

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Grasieli de Oliveira Ramos

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ – 1, – 2 E – 9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS  
E Ki-67 NO TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia – Área de concentração Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elena Riet  
Correa Rivero

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Inês  
Meurer

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Grasieli de Oliveira

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -  
1, -2 E -9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS E Ki-67 NO TUMOR  
ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO [dissertação] / Grasieli de  
Oliveira Ramos ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero ;  
co-orientadora, Maria Inês Meurer. - Florianópolis, SC,  
2012.

95 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Patologia Bucal. 3. Tumor  
Odontogênico Ceratocístico. 4. Imuno-histoquímica. I. Riet  
Correa Rivero, Elena. II. Meurer, Maria Inês. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia. IV. Título.

Grasieli de Oliveira Ramos

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ – 1, -2 E -9, PRESENÇA DE MIOFIBROBLASTOS E  
Ki-67 NO TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia – Área de Concentração Diagnóstico Bucal” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de Abril de 2012.

---

Prof. Dr. Ricardo Magini  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Meurer,  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero,  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Etges,  
Universidade Federal de Pelotas

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro,  
Universidade Federal de Santa Catarina



*Aos meus pais Arnaldo e Maristela,  
pelo exemplo e dedicação, vocês são o  
meu maior orgulho e exemplo de vida  
hoje e sempre, obrigada por tudo,  
minha vida não seria a mesma sem o  
apoio de vocês. Amo vocês!*

*Ao Thiago, amor e amigo que  
encontrei no caminho que trilhei.  
Obrigada pelo companheirismo, amor,  
paciência. Obrigada por estar sempre  
ao meu lado me trazendo serenidade e  
dando força sempre. Amo-te!*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me mostrar sempre os melhores sentidos a seguir.

Aos meus pais Arnaldo e Maristela por todo o esforço para que eu pudesse realizar meus sonhos e objetivos, vocês são exemplo de dignidade, humanidade, dedicação, carinho, amo vocês mais que tudo.

Ao Thiago, amor da minha vida, obrigada por todos os momentos de alegria e companheirismo que passamos juntos, você me deu força para seguir em frente, para que eu continuasse a caminhada. Obrigada pelos bons momentos que passamos, pelo apoio nas horas mais trabalhosas, pela compreensão, pela amizade, amor, pelas dicas no Excel e muitas outras, sempre me socorrendo. Obrigada por tudo!! Amo você!

À Marcia, minha sogra, muito obrigada pelo apoio, carinho e atenção que sempre me dedicou me acolhendo em sua família como uma filha, você é muito especial. Obrigada!

À minha orientadora, Elena, que me orientou não apenas na execução desse trabalho e no decorrer do meu mestrado, mas também foi decisiva na escolha da minha profissão, com seu exemplo de dedicação, profissionalismo e amor pela patologia. Elena, você foi muito mais que uma professora, foi minha amiga, um exemplo que vou seguir para a vida toda, adorei trabalhar contigo, espero que nossa parceria continue mesmo eu não estando mais na UFSC. Mais uma vez obrigada por tudo!

Aos meus amados mestres Maria Inês Meurer, Liliane Grando, Filipe Modolo Siqueira e Elena Riet C. Rivero, muito obrigada por todo o ensinamento, os momentos maravilhosos que passei com vocês. Com vocês aprendi coisas muito além de patologia, estomatologia e didática, aprendi coisas que vou levar para a vida toda, o ensinamento de vocês colaborou muito para eu ser a profissional que sou hoje. Vocês são muito mais que mestres para mim, vocês são amigos que vou levar sempre comigo. Obrigada!

À Juliana Porto, pela colaboração na execução desse projeto, sempre muito prestativa, me auxiliando em cada etapa, foi muito bom trabalhar com você, obrigada por tudo!

Ao Sérgio e Vânia, secretários da patologia, sempre prestativos, atenciosos e sempre com um sorriso no rosto e um café delicioso nos recepcionando, muito obrigada, vocês são exemplos de profissionais e pessoas maravilhosas. À secretária da pós Ana Maria, super solícita.

Ao Laboratório de Patologia Bucal (LPB/UFSC) e ao Ambulatório de Estomatologia/HU e todos os profissionais e alunos que

juntos fazem com que esses projetos cresçam sempre e que cada vez mais pessoas sejam beneficiadas com esses serviços, pois cada pessoa que trabalha lá está doando um pouquinho de sua atenção e conhecimento para que as pessoas sejam sempre bem atendidas.

