statistically higher in ameloblastomas for anti-p53 ($p = 0.01$) and higher in keratocystic odontogenic tumors for anti-pRB ($p = 0.04$). There was no statistical correlation between the percentage of labeled cells to anti-p53 and anti-pRB in ameloblastomas, however, its correlation was positive and moderate in keratocystic odontogenic tumors ($r = 0.537$; $p = 0.018$). It is possible to identify a slight difference in immuno-quantification for anti-p53 and anti-pRB among these lesions. These results must be pondered by the small sample, however, it suggests a different profile in a preponderant key biological mechanisms for odontogenic tumors.

Keywords: Ameloblastoma. Odontogenic tumors. p53, pRB

1 INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos compõem um amplo grupo de neoplasias de comportamento benigno e maligno e apresentam sua biologia relacionada à embriogênese das estruturas do órgão dentário. São neoplasias que acometem exclusivamente os tecidos relacionados ao complexo buco-maxilo-facial, e que podem comprometer a função das estruturas dento-maxilares, bem como a estética da face. A compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos na patogênese dos tumores odontogênicos ainda está longe de ser obtida. Certamente a compreensão desses fenômenos contribuiria para melhor definir o tratamento e o prognóstico dessas neoplasias.

O ameloblastoma e o tumor odontogênico queratocístico são atualmente consideradas como duas neoplasias odontogênicas, sendo o ameloblastoma localmente infiltrativo, e o tumor odontogênico queratocístico por vezes localmente agressivo. Entre os processos que podem ser estudados para o entendimento desse comportamento clínico e dos mecanismos envolvidos com a progressão dessas neoplasias, está a participação de genes supressores de tumor. As proteínas p53 e pRB são supressoras tumorais que, em condições fisiológicas, atuam na regulação do ciclo celular, por exemplo.

Pode-se considerar que o estudo conjunto da imuno-marcação de ambas as proteínas nos ameloblastomas e nos tumores odontogênicos queratocísticos possa favorecer um melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese destes tumores odontogênicos, em decorrência do papel destas proteínas na regulação do ciclo celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, a revisão de literatura busca elucidar os aspectos clínico-patológicos e as respectivas proteínas de estudo para o presente trabalho, p53 e pRB, em meio aos mecanismos biológicos que podem atuar na patogênese destes tumores odontogênicos.

2.1 Tumores odontogênicos: conceitos clínico-patológicos de acordo com a classificação da OMS

De forma abrangente, tumores odontogênicos caracterizam-se do ponto de vista clínico como lesões primárias de manifestação exclusiva às estruturas buco-maxilo-facial, sendo tanto de ocorrência intra-óssea como exofítica. Abrange um grupo heterogêneo de neoplasias, sendo que a detecção destas lesões odontogênicas pode ocorrer rotineiramente por meio de incidências radiográficas com a identificação de imagens radiográficas de aspecto radiolúcido ou misto, uni- ou multilocular. A confirmação diagnóstica dos tumores odontogênicos dá-se obrigatoriamente por meio do exame anátomo-patológico atentando à morfologia microscópica do espécime analisado. De forma ampla, a excisão cirúrgica trata-se da principal abordagem terapêutica e a de maior efetividade (Barnes et al., 2005; Henriques et al., 2009; Servato et al., 2013).

De acordo com a classificação da OMS em 2005, a classificação dos tumores odontogênicos envolve tanto as neoplasias malignas (carcinomas e sarcomas odontogênicos), como as neoplasias benignas oriundas de diferentes folhetos

embrionários do órgão dentário, sendo: tumores com epitélio odontogênico e tecido conjuntivo maduro; tumores com epitélio odontogênico e presença de ectomesênquima com ou sem presença de formação duro; tumores do mesênquima e/ou do ectomesênquima odontogênico, com ou sem presença de epitélio odontogênico (Barnes et al., 2005).

A manifestação de tumores odontogênicos malignos é rara, sendo que a respectiva classificação para as neoplasias odontogênicas malignas envolvem as afecções: ameloblastoma metastatizante, carcinoma ameloblástico (tipo primário e secundário; intraósseo ou periférico), carcinoma primário de células escamosas (tipo sólido, derivado de tumor odontogênico queratocístico, derivado de cisto odontogênico), carcinoma odontogênico de células claras e carcinoma odontogênico de células fantasmas (Barnes et al., 2005). Há relatos de ocorrência de malignização de tumores odontogênicos benignos, ainda que rara tal ocorrência, havendo tal manifestação em ameloblastoma, fibroma ameloblástico e tumor odontogênico queratocístico (Clayman, 2003; Mosqueda-Taylor et al., 2003; Goldenberg et al., 2004). Quanto aos tumores odontogênicos epiteliais benignos, as neoplasias odontogênicas com estroma maduro sem envolvimento do ectomesênquima odontogênico são as neoplasias mais frequentes, destacando-se o ameloblastoma e o tumor odontogênico queratocístico dentre os tumores odontogênicos epiteliais mais frequentes (Osterne et al., 2011; Servato et al., 2013). Nesta categoria, estão incluídos o tumor odontogênico escamoso, o tumor odontogênico adenomatóide e o tumor odontogênico epitelial calcificante (Barnes et al., 2005).

As neoplasias odontogênicas que se inserem na classificação de tumores com epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico com ou sem formação de tecido duro são os tumores denominados mistos epiteliais e ectomesenquimais, sendo o fibroma ameloblástico, o fibro-odontoma ameloblástico, o odontoma (composto e complexo), o odontoameloblastoma, o tumor odontogênico cístico calcificante e o tumor dentinogênico de células fantasmas as neoplasias incluídas nesta divisão. O odontoma trata-se de um hamartoma consiste no tumor odontogênico mais comum (Barnes et al., 2005).

Na classificação de tumores odontogênicos oriundos do mesênquima e/ou ectomesênquima odontogênico com ou sem envolvimento do epitélio odontogênico inclui-se as seguintes neoplasias: o fibroma odontogênico, o cementoblastoma e o mixoma odontogênico (Barnes et al., 2005).

Ainda que a abordagem diagnóstica para as lesões com suspeita de neoplasias odontogênicas esteja bem delineada quanto às classificações histológicas e as respectivas características clínicas relacionadas, estudos quanto ao comportamento biológico envolvidos nestas neoplasias mostra-se de fundamental relevância para um maior entendimento da biologia do tumor.

Desta forma, tais avanços podem futuramente favorecer o delineamento de terapias adjuvantes ao tratamento cirúrgico frente a prováveis marcações a alvos moleculares específicos (Jhamb; Kramer, 2014).

As proteínas p53 e pRB são supressoras tumorais, que podem ser elencadas como prováveis marcadores que corroborem uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese destes tumores odontogênicos, pela participação na regulação do ciclo celular.

2.2 Proteína p53

Neste contexto, o gene p53 trata-se do marcador mais investigado dentre diversos cânceres, sendo identificado mutações em mais de 75% dos casos de carcinomas invasivos e consiste na mutação mais frequentemente identificada em diferentes neoplasias, estimada em 50% das neoplasias humanas (Golubovskaya; Cance, 2013).

Mapeado em 17p13.1, o gene p53 é descrito como o 'guardião do genoma', devido a sua função de reparação de erros e danos na estrutura do DNA, durante a interrupção do ciclo celular na fase de transição G1/S, garantindo estabilidade

genética por meio de um 'ponto de checagem' de erros na estrutura do DNA (Pllegata et al., 1996).

Em homeostase celular e na ausência de estímulos de dano ao DNA, os níveis de p53 tendem a ser baixos devido a rápida degradação por MDM2, que consiste em um regulador da transcrição do gene p53 (Polager; Ginsberg, 2009).

Em estresse celular, a proteína p53 é ativada por diversos mecanismos pós-traducionais para estimulação da atividade do p53, induzindo a ativação de cascatas de sinalização reguladas pelo p53 que participam de fenômenos biológicos relacionados ao ciclo celular e apoptose. Uma vez ativado o gene p53, inicia-se série de cascatas de transcrição, dentre eles, a ligação da proteína p53 a uma sequência específica de DNA responsável ao p53. Um dos eventos que esta ligação do p53 a sequencias responsáveis é a parada do ciclo celular da fase G1 para S (Harris; Levine, 2005).

O mecanismo de mediação de p53 no bloqueio da transição G1/S dá-se pela atuação de p53 em diferentes circuitos de vias de sinalização que regulam o ciclo celular. Em resposta a danos na estrutura do DNA, a ativação da proteína p53 promove a transcrição de p21 que atua como 'sinal de parada' no ciclo celular. Tal mecanismo depende da integridade e ausência de mutações que comprometa a porção c-terminal do gene p53 que, quando alterado, apresenta menor efetividade de ligação da proteína p53 ao DNA de fatores de transcrição-alvo de p53 (Hickman et al., 2002).

O mecanismo de sinalização como 'sinal de parada' da molécula p21 dá-se a ligação de p21 a série de complexos de ciclinas e ciclinas dependentes de quinase (CDKs) dentre elas, os complexos ciclina D1-CDK4, ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDC2. Na disponibilidade de alta concentração de p21, experimentos in vitro demonstram que a atividade das quinases fica bloqueada, impedindo a progressão do ciclo celular. A molécula p21 apresenta afinidade de ligação a porção C-terminal do gene PCNA, sendo que a formação do complexo p21-PCNA participa do bloqueio da DNA polimerase no processo de replicação do DNA. Em cultura de células cancerígenas contendo o alelo p53-selvagem, a remoção dos alelos p21 impede totalmente o bloqueio da etapa de transição G1/S, demonstrando in vitro a atuação de p21 no controle do ciclo

celular. Dentre os diversos complexos formados entre ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, destaca-se o complexo ciclina D1-CDK4 que, após a ativação por p21, atua em complexo na regulação da atividade transcricional de RB1 (Levine, 1997)

2.3 pRB e as 'proteínas-bolsos

Por sua vez, o gene retinoblastoma RB1 localiza-se em 13q14.2 e pertence a uma larga família de genes que incluem outros dois genes relacionados, retinoblastoma-like-1 (RBL1) que se localiza em 20q11.2 e, retinoblastoma-like-2 (RBL2) que se localiza em 16q12.2. Ambas localizações tratam de regiões cromossômicas que despertam interesses quanto a patogênese. Alterações na região 20q11.2 está associada a alterações mielóides, enquanto que a localização 16q12.2 trata-se de uma região na qual se identifica deleções e perda de heterozigose em diversas neoplasias, em que se pode observar correlação positiva a desfechos de maior agressividade local.

Não obstante, RB1, RBL1 e RBL2 codificam estruturalmente proteínas pertencentes a família de proteínas RB, respectivamente, pRB, p107 e p130. Referem-se a proteínas que compartilham estruturas de homologia semelhantes, com domínios conservados denominados de 'domínios-bolsos estreitos' que, consistem estruturalmente de regiões com domínios A e B separados por uma região espaçadora flexível, cujos domínios denotam capacidade de auto-repressão da atividade de transcrição por conta da afinidade de ligação a famílias de ciclinas, tais como as ciclinas-D que, uma vez responsáveis, permitem interações físicas que regulam atividade transcricional destes membros. Não obstante, são regiões que também descrevem afinidade de ligação a oncoproteínas virais como Ad-E1A do adenovírus E1A, antígeno-SV40LT do vírus simian 40-antígeno largo T ('simian vírus 40 large T antigen'), HPV-E7 do papilomavírus E7 (Henley; Dick, 2012; Di Fiore et al., 2013).

A participação das ‘proteínas bolso’ no controle do ciclo celular dá-se a partir de mecanismos de repressão de E2F (Hashiguchi et al., 2001; Hickman et al., 2002; Henley; Dick, 2012; Di Fiore et al., 2013). Tal interação entre as ‘proteínas-bolsos’ com E2F ocorre na interface do domínio C-terminal com as regiões de bolso-estreito, sendo que tanto pRB, p107 e p130 interagem com a família de proteínas E2F, reprimindo-as (Henley; Dick, 2012).

A ativação com a fosforilação das ‘proteínas bolsos’ pRB, p107 e p130 resulta na dissociação das proteínas E2F. Individualmente, as ‘proteínas bolsos’ regulam especificamente determinadas proteínas E2Fs, sendo E2F-1, -2, -3a responsáveis apenas ao pRB, enquanto que p107 e p130 interagem com E2F-4, -5. Desta forma, identifica-se a participação destas ‘proteínas-bolsos’ em dinâmicas celulares que se divergem. A proteína pRB é identificada comumente tanto em células em proliferação e em não-proliferação, ao passo que p107 descreve proeminente expressão em células em proliferação enquanto que p130, em células reprimidas (Cobrinik, 2005).

Em mamíferos, a família de genes E2F abrange oito genes dos quais dão origem a nove proteínas distintas. Por sua vez, a regulação de RB restringe-se aos membros E2F1, E2F2 e E2F3A, mencionados na Literatura como ‘ativadores da família E2Fs’ dada à potente capacidade de atividade transcricional e localização dos genes promotores coincidentes com a dos genes-alvos e de ativação transcricional na fase G1/S, favorecendo a progressão do ciclo celular (laquinta; Less, 2007; Polager; Ginsberg, 2009). Desta forma, a atividade dos ‘ativadores da família E2F’ funcionalmente contrasta-se com a atuação de ‘parada’ na progressão do ciclo celular entre G1/S promovida pela interação de ligação entre pRB e E2F1 que inibe a atividade transcricional de E2F1 (Cobrinik, 2005; laquinta; Less, 2007).

2.4 'Cross-talk' entre os genes RB1 e p53 na regulação do ciclo celular

A participação de E2F na regulação do ciclo celular também se aplica a transição de genes downstream que atuam na regulação de p53. O fator de transcrição p14ARF é ativado por E2F e, posteriormente, p14ARF inibe MDM2, favorecendo a disponibilidade de p53 (Hashiguchi et al., 2001; Hickman et al., 2002). Assim sendo, os genes MDM-2 e E2F apresentam reguladores em comum, p14ARF que, atua tanto na inibição de MDM-2 como na estimulação da atividade de transcrição do E2F (Polager; Ginsberg, 2009; Figura 2.1).

Figura 2.1 – Regulação de E2F e p53

Tal interação entre os genes RB1 e p53 dá-se também, indiretamente, com a interrelação das maquinarias celulares relacionadas à fosforilação das quinases dependentes de ciclinas.

A fosforilação de pRB por CDK4-ciclina D1 é etapa dependente na progressão das fases G1/S no ciclo celular (Cobrinik, 2005). O eixo p16-ciclina D1-cdk4-Rb pode ser descrito como uma via de relevância central na regulação da transição das fase G1-S. p16 trata-se de um regulador negativo do complexo ciclina D1-cdk4, sendo que diversas neoplasias, p16 é detectado hipermetilado, ao passo que ciclina D1 e cdk4 são encontradas supreexpressas. A complexo ciclina D1-cdk4 tem como principal alvo a regulação da atividade transcricional de pRB, sendo que sua fosforilação libera pRB da repressão de E2F-alvos. Em meio a esse eixo de regulação, CDK-4 pode ser inibido por p21 em altas concentrações devido à sua ligação a complexos ciclinas-CDKs após ativação de p21 por p53 (Levine, 1997; Figura 2.2).

Do ponto de vista clínico, resultados experimentais descrevem como fenótipo p53+/pRB- a marcação positiva para p53 concomitante à marcação imuno-histoquímica negativa para pRB em carcinoma epidermóide de esôfago (Dey et al., 2014; Ikeguchi et al., 2000). Tais estudos de co-expressão imuno-histoquímica, em parte, são justificados para a compreensão da progressão tumoral em carcinoma epidermóide de esôfago, uma vez que mutações tanto em RB1 como em TP53 são identificados para esta neoplasia (Ikeguchi et al., 2000).