Ao Serviço de Anatomia Patológica, funcionários e residentes, em especial à Dra. Gabriela, à Dra. Daniela e Eliete por me receberem muito bem, sempre muito atenciosos. À Lilian e à Aline, pela ajuda preciosa na execução das reações imuno-histoquímicas, com vocês aprendi muito e passei bons momentos.

A CAPES, pela bolsa concedida que colaborou com a minha manutenção durante boa parte do mestrado, bem como, PRPG e UFSC pelo apoio financeiro na compra do material necessário para a pesquisa, e disponibilidade de laboratórios.

Aos professores que colaboraram para ser a profissional que sou hoje. Muito obrigada por tudo! Em especial aos professores Sérgio Freitas e João Luiz Dorneles Bastos pela ajuda na análise estatística.

À minha dupla inseparável, Sarah, você é uma pessoa muito especial, uma pessoa incrível, prestativa, inteligente, tens um futuro brilhante pela frente, vou sentir muito sua falta nessa nova fase, mas saiba que minha casa vai estar sempre de portas abertas. Ao Paulo, praticamente o quarto integrante da nossa turma, pela companhia, caronas, risadas, muito obrigada por tudo, e cuida bem da minha amiga.

Aos amigos que conheci e me acompanharam nas diferentes etapas da minha vida, amigos de Chapecó, que mesmo distantes me davam força para seguir adiante no que escolhi para minha vida, em especial a Giovana. Aos amigos que conheci em Florianópolis, colegas ou não, Manu e Luann, Laís e Neimar, Carol Nass, Vanessa, Daiane, Paula, Lívia, Fernanda, Renata, Kamile, Eduardo Sá, Erick, Guilherme, Aninha, Flávia, Carol Z, Cibele, Marta, Talita, Ise, Carol da Luz. Aos amigos de mestrado, Saione, Fernanda, Claudia, Sarah, Grasiela, Marco, Gonçalo, Clessius, sucesso a todos. À Dona Rita, pela aconchegante acolhida. As famílias da Silvia e Lauri, Salete e Lauri, Lucimara e Lauri, Isane e Valmir, Neli e Odajir, tia Neide por todo apoio, amizade, famílias especiais para mim. Obrigada a todos pela amizade, carinho e companheirismo, sou muito grata por todos os momentos que passamos juntos.

A todos os meus familiares, independente da distância, todos me apoiando e me dando força para que eu possa seguir minha caminhada, mesmo que isso faça com que eu encontre com vocês uma ou duas vezes por ano.







“Nossas dúvidas são traidoras, e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, por medo de tentar.”

(William Shakespeare, 1604)



## RESUMO

O tumor odontogênico ceratocístico (TOC) é uma neoplasia odontogênica benigna de origem epitelial, de evolução lenta, o qual apresenta crescimento infiltrativo e elevado índice de recidiva após tratamento conservador, podendo ainda estar associado à síndrome do carcinoma nevoide de células basais (SCNCB). O objetivo deste estudo foi contribuir para um melhor entendimento sobre o crescimento infiltrativo do TOC, por meio da avaliação de proteínas envolvidas no processo de proliferação das células neoplásicas e na interação parênquima/estroma. A atividade proliferativa foi avaliada utilizando-se o antígeno de proliferação celular Ki-67. A interação entre parênquima/estroma foi avaliada: 1) pela produção de metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) no parênquima e estroma e 2) pela presença de miofibroblastos (MF), através da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso no estroma. Os casos submetidos à técnica de imunohistoquímica pelo método streptavidina-biotina-peroxidase foram classificados em: G1, 11 casos de TOC isolados; G2, 12 casos de TOC associados à SCNCB e G3, 6 casos de folículos pericoronários livres de inflamação (grupo controle). A análise e quantificação das reações foram obtidas com auxílio do programa NIH ImageJ. Foi realizada avaliação estatística para comparação da expressão proteica entre os grupos em estudo. Também foi realizada a correlação de Spearman, nos casos de TOC, para avaliar a existência de correlação entre os marcadores. Diferença estatística foi observada entre o grupo controle (G3) e os casos de TOC (G1 e G2) para o antígeno Ki-67, e para a MMP-1 e MMP-9 no tecido conjuntivo. Foi observada uma correlação positiva entre a MMP-1 no epitélio e no conjuntivo, MMP-2 no epitélio e MMP-1 no conjuntivo, MMP-2 no epitélio e MMP-1 no conjuntivo, MMP-9 no epitélio e MMP-1 no conjuntivo, MMP-9 e MMP-2 no epitélio, Ki-67 e MMP-1 no epitélio, MF e MMP-1 no epitélio. Concluiu-se que o aumento da atividade proliferativa no TOC está associado a um aumento da produção da MMP-1 no epitélio, o que pode influenciar no crescimento da lesão, associado ao aumento de miofibroblastos no tecido conjuntivo. A associação entre as MMPs indica a interação existente entre essas MMPs, pois a MMP-1 realiza a ativação da MMP-2 que por sua vez realiza a ativação da MMP-9.