Figura 2.2 - A via p53-pRB

Fonte: Levine (1997)

2.5 Ameloblastoma

Ameloblastomas são classificados em sólido/multicístico, extraósseo, desmoplástico e unicístico (Barnes et al., 2005). O tipo sólido/multicístico caracteriza-se pelo crescimento lento, localmente invasivo e de alto potencial de recorrência, mais frequentemente manifestado em região posterior de mandíbula. Ao exame radiográfico, nota-se aspecto radiolúcido uni ou

multilocular. Microscopicamente identificam-se dois padrões histológicos: folicular e plexiforme.

No padrão folicular nota-se a existência de ilhas de epitélio odontogênico contidos em estroma fibroso, nas quais as células basais são colunares, de aspecto hipercromáticos, dispostas em paliçada, com deslocamento do núcleo em sentido oposto ao da membrana basal, sendo que as células da porção podem arranjar-se em aspecto de retículo estrelado. Já no padrão plexiforme, observa-se a disposição das células basais em cordões anastomosados, com retículo estrelado imperceptível e estroma de aspecto delicado semelhante ao cisto de degeneração. Com relação à morfologia, o ameloblastoma do tipo extraósseo assemelha-se aos padrões histológicos do tipo sólido/multicístico, no entanto, difere-se clinicamente por sua natureza exofítica.

O ameloblastoma do tipo desmoplásico trata-se da variante de aspecto de radiolucência mista e margens difusas, sendo que o aspecto histológico pode ser descrito pelo aspecto irregular das ilhas epiteliais, com presença de imagens bizarras em formas estreladas e ilhas periféricas de células cuboidais, ocasionalmente com núcleos hipercromáticos, bem como presença de microcistos e áreas com aspecto mixomatoso. Clinicamente, a variante desmoplásica tende a apresentar um comportamento biológico distinto dos demais tipos histológicos no que se refere ao aspecto radiográfico difuso e de radiolucência mista e a evolução clínica (Pogrel; Montes, 2009; Sun et al., 2009).

O tipo unicístico trata-se da variante cujo aspecto assemelha-se a um cisto e, radiograficamente, observa-se imagem radiolúcida unilocular de margens bem definidas. Notam-se duas variantes histopatológicas: luminal e mural. Na variante luminal, identifica-se revestimento em camadas por epitélio neoplásico; na variante mural, a parede do cisto é infiltrada pelo epitélio neoplásico, podendo assemelhar-se aos aspectos folicular e plexiforme, porém, sem a presença de polarização do núcleo e disposição em paliçada (Barnes et al., 2005).

O ameloblastoma, ainda que se trate de uma lesão benigna, apresenta agressividade local variável e, quando não adequadamente tratado, pode predispor a elevada morbidade e difícil reabilitação. Trata-se de uma neoplasia

cujas taxas de recorrências são elevadas em resposta a remoção cirúrgica (Gomes et al., 2010; Jhamb; Kramer, 2014).

Não há total consenso na abordagem cirúrgica ideal a ser adotada para o ameloblastoma, independentemente do tipo histológico. As abordagens cirúrgicas envolvem as conservadoras (enucleação, curetagem, criocirurgia) e radicais (resssecção marginal, segmental ou parcial), sendo que o sucesso da terapêutica cirúrgica está muito relacionado com a remoção plena dos focos tumorais existentes na cortical óssea (Ghandhi et al., 2006; De Silva et al., 2012) e necessidade de acompanhamento clínico e radiográfico de longo prazo para monitoramento do potencial de recorrência.

Comparativamente, a resposta ao tratamento conservador para o ameloblastoma é mais favorável para as lesões do tipo unicístico (Pogrel; Montes, 2009; Seintou et al., 2014) ao passo que a variante desmoplásica, ainda que raro, mostra-se como o sub-tipo mais agressivo frente ao curso clínico e resposta ao tratamento conservador dentre as variantes do ameloblastoma (Rastogi; Jain, 2008; Sun et al., 2009).

A marcação para o anticorpo ki67 quanto a proliferação celular em ameloblastomas demonstra ser similar entre ameloblastomas do tipo sólido/multicístico comparado ao tipo unicístico, apresentando marcação para as células da periferia e porcentagem de células marcadas semelhantes (Gomes et al., 2010). O ameloblastoma do tipo desmoplásico sob este parâmetro difere-se dos demais tipos histológicos, pois nota-se menor porcentagem de células marcadas comparativamente, sugerindo a participação de outros mecanismos biológicos envolvidos neste tipo histológico (Bologna-Molina et al., 2008; Gomes et al., 2010).

O gene p53, ainda que não seja identificadas mutações significativas em casos de ameloblastoma, trata-se de um gene com funções reguladoras do ciclo celular e de mecanismos de reparação antitumoral (Gomes et al., 2010). No tocante à proliferação celular, o marcador ki67 apresenta imuno-marcação semelhante e co-expressa à proteína p53, sendo esta correlação estatisticamente significativa. A marcação para o p53 é identificada nas células periféricas e centrais do ameloblastoma. A co-expressão e correlação estatística positiva entre p53 e ki67

também é observada em tumores odontogênicos queratocísticos, cuja localização a imuno- ocorre nas camadas basal e suprabasal (Gadbail et al., 2012).

Em ameloblastomas, foi descrita imuno-reatividade semelhante entre germes dentais e o ameloblastoma para p63 e p73, homólogos de p53 (Kumamoto et al., 2005), ao passo que se identifica ligeira diferença positiva para a imuno-marcação em ameloblastomas e germes dentais, quando se avalia a imuno-reatividade para anti-pRB fosforilado e não-fosforilado (Kumamoto; Ooya, 2006).

2.6 Tumor odontogênico queratocístico

O tumor odontogênico queratocístico, anteriormente considerado como cisto odontogênico, foi como reclassificado na classificação de tumores de cabeça e pescoço da OMS em 2005 como uma neoplasia odontogênica cística. Tal modificação advém da interpretação do comportamento biológico do queratocisto odontogênico como uma neoplasia benigna, de origem do epitélio odontogênico (Barnes et al., 2005).

Trata-se de uma lesão benigna com capacidade de reabsorção e destruição das corticais ósseas de ossos gnáticos, de aspecto radiográfico radiolúcido uni ou multicístico. Observa-se maior ocorrência em região posterior de mandíbula, podendo acometer indivíduos desde a 1ª até a 9ª década com maior incidência entre a 2ª e 4ª década de vida (Barnes et al., 2005; Simiyu et al., 2013).

Histologicamente, pode ser descrita como uma neoplasia de epitélio estratificado paraqueratinizado de superfície corrugada, geralmente com cerca de 5 a 8 camadas de células. A camada basal é bem definida, compostas por células colunares ou cúbicas, frequentemente dispostas em paliçada, sendo que os núcleos das células basais, geralmente basofílicos, apresentam tendência a se orientarem no sentido oposto ao da membrana basal. A arquitetura celular pode descrever variações na presença de intenso infiltrado inflamatório com

perda da característica de camada basal em paliçada. Nas camadas suprabasais, pode-se notar presença de mitoses (Barnes et al., 2005).

Os achados de alteração genética com a perda alélica de 9q22 e de superexpressão de BCL-1 e TP53 detectadas nas lesões relacionadas à síndrome do carcinoma basocelular nevóide, bem como a identificação de alterações no gene PTCH em casos esporádicos foram as principais evidências que corroboraram a decisão polêmica de modificação de reclassificação desta afecção (Barnes et al., 2005; Reichart et al., 2006).

A síndrome do carcinoma basocelular nevóide trata-se de uma síndrome autossômica dominante e hereditária que predispõe à formação tumoral, com ocorrência de carcinomas basocelulares nevóides, múltiplos tumores odontogênicos queratocísticos e anomalias esqueléticas como ocorrência de espinha bífida, alterações vertebrais, calcificações ectópicas craniais e mutações no gene PTCH1 (Bree et al., 2011).

A ocorrência de múltiplos tumores odontogênicos queratocísticos pode constituir-se a primeira manifestação clínica da síndrome do carcinoma basocelular nevóide (Barnes et al., 2005; Sasaki et al., 2010) e tendem a apresentar maior potencial de recorrência comparado às lesões esporádicas (Barnes et al., 2005; Habibi et al., 2007; Cottom et al., 2012). Tal taxa é variável, entre 3% a 60%, conforme revisão sistemática do grupo editorial de saúde bucal da Cochrane Library, na qual se destaca a ausência de estudos randomizados contemplando a resposta ao tratamento dos tumores odontogênicos queratocísticos (Sharif et al., 2010).

As modalidades de tratamento envolvem desde as abordagens conservadoras, como a marsupialização e a enucleação associada ou não a aplicação de terapias adjuvantes como a aplicação da crioterapia na periferia da loja óssea após a enucleação (Tonietto et al., 2011), ostectomia periférica (peeling ósseo) e aplicação de solução de Carnoy nas margens ósseas da cavidade cirúrgica. Parte do sucesso da terapia cirúrgica advém da possibilidade da remoção plena dos focos de epitélio cístico do tumor odontogênico queratocístico, seja por meio da indicação de terapias adjuvantes ao tratamento conservador ou da ressecção em bloco.

2.7 Marcadores imuno-histoquímicos em tumores odontogênicos relacionados ao ciclo celular e genes supressores de tumor: anti- p53 e anti-pRB

O TP53 é o gene mais mutado dentre os mais diversos tipos de cânceres (Hollstein et al., 1991), sendo que mutações em TP53 não demonstra importante papel na patogênese do ameloblastoma (Gomes et al., 2010). Observa-se baixa imuno-expressão para p53 com alta imuno-expressão para MDM2 em ameloblastomas e cistos radiculares (Carvalhais et al., 1999) e baixa quantidade de mutações no gene TP53 nos ameloblastomas (Shibata et al., 2002; Kumamoto et al., 2004).

Nos tumores odontogênicos, comparativamente, foi observado co-expressão e marcação imuno-histoquímica predominantemente positiva em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos para p53 e, MDM2, que regula negativamente a atividade de p53. A imuno-marcação mostrou-se mais efetiva nas regiões suprabasais em tumores odontogênicos queratocísticos e no retículo estralado em ameloblastomas (Sharifi-Sistani et al., 2011).

Em tumores odontogênicos queratocísticos, a expressão imuno-histoquímica do p53 foi também observada co-expressa à proteína COX-2 com marcações de intensidade média a forte na camada basal e suprabasal, associada a porcentagens elevadas de expressão para ki-67. Tais desfechos destacam a presença de alto potencial de proliferação, uma vez que a atividade de ki67 pode estar associado à presença de resposta inflamatória, uma vez que COX-2 é expresso (Mendes et al., 2011).

A marcação para ki67 e p53 pode ser observada principalmente nas camadas suprabasais de tumores odontogênicos queratocísticos, ao passo que a localização para a imuno-marcação para o anticorpo p63 é mais generalizada, não se observando alterações na localização e na quantificação comparativamente entre casos esporádicos e associados a síndrome (Gurgel et al., 2008). No entanto, Lo Muzio et al. (1999) descreve imuno-marcação negativa

para p53 e ciclina D1 para casos esporádicos e com marcação nuclear positiva para os casos associados à síndrome.

Kumamoto e Ooya (2006) demonstraram a imuno-marcação positiva tanto para p63 e p73, genes homólogos do p53, tanto em ameloblastoma como em germes dentários. Os mesmos pesquisadores observaram marcação levemente superior em ameloblastomas ao investigar a imuno-expressão para o gene supressor de tumor pRB. O padrão de marcação quanto a localização morfológica foi semelhante entre os marcadores pRB, E2F-1, pRB fosforilado e ki67 em ameloblastomas benignos, malignos e germes dentais, sendo observado marcação nuclear nas células da periferia. O número de células positivas para pRB fosforilado foi ligeiramente menor comparado a expressão imuno-histoquímica para pRB e E2F-1. Os níveis de imunorreatividade para pRB, E2F-1, pRB fosforilada, e Ki-67 foram ligeiramente maiores em ameloblastomas benignos e malignos comparados aos germes dentários (Kumamoto; Ooya, 2006).

A despeito destes trabalhos, mais estudos mostram-se necessários para uma melhor compreensão do papel da proteína pRB no comportamento biológico dos tumores odontogênico, sobretudo quanto à co-expressão dos marcadores pRB e p53, cuja atuação destas proteínas no controle da progressão e parada do ciclo celular convergem-se. Diante disso, a proposição do presente estudo a investigação da importância da imuno-expressão das proteínas p53 e pRB em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocístico.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente estudo analisar o perfil de expressão imuno-histoquímico das proteínas pRB e p53 em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa obedeceu rigorosamente aos parâmetros explicitados a seguir.

4.1 Caracterização do estudo

O projeto de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP, CAEE 36685714.0.0000.0075, parecer número 835.666 (Anexo A).

Casos emblocados em parafinas de casos de ameloblastomas sólido/multicístico (21), tumores odontogênicos queratocísticos (20) oriundos do Serviço de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Oromaxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP foram selecionados para ensaio laboratorial de caráter retrospectivo para a investigação da expressão imuno-histoquímica dos anticorpos anti-pRB (clone RB1, DakoCytomation, EUA) e anti-p53 (clone DO7, DakoCytomation, EUA).

4.2 Critério de inclusão

Pacientes cuja análise anatomopatológica confirmou o diagnóstico de ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico, com presença de epitélio odontogênico típico suficiente para análise.

4.3 Critério de exclusão

Casos cujo material não suficiente para análise e na análise microscópica foi

observada presença de quantidade expressiva de células inflamatórias e de artefatos na região da imuno-marcação que impossibilite a quantificação, alteração na morfologia do espécime após processamento foram excluídos da casuística.

Casos repetidos, ou seja, de mesmo paciente, seja por razões de repetição de biópsia, momentos operatórios distintos (biópsia diagnóstica e confirmação diagnóstica da peça cirúrgica após exérese) ou acometimento de mais de uma localização não foram incluídos na casuística, de modo a permitir a compilação estatística dos resultados como eventos independentes em consideração a possíveis alterações no perfil de imuno-expressão em resposta a tratamentos complementares (crioterapia, descompressão, novo acesso cirúrgico).

4.4 Coleta de dados clínicos

Os dados clínicos incluindo idade, gênero, tempo de queixa, localização anatômica, menções à associação com a síndrome do carcinoma basocelular nevóide em caos de tumor odontogênico queratocístico foram obtidos a partir dos dados clínicos fornecidos na ocasião do envio da peça cirúrgica para análise.

4.5 Ensaio de imuno-histoquímica

Casos de ameloblastoma e de tumor odontogênico queratocístico fixados em formalina foram submetidos a cortes seriados de espessura de 3µm e aplicados em lâmina de vidro tratadas em solução de 3-aminopropiltriethoxysilano a concentração de 20%. Cortes permaneceram em estufa de calor seco a 60°C por 24h, para armazenamento posterior em freezer a -20°C. Os casos cujo processamento para as reações imuno-histoquímica não foi imediato foram submetidos a banho em parafina de baixa fusão para melhor preservação dos cortes e armazenados posteriormente a -20°C.

O controle positivo da reação para ambos os anticorpos (anti-pRB e anti-p53) foi um caso de carcinoma epidermóide de boca oriundo de biópsia incisional, sendo utilizado como controle negativo o mesmo caso com a omissão da incubação do anticorpo primário.

A desparafinização ocorreu por meio de 2 banhos em solução de xilol, sendo 1 banho de 30 minutos à temperatura de 60°C em estufa de calor seco, seguido de 1 banho de 15 minutos à temperatura ambiente.