**Palavras-chave:** Metaloproteinase de Matriz-1, Metaloproteinase de Matriz-2, Metaloproteinase de Matriz-9, Miofibroblastos, Proliferação celular, Tumores odontogênicos.

## ABSTRACT

The Keratocystic odontogenic tumor (KCOT) is a benign neoplasia of odontogenic epithelial origin. Despite its slow evolution, it shows infiltrative growth and a high recurrence index after conservative treatment. It can be associated with the naevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS). The aim of this study was to provide a better understanding of the infiltrative growth of KCOTs. This was attempted by evaluating the proliferative activity of neoplastic cells and by evaluating the interaction between parenchyma and stroma. The proliferative activity was assessed by analyzing the nuclear antigen Ki-67. The interaction between parenchyma and stroma was assessed by analyzing the following: 1) the production of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-2, MMP-9) in the parenchyma and stroma and 2) the presence of myofibroblasts (MF) in the stroma, via the expression of  $\alpha$ -smooth-muscle actin. All samples were processed using the streptavidin-biotin-peroxidase immunohistochemical technique and were classified as: G1, 11 cases of isolated KCOT; G2, 12 cases of KCOT associated with NBCCS, and G3, 6 cases of pericoronal follicles without inflammation (control group). Reaction analysis and quantification was performed with the software NIH ImageJ. Protein markers from the study groups were compared using statistical techniques. The correlation between the protein markers in KCOT cases were evaluated using the Spearman correlation test. The control group (G3) and the KCOT cases (G1 and G2) presented statistical differences in relation to the Ki-67 antigen and to the MMP-1 and MMP-9 in the stroma. A positive correlation was observed between the following markers: MMP-1 (in the) stroma and parenchyma; MMP-2 parenchyma and MMP-1 stroma; MMP-2 parenchyma and MMP-1 stroma; MMP-9 parenchyma and MMP-1 stroma; MMP-9 and MMP-2 parenchyma; Ki-67 antigen and MMP-1 parenchyma; and MF and MMP-1 parenchyma. The results obtained lead us to conclude that increased proliferative activity in the KCOT is associated with the increase of MMP-1 production in the parenchyma, which, linked with an increase of MF, may influence the growth of the lesion. The association observed between MMPs indicates real interaction between them, due to chain activation from MMP-1 to MMP-9.

**Keywords:** Matrix Metalloproteinase-1, Matrix Metalloproteinase-2, Matrix Metalloproteinase-9, Myofibroblasts, Cell proliferation, odontogenic tumors.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise histopatológica e imuno-histoquímica do tumor odontogênico ceratocístico .....	59
Figura 2: Análise histopatológica e imuno-histoquímica do folículo pericoronário.....	61



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1: Anticorpos utilizados.....</b>	<b>48</b>
---	-----------



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio-padrão dos 3 grupos.....	63
Tabela 2: Média e desvio-padrão dos 2 grupos.....	65
Tabela 3: Correlação entre a marcação dos anticorpos .....	67
Tabela 4: Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado .....	90



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TOC – Tumor odontogênico ceratocístico  
SCNCB – Síndrome do carcinoma nevoide de células basais  
MMP – Metaloproteinase de matriz  
MF – Miofibroblastos  
 $\alpha$ -SMA – Alfa actina de músculo liso  
Ki-67 – Proteína não-histona de proliferação celular  
G - Grupo  
TO – Tumores odontogênicos  
OMS – Organização mundial da saúde  
PTCH1 – Drosophila patched gene 1  
TC – Tomografia computadorizada.  
RM – Ressonância magnética  
TCFC – Tomografia computadorizada de feixe cônico  
MEC – Matriz extracelular  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
CEPSH – Comitê de ética em pesquisa com seres humanos  
HU – Hospital Universitário  
SAP – Serviço de Anatomia Patológica  
LPB – Laboratório de Patologia Bucal  
FP – Folículos pericoronários  
TA – Temperatura ambiente  
DAB – Diaminobenzidina  
p – Valor de Significância  
r – Coeficiente de correlação  
PCNA – Antígeno de proliferação nuclear  
HE – Hematoxilina e Eosina  
pH – Potencial Hidrogênico  
PBS – Tampão Fosfato Salina  
M – Molar  
IgG – Imunoglobulina G  
DPM – Desvio-padrão da média  
DP – Desvio-padrão  
 $\mu$ m – Micrômetro  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
TGF –  $\beta$ 1 – Fator de crescimento tumoral  $\beta$ 1  
PCNA – Antígeno de proliferação nuclear





## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – Alfa

% - Por cento

°C – Graus Celsius

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
TUMORES ODONTOGÊNICOS.....	29
TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO .....	30
ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67 .....	33
MIOFIBROBLASTOS.....	34
METALOPROTEINASES DE MATRIZ .....	36
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
OBJETIVO GERAL .....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>ARTIGO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<i>Apêndices</i> .....	<b>83</b>
<i>Anexos</i> .....	<b>93</b>



## INTRODUÇÃO

### TUMORES ODONTOGÊNICOS

Os tumores odontogênicos (TOs) se desenvolvem exclusivamente nos ossos gnáticos, a partir dos tecidos odontogênicos, por proliferação epitelial, mesenquimal ou ambas. Compreendem um grupo complexo de lesões com comportamento clínico e tipos histológicos diversos, variando desde lesões hamartomatosas ou proliferações teciduais não neoplásicas, até neoplasias benignas ou malignas com potencial metastático (BARNES *et al.*, 2005).

Os TOs são lesões raras. No Brasil, os estudos relatam que a incidência dessas lesões varia entre 2,4% (SANTOS *et al.*, 2001) e 6,8% (SOUSA *et al.*, 2002) de todas as lesões bucais diagnosticadas. Na América Latina os resultados encontrados são semelhantes, como no estudo multicêntrico realizado por Ledesma-Montes (LEDESMA-MONTES *et al.*, 2007) onde a incidência de TOs foi de 2,16% dos casos, e um estudo realizado no Chile onde os autores encontraram uma incidência de 1,29% (OCHSENIUS *et al.*, 2002). Outros estudos pelo mundo mostraram variações na incidência dessas lesões, como no Reino Unido, onde observou-se incidência de 0,8% (JONES; FRANKLIN, 2006) e na Nigéria, que apresentou incidência superior às relatadas em outras partes do mundo, variando entre 9,6% (LADEINDE *et al.*, 2005) e 19% (ODUKOYA, 1995).

Diferentes classificações foram publicadas na tentativa de definir os critérios diagnósticos para os TOs. Em 1869, Broca utilizou o termo odontoma para nomear qualquer lesão oriunda dos tecidos que participavam da formação dental (BROCA, 1869). Posteriormente, diversos autores passaram a utilizar e modificar essa terminologia, e somente em 1971 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira edição do "*Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions*", no qual os cistos odontogênicos também foram incluídos (PINDBORG; KRAMER; TORLONI, 1971). Em 1992 foi publicada a segunda edição da classificação da OMS, onde outras lesões, como por exemplo as lesões fibro-ósseas, foram adicionadas (REICHART; PHILLIPSEN, 2004). Finalmente, em 2005, foi publicada a mais recente classificação da OMS, "*WHO Classification of Tumours – Head and Neck Tumours*", com a inclusão do ceratocisto odontogênico entre os TOs, tendo sido renomeado para tumor odontogênico ceratocístico (TOC) (BARNES *et al.*, 2005).

## TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO

O TOC é uma lesão que passou por diversas modificações em sua classificação, sendo inicialmente chamado de cisto dentígero, cisto primordial e cisto folicular. A partir de 1950 pesquisadores perceberam que alguns cistos tinham recorrência após a remoção cirúrgica, principalmente o chamado cisto primordial. Em 1956, Philipsen publicou um artigo onde utilizou pela primeira vez a nomenclatura “ceratocisto odontogênico” para definir qualquer cisto odontogênico que apresentasse ceratinização (ortoceratina ou paraceratina) no epitélio. Posteriormente, novos estudos foram realizados, e somente lesões que apresentavam paraceratinização passaram a ser denominadas ceratocisto odontogênico, classificado então como um cisto odontogênico de desenvolvimento pela OMS. Em 2005, lesões com esse padrão histológico foram reclassificadas pela OMS como uma neoplasia cística benigna (BARRETO *et al.*, 2000; POGREL, 2003b; SHEAR, 2003b; MADRAS; LAPOINTE, 2008).