A rehidratação dos cortes ocorreu em banhos graduais nas soluções de álcool etílico absoluto em 3 (três) banhos de 3 minutos seguido de 1 banho de 3 minutos nas soluções de álcool etílico de concentrações 90%, 70%, 50%. A hidratação final dos cortes ocorreu em 1 banho de 5 minutos em água miliQ.

Para o anti-pRB, a recuperação antigênica ocorreu em solução de ácido cítrico 10mM a pH=6,0 por 40 minutos em banho-maria a 95°C, sendo para anti-p53 em solução de Tris-EDTA 10mM a pH=9,0 por 30 minutos em banho-maria. Após o aquecimento no tempo determinado, os cortes permaneceram nas respectivas soluções de tratamento em temperatura ambiente por 15 minutos para posterior lavagem em água corrente por 5 minutos e 3 banhos de duração de 5 minutos em solução tamponada de tris(hidroximetil)amiminopentano+NaCl (TRIS) 10mM em pH=7,6.

A inativação da peroxidase endógena ocorreu através de 1 banho de peróxido de hidrogênio 20 volumes por 30 minutos, seguido de lavagem em 3 banhos de duração de 5 minutos em solução tamponada de Tris.

O bloqueio das reações inespecíficas ocorreu com a incubação de solução de BSA (albumina bovina e azida sódica) 1% por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram incubados com o anticorpo primário nas diluições 1:40 para anti-p53 e a 1:50 para anti-pRB, ambas em solução de BSA 1%. A incubação para anti-p53 ocorreu em temperatura ambiente por 1 hora, enquanto para o anti-pRB a incubação foi em câmara úmida a 4°C em geladeira por 20 horas.

Os cortes foram lavados em solução tamponada de Tris por 5 minutos por 3 vezes previamente ao início da incubação do anticorpo secundário. Foram incubados 100ul de solução Biotinylated Link Universal (LSAB+ Kit,

DakoCytomation, EUA) por 30 minutos, seguido de 3 lavagens de 5 minutos em solução de TRIS e, de incubação com 100ul de solução Streptavidin-AP (LSAB+ Kit, DakoCytomation, EUA) por 30 minutos com posterior 3 lavagens consecutivas de 5 minutos em solução de TRIS.

A revelação da imuno-reação ocorreu através do cromógeno diaminobenzidina 0,0025% (DAB 3,3-Diaminobenzidina, DakoCytomation, EUA) incubado por 5 minutos, seguido por 3 lavagens de 5 minutos em água miliQ.

A contra-coloração foi realizada em corante hematoxilina de Harris por 2 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos e ciclo de cadeia descendente de álcool etílico para a desidratação e imersão em dois banhos de xilol (3 minutos e 5 minutos) para a diafanização. A montagem das lâminas foi automatizada em equipamento Tissue Tek SCA (Sakura Seiki, Japão).

4.6 Quantificação

As imuno-reações foram analisadas independentemente sem conhecimento dos dados clínicos. Campos celulares com objetiva de 10X e ocular de 10X foram fotografados em fotomicroscópio de luz (Zeiss, Alemanha) em imagem de alta resolução, para posterior quantificação das células marcadas em campo de 1000 células através do software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). Os dados foram analisados de acordo com a porcentagem de células marcadas nas mesmas áreas para ambos os anticorpos.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram posteriormente tabulados em planilha Excel para posterior compilação estatística através do software XLSTAT 2013 (Addinsoft, EUA), com a realização de análise de testes não-paramétricos de comparação de medianas (teste de MannWhitney) e teste de correlação estatística de Pearson. Gráficos de boxplot foram processados no software estatístico BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 Achados clínicos e histopatológicos

O total de 21 casos com diagnóstico confirmado de ameloblastomas e de 20 casos com diagnóstico de tumor odontogênico queratocístico foram incluídos no presente estudo respeitando os critérios de inclusão e exclusão elucidados em Material e Métodos. Os dados clínicos quanto à caracterização da amostra estão descritos na Tabela 1. Observa-se que um percentual elevado (5% a 70%) de dados clínicos não foram discriminados pelos solicitantes no ato do preenchimento do formulário para requisição de exame anátomo-patológico. Pode-se observar tanto para os casos de ameloblastoma (58%), como para os casos de tumor odontogênico queratocístico uma maior predileção por pacientes do sexo feminino (55%). Também pode ser observado um maior acometimento do tumor odontogênico queratocístico em pacientes jovens (50%), na faixa de etária de 10-30 anos, quando comparado ao ameloblastoma. O total de 21 casos com diagnóstico confirmado de ameloblastomas e de 20 casos com diagnóstico de tumor odontogênico queratocístico foram incluídos no presente estudo respeitando os critérios de inclusão e exclusão elucidados em Material e Métodos. Os dados clínicos quanto à caracterização da amostra estão descritos na Tabela 5.1.

Com relação à localização, a região posterior de mandíbula foi o sítio anatômico majoritariamente mais acometido para ambas as afecções (76% a 55%). No ameloblastoma, não foram identificados casos de acometimento da região anterior, sendo que houve um caso cuja lesão estendeu-se de região anterior para a região posterior da mandíbula. A média e a mediana da extensão do tumor foi maior em ameloblastomas, conforme dados explicitados na Tabela 5.1. Dentre os casos analisados, apenas um caso de ameloblastoma foi

identificado como peça cirúrgica, todos os outros foram resultantes de biópsia incisional. O mesmo foi observado para os casos de tumor odontogênico queratocístico, onde apenas um caso, com suspeita de envolvimento na síndrome do carcinoma basocelular nevóide, teve a peça cirúrgica encaminhada para o exame anátomo-patológico. No total, dois casos foram relatados com possível envolvimento com a síndrome do carcinoma basocelular nevóide. Informações referente a possíveis características clínicas relacionadas à síndrome do carcinoma basocelular nevóide tais como relato ou histórico de exérese múltiplos queratocistos, anormalidades esqueléticas, como costelas bífidas, características faciais peculiares, como prognatismo e hipertelorismo, ou histórico familiar não foram relatados em ambas solicitações de exame anátomo-patológico.

Dos 21 casos de ameloblastomas sólido/multicístico, em 71% dos casos (15) foi observado como predominante o padrão plexiforme, enquanto que em 29% dos casos (6) foi identificado o padrão folicular como predominante. Individualmente, tais informações estão tabuladas conjuntamente com os respectivos dados clínicos e histopatológicos no Anexo B.

Tabela 5.1 - Identificação e características clínicas de acordo com o diagnóstico

		Ameloblastoma (n=21)	TOQC (n=20)
Sexo	Masculino	42% (9)	35% (7)
	Feminino	58% (12)	55% (11)
	N.D	-	10% (2)
Idade	Média	31,65	25
	Mediana	22	24
	Mínimo-Máximo	9-74	10-52
	Desvio-padrão	20,20	11,95
Localização	Maxila	4% (1)	15% (3)
	Mandíbula	80% (17)	80% (16)
	N.D	16% (3)	5% (1)
Região	Anterior	-	25% (5)
	Posterior	76% (16)	55% (11)
	Ambas	4% (1)	-
	N.D	20% (4)	20% (4)
Etnia	Branco	52% (11)	50% (10)
	Negro	19% (4)	10% (2)
	Pardo	5% (1)	-
	Asiático	-	10% (2)
	N.D	14% (5)	30% (6)
Duração (mês)	Média	25,36	22,5
	Mediana	12	7,5
	Desvio-padrão	21,36	24,71
	Mínimo-Máximo	5-60	7-60
	N.D	30% (7)	70% (14)
Tamanho (mm)	Média	47,75	35,92
	Mediana	45	37,5
	Desvio-padrão	32,44	22,69
	Mínimo-Máximo	4-100	3-100
	N.D	23% (5)	30% (6)

* TOQC: Tumor Odontogênico Queratocístico; N.D: Não determinado

5.2 Achados imuno-histoquímicos

Tanto para o anticorpo anti-p53 (Figura 5.1) e anti-pRB (Figura 5.2), as imuno-marcações localizaram-se nas células da periferia e centrais das ilhotas dos ameloblastomas, enquanto que no tumor odontogênico queratocístico imuno-marcação limitou-se sobretudo à camada supra-basal. Quanto a localização segundo o compartimento celular da imuno-marcação para o anticorpo anti-p53, esta foi predominantemente nuclear nos ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos, sendo observadas marcações ocasionais no citoplasma de ambos os tumores.

Para a contagem da imuno-marcação para o anticorpo anti-p53 foram incorporadas as marcações nuclear e citoplasmática no score final dos casos cuja expressão imuno-histoquímica também foi identificada também em citoplasma. A mediana de imuno-marcação para a proteína p53 foi de 10% em ameloblastomas e, em tumores odontogênicos queratocísticos, 5%. A mediana de imuno-marcação da porcentagem de células positivas em ameloblastomas foi estatisticamente maior comparado à mediana referente aos tumores odontogênicos queratocísticos ($p=0,01$; Mann-Whitney, one tailed; Figura 5.3).

Os resultados de imuno-marcação negativa (0%) em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos para os anticorpos p53 e pRB não foram coincidentes.

No ameloblastoma, a mediana para porcentagem de células marcadas para o anticorpo anti-pRB foi de 6%, enquanto que no tumor odontogênico queratocístico a mediana foi de 15%. A mediana da porcentagem de células positivas marcadas nos tumores odontogênicos queratocísticos foi maior estatisticamente quando comparado com a mediana de porcentagens de células positivas nos ameloblastomas ($p=0,04$; Mann-Whitney one-tailed; Figura 5.4)

Dados brutos referente à contagem da imuno-marcação estão discriminados no Anexo C.

A.

B.

Figura 5.1 - Imuno-histoquímica para o anticorpo p53

A. Aumento 400x. Imuno-marcação para anti-p53 em ameloblastoma do tipo folicular, exibindo marcação predominantemente nas células em paliçada da periferia. B. Aumento 400x. Imuno-marcação para anti-pRB em tumor odontogênico queratocístico, exibindo marcação predominantemente nas células da camada suprabasal.

A.

B.

Figura 5.2 - Imuno-histoquímica para o anticorpo pRB

- A. Aumento de 400x. Imuno-marcação para anti-pRB em ameloblastoma do tipo plexiforme exibindo marcação predominante nas células da periferia e esparsamente nas células centrais.
- B. Aumento de 400x. Imunomarcação para anti-pRB em tumor odontogênico queratocístico exibindo marcação predominante nas células da camada supra-basal.

Figura 5.3 – Boxplot de muno-marcações para anti-p53 em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos. $p=0,01$ (Teste de Mann-Whitney, one-tailed)

*TOQC: Tumor odontogênico queratocístico

A correlação estatística da contagem das imuno-marcações para as proteínas p53 e pRB foram testadas através do teste estatístico de correlação de Pearson. No tumor odontogênico queratocístico pode-se inferir uma correlação positiva moderada entre os anticorpos p53 e pRB ($r=0,537$; $p=0,018$). Tal inferência não se mostrou válida para as imuno-marcações em ameloblastomas ($r=-0,064$; $p=0,790$)

Figura 5.4 – Boxplot de imuno-marcações para anti-pRB em ameloblastomas e tumores odontogênicos queratocísticos. $p=0,04$ (Teste de Mann-Whitney, one-tailed)

*TOQC: Tumor odontogênico queratocístico

6 DISCUSSÃO

A despeito da caracterização amostral quanto às características clínicas expostas no presente estudo, tais resultados não foram analisados estatisticamente de forma conjunta com os resultados da marcação imuno-histoquímica, em decorrência da elevada porcentagem de até 70% de dados não discriminados.

No entanto, de forma descritiva, pode ser observado que a casuística é composta em sua maioria por casos oriundos de pacientes do sexo feminino, 58% em ameloblastomas e 55% em tumores odontogênicos queratocísticos. A mandíbula foi o sítio anatômico mais acometido, em 80% dos casos, para ambos os tumores e, em região posterior, variando de 55% em tumores odontogênicos queratocísticos a 76% em ameloblastomas.

A análise univariada para comparação das medianas de porcentagens de células marcadas para anti-p53 e anti-pRB em ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico permitiu determinar estatisticamente que houve maior porcentagem de células positivas para anti-p53 em ameloblastomas ($p=0,01$; one-tailed; teste de Mann-Whitney) e para anti-pRB em tumores odontogênicos queratocísticos ($p=0,04$; one-tailed; teste de Mann-Whitney).

Desta forma, foi observado maior marcação para anti-p53 em ameloblastomas e, em tumores odontogênicos queratocísticos, para anti-pRB. Ainda que a localização da imuno-marcação não diferiu entre os anticorpos e tumores odontogênicos estudados, a quantificação denotou diferenciação entre as porcentagens de células positivas. Portanto, pode-se interpretar que tanto em ameloblastomas, como no tumor odontogênico queratocístico, a marcação imuno-histoquímica para anti-p53 denotou a ocorrência de meia-vida aumentada para a proteína p53, associado concomitantemente à marcação positiva para a proteína pRB no tumor odontogênico queratocístico, uma vez que a correlação das porcentagens de células marcadas foi positiva e moderada ($r=0,537$; $p=0,018$).

A investigação da imuno-marcação conjunta entre anti-p53 e anti-pRB trata-se desfecho de interesse clínico, uma vez que o perfil imuno-histoquímico p53+/pRB- é elencado como um desfecho associado a melhores taxas de sobrevida (Ikegushi et al., 2000).

No entanto, esta correlação invertida relacionado à imuno-positividade para anti-p53 e anti-pRB não se mostrou relevante nos tumores odontogênicos queratocísticos, cuja correlação foi moderada e positiva ($r=0,537$; $p=0,018$), enquanto que nos ameloblastomas a correlação não foi significativa estatisticamente ($r=0,064$; $p=-0,790$).

O gene p53 é descrito como ‘guardião do genoma’ em decorrência de sua função de checagem de erros no DNA e constitui fator de transcrição em diversas vias de sinalizações inerentes à homeostase (Pallegata et al., 1996). Dentre diversos ‘cross-talk’ de relevância, a disponibilidade de p53 é também regulada por p14ARF, uma vez que p14ARF inibe MDM2 aumentando a disponibilidade de p53. A proteína pRB regula p14ARF, ao passo que pRB ativa E2F e, E2F ativa p14ARF. Tais mecanismos são modulados por eventos pós-traducionais de fosforilação na regulação destes fatores de transcrição (Polager & Grisberg, 2009).

Além disso, a maquinaria das ciclinas e quinases dependentes de ciclinas participam da regulação via de sinalização p53-pRB (Levine, 1997). A compreensão da regulação e interação destes dois genes supressores de tumor demanda maiores estudos quanto à expressão destes genes e proteínas, porém, os presentes resultados apontaram que a ocorre participação das proteínas p53 e pRB na biologia do ameloblastoma e do tumor odontogênico queratocístico conforme os respectivos resultados do ensaio de imuno-histoquímica.

7 CONCLUSÃO

As proteínas p53 e pRB mostraram-se expressas tanto nos ameloblastomas, como nos tumores odontogênicos queratocísticos.

A localização da imuno-expressão destes anticorpos foi semelhante, porém, a quantificação permitiu diferenciar a expressão imuno-histoquímica para anti-p53, cuja porcentagem de células marcadas em ameloblastomas foi maior, enquanto que para anti-pRB, a porcentagem foi maior em tumores odontogênicos queratocísticos.

Assim sendo, a proteína p53 e pRB atuam nos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese destes tumores.

REFERÊNCIAS¹

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. (WHO classification of tumours series).