O comportamento biológico agressivo do ceratocisto odontogênico, diferente de outros cistos odontogênicos, foi uma das principais argumentações para sua recente reclassificação como neoplasia. Tal comportamento reflete-se na natureza infiltrativa que apresenta, associada ao alto grau de recidiva após tratamento conservador (SHEAR, 2003b; PHILIPSEN, 2005). Apesar de já estabelecida sua inclusão na nova classificação, ainda é raro encontrar na literatura mundial estudos de séries de casos de TOs incluindo o TOC.

Em estudo realizado após essa classificação, o TOC foi o mais frequente dos TOs (AVELAR *et al.*, 2008), posição esta anteriormente ocupada pelos odontomas e ameloblastomas (TAYLOR, 2008).

A origem histológica do TOC ainda não foi estabelecida definitivamente. Embora a maioria dos pesquisadores aceite como origem a lâmina dentária, também tem sido sugerida como origem a camada basal do epitélio bucal. O estímulo para a proliferação celular permanece desconhecido (STOELINGA, 2003).

Lesões múltiplas de TOC frequentemente estão associadas à síndrome do carcinoma nevoide de células basais ou Síndrome de Gorlin (SCNCB)(PHILIPSEN, 2005). Esta é uma síndrome rara, autossômica dominante, com história familiar bem definida, que afeta igualmente homens e mulheres. Foi descrita em 1960 por Gorlin e Goltz (GORLIN; GOLTZ, 1960), sendo caracterizada pela presença de múltiplos carcinomas basocelulares, TOCs nos maxilares, cistos epidermóides em

pele, costela bífida, manchas na planta dos pés e palma das mãos, entre outras alterações (BARRETO *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2002; GORLIN *et al.*, 2008; LO MUZIO, 2008; GOMES; DINIZ; GOMEZ, 2009; PAN; LI, 2009; VISIOLI *et al.*, 2010). O TOC pode ser uma das primeiras manifestações da SCNCB, ocorrendo, geralmente, nas primeiras décadas de vida (YAMAMOTO *et al.*, 2011).

Quando o TOC está associado à SCNCB, geralmente há lesões múltiplas e elevada taxa de recorrência, (cerca de 60% dos casos). Quando não associado, geralmente ocorre como lesão única, e com menor índice de recorrência (BAKAEEN *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2011).

A alteração genética mais importante relatada no TOC é no gene PTCH1 (*Drosophila Patched gene*). O PTCH1 é um gene que codifica uma proteína transmembrana da via de sinalização *hedgehog*, e tem um papel importante no desenvolvimento embrionário e no câncer. O gene PTCH1 tem sido descrito e mapeado no cromossomo 9q22.3-q31, na mesma região onde foi mapeado para a SCNCB. Vários estudos demonstraram que mutações no gene PTCH1 podem estar presentes em pacientes com a SCNCB (BARRETO *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2002; VISIOLI *et al.*, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2011). Alguns autores têm demonstrado que mutações no gene PTCH1 estão associadas a um subgrupo de TOCs com maior atividade proliferativa, podendo estar relacionada a um fenótipo de maior tendência à recidiva (PAN; LI, 2009).

Com relação à incidência, as lesões ocorrem da primeira à nona décadas de vida (maior prevalência em segunda e terceira décadas), havendo predileção pelo sexo masculino. A mandíbula é mais envolvida que a maxila, e cerca de metade das lesões ocorrem em região de ângulo mandibular, estendendo-se para ramo ascendente. O TOC tende a crescer no sentido ântero-posterior, pelos espaços medulares do osso, sem causar expansão de cortical óssea evidente; assim, podem se tornar lesões extensas antes do diagnóstico (PHILIPSEN, 2005). Geralmente assintomáticas, as lesões são descobertas por radiografia de rotina, embora lesões maiores e secundariamente infectadas possam estar associadas a dor, tumefação, rompimento de cortical óssea e envolvimento de estruturas adjacentes (MACDONALD-JANKOWSKI, 2011; KOENIG *et al.*, 2012).

Radiograficamente, o TOC pode apresentar aspectos variados, podendo ser encontrado como imagem radiolúcida unilocular ou multilocular, de tamanho variado, geralmente com margens lobuladas e demarcadas por delicado halo radiopaco (corticalizadas). Essa lesão

pode causar deslocamento dentário, porém a reabsorção radicular não é comum. Lesões maxilares tendem a ser menores e uniloculares, e quando grandes, podem expandir e envolver o seio maxilar. Pode haver dente incluso envolvido na lesão, conduzindo à hipótese diagnóstica para cisto dentífero (LANGLAIS; LANGLAND; NORTJÉ, 1995; RENSBURG; PAQUETTE; NORTJÉ, 2003; SHEAR, 2003a; MACDONALD-JANKOWSKI, 2011). Avaliação por Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM) podem ser importantes para delimitação mais precisa e determinação da relação da lesão com estruturas nobres (WHITE; PHAROAH, 2004). Avaliação por Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC – “*cone beam*”) não está indicada, pois quando a avaliação de tecidos moles é necessária, como no caso de lesões císticas e tumorais, deve-se optar pela Tomografia Computadorizada de Feixe em Leque (equipamentos médicos) ou pela Ressonância Magnética (SEDEXCT, 2011).