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, Farfan-Morales JE, Irigoyen-Camacho ME, Damián-Matsumura P. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. Oral Oncol. 2008 Aug;44(8):805-11.

Bree AF, Shah MR, BCNS Colloquium Group. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). Am J Med Genet A. 2011 Sept;155(9):2091-7.

Carvalhais J, Aguiar M, Araújo V, Araújo N, Gomez R. p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. Oral Dis. 1999 Jul;5(3):218-22.

Clayman L. Mixed Ectodermal-Mesodermal Odontogenic Tumors. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gousler TS, Holland JF, EmilFrei III, editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Chapter 91 [acesso em 16 nov 2014]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12483/>.

Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene. 2005 Apr;24(17):2796-809.

¹ De acordo em estilo Vancouver

Cottom HE, Bshena FI, Speight PM, Craig GT, Jones AV. Histopathological features that predict the recurrence of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 2012 May;41(5):408-14.

De Silva I, Rozen WM, Ramakrishnan A, Mirkazemi M, Baillieu C, Ptasznik R, Leong J. Achieving adequate margins in ameloblastoma resection: the role for intra-operative specimen imaging. Clinical report and systematic review. *PLoS One.* 2012;7(10):e47897. doi: 10.1371/journal.pone.0047897.

Dey B, Vandana R, Khonglah Y, Lynrah KG. Immunohistochemical Analysis of P53 and PRB in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2014 May;8(5):FCO1-3.

Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2013 Aug;228(8):1676-87.

Gadbail AR, Patil R, Chaudhary M. Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontol Scand.* 2012 Dec;70(6):529-35.

Ghandhi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank LM, Moos KF. Ameloblastoma: a surgeon's dilemma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Jul;64(7):1010-4.

Goldenberg D, Sciubba J, Koch W, Tufano RP. Malignant odontogenic tumors: a 22-year experience. *Laryngoscope.* 2004 Oct;114(10):1770-4

Golubovskaya VM, Cance WG. Targeting the p53 pathway. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013 Oct;Oct;22(4):747-64

Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010 Sept;39(8):585-91.

Gurgel CA, Ramos EA, Azevedo RA, Sarmento VA, da Silva Carvalho AM, dos Santos JN. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. *J Mol Histol*. 2008 Jun;39(3):311-6.

Habibi A, Saghravanian N, Habibi M, Mellati E, Habibi M. Keratocystic odontogenic tumor: a 10-year retrospective study of 83 cases in an Iranian population. *J Oral Sci*. 2007 Sept;49(3):229-35.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005 Apr;24(17):2899-908.

Hashiguchi Y, Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, Ishiko O, Ogita S. Combined analysis of p53 and RB signaling in epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol*. 2001;32(9):988-96.

Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div*. 2012 Mar;7(1):10.

Henriques AC, Cazal C, Fonsêca DDD, Bello DMA, Araújo NC, Castro JFL. Considerações sobre a Classificação e o Comportamento Biológico dos Tumores Odontogênicos Epiteliais: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55(2):175-84.

Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):60-6.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul;253(5015):49-53

Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Dec;19(6):649-57.

Ikeguchi M, Oka S, Gomyo Y, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Combined analysis of p53 and retinoblastoma protein expressions in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg*. 2000 Sept;70(3):913-7.

Jhamb T, Kramer JM. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: implications for therapeutics. *Exp Mol Pathol*. 2014 Dec;97(3):345-53.

Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2004 May;33(5):292-9.

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

Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of retinoblastoma protein and E2 promoter-binding factor-1 in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2006 Mar;35(3):183-9.

Levine AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997 Feb;88(3):323-31.

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

Mendes RA, Carvalho JF, van der Wall I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53 and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Mar;111(3):333-9.

Mosqueda-Taylor A, Meneses García A, Ruíz Godoy Rivera LM, Suárez Roa Mde L, Luna Ortiz K. Malignant odontogenic tumors. A retrospective and collaborative study of seven cases. *Med Oral*. 2003 Mar-Apr;8(2):110-21.

Osterne RL, Brito RG, Alves AP, Cavalcante RB, Sousa FB. Odontogenic tumors: a 5-year retrospective study in a Brazilian population and analysis of 3406 cases reported in the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):474-81.

Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Dec;93(26):15209-14.

Pogrel MA, Montes DM. Is there a role for enucleation in the management of ameloblastoma? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Aug;38(8):807-12

Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):738-48.

Rastogi R, Jain H. Case report: Desmoplastic ameloblastoma. *Indian J Radiol Imaging*. 2008;18(1): 53–55.

Reichart PA, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)--any changes? *Oral Oncol.* 2006;42(8):757-8.

Servato JP, Prieto-Oliveira P, de Faria PR, Loyola AM, Cardoso SV. Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian University and a review of international literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Feb;42(2):288-93.

Sasaki R, Miyashita T, Matsumoto N, Fujii K, Saito K, Ando T. Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome having distinct PTCH1 mutations: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Aug;110(2):e41-6.

Seintou A, Martinelli-Kläy CP, Lombardi T. Unicystic ameloblastoma in children: a review of clinicopathological features and treatment outcomes. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Apr;43(4):405-12.

Sharif FNJ, Oliver R, Sweet C, Sharif MO. Interventions for the treatment of keratocystic odontogenic tumours (KCOT, odontogenic keratocysts (OKC)). *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Sept;(9):CD008464.

Sharifi-Sistani N, Zartab H, Babakoohi S, Saghravanian N, Jamshidi S, Esmaili H, Mohtasham N, Zamanzadeh M, Abbaszadeh-Bidokhty H. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *J Craniofac Surg.* 2011 Sept;22(5):1652-6.

Shibata T, Nakata D, Chiba I, Yamashita T, Abiko Y, Tada M, Moriuchi T. Detection of TP53 mutation in ameloblastoma by the use of a yeast functional assay. *J Oral Pathol Med.* 2002 Oct;31(9):534-8.

Simiyu BN, Butt F, Dimba EA, Wagaiyu EG, Awange DO, Gutha SW, Slootweg PJ. Keratocystic odontogenic tumors of the jaws and associated pathologies: A 10-year clinicopathologic audit in a referral teaching hospital in Kenya. J Craniomaxillofac Surg. 2013 Apr;41(3):230-4.

Sun ZJ, Wu YR, Cheng N, Zwahlen RA, Zhao YF. Desmoplastic ameloblastoma - A review. Oral Oncol. 2009 Sept;45(9):752-9.

Tonietto L, Borges HO, Martins CA, Silva DN, Sant'Ana Filho M. Enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the treatment of keratocystic odontogenic tumors: a case series. J Oral Maxillofac Surg. 2011 Jun;69(6):112-7.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS pRB, E2F, p53 EM AMELOBLASTOMAS E TUMORES ODONTOGÊNICOS QUERATOCÍSTICOS

Pesquisador: Fabio Daumas Nunes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36685714.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 835.666

Data da Relatoria: 17/10/2014

Apresentação do Projeto:

Amostras de material parafinado de ameloblastomas (40 casos) e tumores odontogênicos queratocísticos (40) oriundos do acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP serão utilizadas para avaliação por meio de reações imunoistoquímicas com a finalidade de caracterização das proteínas pRB, E2F, p53 nesse tumores.