Histologicamente, o TOC apresenta cápsula fina e friável revestida por epitélio pavimentoso estratificado, fino e uniforme, com camada de paraceratina corrugada e camada basal de células colunares dispostas em paliçada. A junção epitélio-conjuntivo é plana, com frequentes áreas de desgarramento epitelial. Ilhas, cordões epiteliais e pequenos cistos satélites podem ser encontrados na cápsula fibrosa. Fitas de ceratina descamada são observadas no lúmen (PHILIPSEN, 2005). É comum a perda das características típicas epiteliais em lesões intensamente inflamadas (JORDAN, 2003). Têm sido relatada maior frequência de cistos satélites, ilhas de epitélio odontogênico na cápsula fibrosa e maior número de figuras de mitose no epitélio nos casos relacionados à SCNCB (GORLIN *et al.*, 2008).

O TOC apresenta elevado índice de recidiva após remoção cirúrgica conservadora (2,5% a 62,5%)(BORGONOVO *et al.*, 2011). Esta recidiva pode ocorrer até 10 anos após o tratamento, sendo mais comum nos 5 primeiros anos (KOLOKYTHAS *et al.*, 2007; BORGONOVO *et al.*, 2011), Por esse motivo, o paciente deve ser cuidadosamente acompanhado após o tratamento, considerando a eventual presença de cistos satélites e a tendência à multiplicidade (BELL; DIERKS, 2003; GHALI; CONNOR, 2003).

As propostas de tratamento para o TOC são diversificadas e inúmeras abordagens cirúrgicas – conservadoras e agressivas – têm sido sugeridas. Além da erradicação da lesão, as abordagens terapêuticas buscam diminuir a recidiva e a morbidade, considerando-se ainda a idade do paciente, tamanho e localização da lesão, envolvimento de



tecidos moles e histórico de tratamento anterior (KOLOKYTHAS *et al.*, 2007; BORGONOVO *et al.*, 2011).

O tratamento conservador inclui: 1) enucleação (seguida ou não de tratamento adjuvante), 2) marsupialização e, 3) descompressão (ZECHA *et al.*, 2010; BORGONOVO *et al.*, 2011). Tratamentos adjuvantes visam diminuir o índice de recidiva após tratamentos conservadores, e a aplicação da solução de Carnoy e de nitrogênio líquido são opções amplamente utilizadas (SCHMIDT; POGREL, 2001; POGREL, 2005; KOLOKYTHAS *et al.*, 2007; ZECHA *et al.*, 2010; BORGONOVO *et al.*, 2011; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2012), além de novas opções que estão sendo descritas, como a aplicação de solução de iodofórmio (ZHOU *et al.*, 2012). A marsupialização prévia à enucleação propicia a redução do tamanho da lesão, e visa preservar estruturas anatômicas importantes, como osso, tecidos moles e dentes envolvidos na lesão (POGREL, 2003a; POGREL; JORDAN, 2004; POGREL, 2005; BORGONOVO *et al.*, 2011). A enucleação pode ser seguida de curetagem ou ostectomia periférica, que visam a remoção do osso adjacente, eliminando epitélio remanescente e/ou cistos satélites (BELL; DIERKS, 2003; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2012). Modalidades mais agressivas como a ressecção marginal podem ser utilizadas em lesões multinucleadas com perfuração de cortical óssea e envolvimento de tecidos moles ou ainda em lesões que recidivaram após tratamento conservador (KOLOKYTHAS *et al.*, 2007; ZECHA *et al.*, 2010; TONIETTO *et al.*, 2011). Apesar de todas as opções de tratamento descritas, ainda não existe um consenso sobre a melhor opção de tratamento (SHARIF FYEZA *et al.*, 2010).

#### ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR Ki-67

O antígeno de proliferação Ki-67 é uma proteína não-histona produzida no núcleo das células durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, sendo ausente na fase G0. Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular e alcança altos níveis durante as fases G2 e M (BROWN; GATTER, 1990; ARISAWA *et al.*, 1999; KIMI *et al.*, 2000; URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005). Por essas razões, é considerado um dos marcadores mais confiáveis de proliferação celular (BROWN; GATTER, 1990; URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005).

A determinação do índice de proliferação celular utilizando a expressão de Ki-67 tem se mostrado útil para avaliar o comportamento

biológico do TOC (LI; BROWNE; MATTHEWS, 1995; DE VICENTE *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado expressão aumentada de Ki-67 em TOCs relacionados à SCNCB, quando comparados aos casos isolados, demonstrando que essas lesões possuem um comportamento mais agressivo, o que corrobora com o maior índice de recorrência dos casos relacionados à síndrome (LO MUZIO *et al.*, 1999; KIMI *et al.*, 2000). Quando a expressão de Ki-67 no TOC é comparada com os cistos de desenvolvimento e inflamatórios, o TOC apresenta uma expressão superior (GURGEL *et al.*, 2008; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2011), comparável à dos ameloblastomas (LI; BROWNE; MATTHEWS, 1995; THOSAPORN *et al.*, 2004; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2010; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2011).

No epitélio dos TOCs, a expressão de Ki-67 ocorre nas camadas basal e suprabasal (LO MUZIO *et al.*, 1999; KIMI *et al.*, 2000; GURGEL *et al.*, 2008; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2011). No entanto, as células que constituem a camada suprabasal são as que possuem maior atividade proliferativa (GURGEL *et al.*, 2008; MENDES; CARVALHO; VAN DER WAAL, 2011).

## MIOFIBROBLASTOS

Os miofibroblastos (MFs) são fibroblastos que possuem características semelhantes a músculo liso, com capacidade contrátil devido à elevada expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Acredita-se que os MFs derivem de células dendríticas positivas para CD34, células musculares lisas e pericitos dos vasos sanguíneos, fibroblastos, fibrócitos e até mesmo células epiteliais (NADALIN, 2008). A transdiferenciação de fibroblastos em MFs é realizada principalmente pelo fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1), e o responsável pela sua maturação é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (VERED *et al.*, 2005; NADALIN, 2008; FREGNANI *et al.*, 2009; HINZ, 2010).

Os MFs foram inicialmente encontrados no tecido de granulação de feridas abertas, e posteriormente identificados em tecidos normais que necessitam de resistência mecânica, como gengiva marginal, mucosa do palato, glândulas sudoríparas, bulbo dos folículos capilares, gânglios linfáticos, vasos sanguíneos, mucosa uterina, estroma testicular, vilosidades intestinais e septos pulmonares (TOMASEK *et al.*, 2002). Também estão presentes nas cicatrizes hipertróficas, cirrose,

fibrose renal, lesões reativas, fibromatoses e lesões fibrocontráteis, tumores benignos localmente agressivos, sarcomas, assim como no estroma reacional de tumores epiteliais (FLETCHER, 1998; DESMOULIERE; GUYOT; GABBIANI, 2004; DAYAN; NASRALLAH; VERED, 2005; NADALIN, 2008). Os MFs podem estar presentes em muitas condições patológicas da mucosa bucal como fibroma de células gigantes (WEATHERS; CAMPBELL, 1974; DAYAN; BUCHNER; DAVID, 1989), lesão periférica de células gigantes (DAYAN; BUCHNER; DAVID, 1989) e fibrose submucosa bucal (ANGADI; KALE; HALLIKERIMATH, 2011).

Os MFs têm sido evidenciados no estroma de vários tumores malignos invasivos e metastáticos caracterizados pela consistência dura e retração, como por exemplo no carcinoma ductal de mama associado a depressão em pele ou retração do mamilo (SCHURCH; SEEMAYER; LAGACE, 1981; SEEMAYER; SCHÜRCH ; LAGACÉ, 1982). Inicialmente acreditava-se que os MFs eram responsáveis pelo mecanismo defensivo de isolar a lesão e impedir a invasão de células malignas; porém, nos últimos anos, estudos têm demonstrado que a presença de MFs no fronte de invasão está relacionada à progressão tumoral, participando na modulação da angiogênese, facilitação da invasão das células tumorais e promoção da metastatização, uma vez que, além de produzir colágeno, eles também são responsáveis pela síntese de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, como as metaloproteinases de matriz (MMP), favorecendo assim o crescimento invasivo da lesão (VERED *et al.*, 2005; NADALIN, 2008).