Objetivo da Pesquisa:

avaliar o perfil imuno-histoquímico das proteínas E2F, pRB, p53 em ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico. Serão avaliadas amostras de material parafinado de ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico oriundas do acervo de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram considerados e estão adequados. A pesquisa não envolve riscos diretos ou indiretos ao paciente, uma vez que se trata de estudo retrospectivo baseado em material parafinado oriundo de exames anátomo-patológicos anteriores e a identidade dos pacientes será preservada. Quanto aos benefícios, não haverá benefícios diretos aos participantes mas poderá trazer benefícios aos futuros seres humanos que por ventura sofrerem destes

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Continuação do Parecer: 025.000

tumores. Poderá haver maior conhecimento quanto as formas de tratamento e maior previsibilidade à abordagem diagnóstica e terapêutica com os resultados obtidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A protocolo da pesquisa respeita os preceitos éticos e está adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está adequada. O TCLE é dispensável pois o estudo de caráter retrospectivo baseado em material parafinado de acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal(FOUSP). A identidade dos pacientes será preservada.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 17 de Outubro de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5081-7860

Fax: (11)5081-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B - Dados clínicos e histopatológicos

	LESÃO	Padrão	Sexo	Idade	ETNIA	SÍTIO	Localização	Duração (mês)	Tamanho (mm)	Biópsia
1	Ameloblastoma	Folicular	F	14	BRANCO	MAXILA	Posterior	5	10	SIM
2	Ameloblastoma	Plexiforme	F	17	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	60	nd	SIM
3	Ameloblastoma	Plexiforme	F	31	ND	ND	ND	8	ND	SIM
4	Ameloblastoma	Plexiforme	M	61	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	6	50	SIM
5	Ameloblastoma	Plexiforme	F	19	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	ND	80	SIM
6	Ameloblastoma	Plexiforme	M	17	NEGRO	MANDIBULA	Ambas	36	5	SIM
7	Ameloblastoma	Plexiforme	M	30	ND	ND	ND	24	ND	NÃO
8	Ameloblastoma	Plexiforme	F	ND	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	ND	ND	SIM
9	Ameloblastoma	Plexiforme	F	22	ND	MANDIBULA	Posterior	ND	ND	SIM
10	Ameloblastoma	Plexiforme	F	22	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	ND	50	SIM
11	Ameloblastoma	Plexiforme	M	16	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	12	100	SIM
12	Ameloblastoma	Plexiforme	M	19	NEGRO	MANDIBULA	Posterior	12	80	SIM
13	Ameloblastoma	Folicular	M	74	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	60	40	SIM
14	Ameloblastoma	Plexiforme	F	20	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	ND	20	SIM
15	Ameloblastoma	Plexiforme	M	19	BRANCO	MANDIBULA	ND	ND	40	SIM
16	Ameloblastoma	Folicular	F	23	PARDO	MANDIBULA	Posterior	60	100	SIM
17	Ameloblastoma	Folicular	F	62	ND	MANDIBULA	Posterior	ND	80	SIM
18	Ameloblastoma	Folicular	F	63	ND	MANDIBULA	Posterior	12	4	SIM
19	Ameloblastoma	Plexiforme	M	30	NEGRO	MANDIBULA	Posterior	36	50	SIM
20	Ameloblastoma	Plexiforme	M	60	BRANCO	MANDIBULA	Posterior	12	40	SIM
21	Ameloblastoma	Folicular	F	9	NEGRO	ND	ND	12	15	SIM
22	TOQC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	TOQC	ND	F	ND	BRANCO	MANDÍBULA	Posterior	ND	35	SIM
24	TOQC	ND	F	ND	BRANCO	MANDÍBULA	Posterior	ND	ND	SIM
25	TOQC	ND	F	29	BRANCO	MANDÍBULA	Posterior	ND	ND	SIM
26	TOQC	ND	F	29	BRANCO	MANDÍBULA	Posterior	ND	ND	SIM
27	TOQC	ND	F	10	ND	MANDÍBULA	ND	ND	50	N
28	TOQC	ND	M	40	ASIÁTICO	MANDÍBULA	Posterior	ND	15	SIM
29	TOQC	ND	M	14	ND	MANDÍBULA	Anterior	ND	30	SIM
30	TOQC	ND	M	ND	NEGRO	MANDÍBULA	Posterior	ND	50	SIM
31	TOQC	ND	F	ND	nd	MANDÍBULA	Anterior	ND	40	SIM
32	TOQC	ND	F	12	BRANCO	MANDÍBULA	Anterior	ND	ND	SIM
33	TOQC	ND	F	ND	BRANCO	MANDÍBULA	Posterior	60	100	SIM
34	TOQC	ND	F	13	NEGRO	MAXILA	Anterior	ND	30	SIM
35	TOQC	ND	F	22	BRANCO	MAXILA	Posterior	5	50	SIM
36	TOQC	ND	M	22	ASIÁTICO	MANDÍBULA	Posterior	ND	30	SIM
37	TOQC	ND	ND	26	ND	MANDÍBULA	Posterior	7	20	SIM
38	TOQC	ND	F	52	ND	MANDÍBULA	Posterior	48	50	SIM
39	TOQC	ND	M	32	BRANCO	MANDÍBULA	Anterior	ND	ND	SIM
40	TOQC	ND	M	ND	BRANCO	MANDÍBULA	ND	7	40	SIM
41	TOQC	ND	M	24	BRANCO	MAXILA	ND	8	3	SIM

* TOQC: Tumor odontogênico queratocístico

ANEXO C - Contagem das imuno-marcações para os anticorpos anti-p53 e anti-pRB

AP	LESÃO	P53 +	P53 -	Total p53	% p53+	PRB +	PRB -	Total PRB	% PRB+
1	Ameloblastoma	275	725	1000	28%	25	975	1000	3%
2	Ameloblastoma	130	870	1000	13%	270	730	1000	27%
3	Ameloblastoma	0	1000	1000	0%	30	970	1000	3%
4	Ameloblastoma	446	554	1000	45%	131	869	1000	13%
5	Ameloblastoma	89	911	1000	9%	534	466	1000	53%
6	Ameloblastoma	398	602	1000	40%	20	980	1000	2%
7	Ameloblastoma	9	991	1000	1%	23	977	1000	2%
8	Ameloblastoma	732	268	1000	73%	158	842	1000	16%
9	Ameloblastoma	105	895	1000	11%	5	995	1000	1%
10	Ameloblastoma	30	970	1000	3%	250	750	1000	25%
11	Ameloblastoma	757	243	1000	76%	141	905	1046	13%
12	Ameloblastoma	160	840	1000	16%	80	920	1000	8%
13	Ameloblastoma	90	910	1000	9%	60	940	1000	6%
14	Ameloblastoma	233	790	1023	23%	30	975	1005	3%
15	Ameloblastoma	87	1082	1169	7%	138	1169	1307	11%
16	Ameloblastoma	30	972	1002	3%	62	938	1000	6%
17	Ameloblastoma	109	891	1000	11%	0	1000	1000	0%
18	Ameloblastoma	254	746	1000	25%	19	981	1000	2%
19	Ameloblastoma	60	940	1000	6%	267	733	1000	27%
20	Ameloblastoma	229	771	1000	23%	103	897	1000	10%
21	Ameloblastoma	458	542	1000	46%	46	954	1000	5%
22	TOQC	32	469	501	6%	101	405	506	20%
23	TOQC	7	993	1000	1%	0	1000	1000	0%
24	TOQC	7	493	500	1%	0	500	500	0%
25	TOQC	0	500	500	0%	0	500	500	0%
26	TOQC	21	480	501	4%	263	243	506	52%
27	TOQC	215	785	1000	22%	25	975	1000	3%
28	TOQC	20	980	1000	2%	312	688	1000	31%
29	TOQC	1	499	500	0%	25	475	500	5%
30	TOQC	607	396	1003	61%	435	565	1000	44%
31	TOQC	130	870	1000	13%	210	790	1000	21%
32	TOQC	13	987	1000	1%	2	998	1000	0%
33	TOQC	82	918	1000	8%	21	979	1000	2%
34	TOQC	17	983	1000	2%	21	979	1000	2%
35	TOQC	80	920	1000	8%	79	264	343	23%
36	TOQC	630	370	1000	63%	420	580	1000	42%
37	TOQC	210	790	1000	21%	213	787	1000	21%
38	TOQC	0	1000	1000	0%	0	1000	1000	2%
39	TOQC	59	941	1000	6%	117	883	1000	12%
40	TOQC	35	965	1000	4%	212	788	1000	21%
41	TOQC	93	907	1000	9%	463	588	1051	44%

* TOQC: Tumor odontogênico queratocístico