A cooperação entre as células epiteliais e o estroma é de fundamental importância na progressão tumoral. É bem conhecido que uma das características de muitas neoplasias epiteliais é a reação estromal, caracterizada pelo acúmulo local de células e de componentes do tecido conjuntivo, na qual é fundamental a participação dos MFs (DESMOULIERE; GUYOT; GABBIANI, 2004).

A ativação de MFs no estroma parece ser uma etapa importante no crescimento e progressão tumorais. Alguns estudos demonstraram que o aumento da expressão de MFs no estroma de diversas neoplasias está relacionado a um pior prognóstico para o paciente (NADALIN, 2008; THODE *et al.*, 2011). Em carcinomas epidermóides de boca, o aumento de MFs foi relacionado a metástases para linfonodos, invasão vascular e perineural, além de menor tempo de sobrevida dos pacientes (KELLERMANN *et al.*, 2007).

Poucos estudos têm sido realizados visando investigar a participação dos MFs na progressão e desenvolvimento de lesões

císticas dos maxilares (VERED *et al.*, 2005), embora se saiba que os mesmos são constituintes importantes da cápsula fibrosa de cistos odontogênicos e TOCs (LOMBARDI; MORGAN, 1995).

A expressão aumentada de TGF- $\beta$ 1 foi encontrada nos epitélios das lesões odontogênicas, especialmente no ameloblastoma e no TOC, com resultados semelhantes ao descrito no estroma de carcinomas; isso pode explicar o aumento da frequência de MFs nessas lesões (VERED *et al.*, 2005). Quando a presença de MF no estroma é abundante, podemos esperar um comportamento mais agressivo de cistos e TOs (VERED *et al.*, 2005).

Considerando que a expressão de  $\alpha$ -SMA é mais abundante no TOC que em cistos dentígeros e radiculares, tem sido levantada a hipótese de que a presença de MFs na cápsula fibrosa possa desempenhar papel importante na progressão do TOC (NADALIN, 2008).

Segundo Fregnani *et al.* (2009), a presença abundante de MFs e a expressão de MMP-2 em ameloblastomas sólidos contribui para um comportamento mais agressivo, como por exemplo a ruptura de corticais ósseas. Também foi demonstrado nesse estudo que os MFs são a principal fonte de MMP-2 no estroma dos ameloblastomas (FREGNANI *et al.*, 2009).

De acordo com Nonaka *et al.* (2011), os MFs constituem um componente importante da cápsula fibrosa dos TOCs e, embora não seja possível correlacionar diretamente o comportamento biológico dessas lesões com a quantidade de MFs, a presença dessas células possivelmente contribui para a progressão da lesão através da secreção de fatores de crescimento e proteases.

## METALOPROTEINASES DE MATRIZ

A matriz extracelular (MEC) é formada por um complexo de proteínas e glicoproteínas que são secretados e formam uma rede organizada que envolve as células; pode ser encontrada na cartilagem, no tecido conjuntivo e nos tecidos mineralizados (como osso e dentina). É constituída por colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e elastina (HALL; EMBERY, 1997; HILLMANN; GEURTSSEN, 1997). Além de propiciar a sustentação dos tecidos, a MEC desempenha um papel essencial no desenvolvimento de processos biológicos de reparo tecidual e metástase através da regulação da proliferação, diferenciação, adesão, migração e expressão gênica celular (HILLMANN; GEURTSSEN, 1997; BANERJEE *et al.*, 2003).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que estão envolvidas na degradação da MEC. Em condições fisiológicas, desempenham funções importantes na regulação da MEC durante a embriogênese ou remodelação de tecidos. Em condições patológicas, as MMPs participam da destruição da MEC em processos inflamatórios como a doença periodontal, e durante o crescimento de tumores e cistos (WESTERMARCK; KAHARI, 1999; CARVALHO, 2006; NADALIN, 2008; MORRISON *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2009; AMALINEI *et al.*, 2010). As MMPs são secretadas por células como fibroblastos, osteoblastos e/ou osteoclastos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células sinoviais, ceratinócitos e células tumorais (NADALIN, 2008; MORRISON *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; ZITKA *et al.*, 2010).

Muitos tumores produzem as MMPs como parte do mecanismo de invasão; no entanto, o processo ainda não é muito conhecido (YU; STAMENKOVIC, 2000). A degradação dos componentes da MEC pelas MMPs favorece a migração, diferenciação e proliferação celular que ocorrem nos processos de reparo, angiogênese, invasão de células neoplásicas e metástase. A ação das MMPs disponibiliza fatores de crescimento no meio, modificando a MEC e expondo sítios ocultos que alteram o ambiente tecidual, favorecendo assim o desenvolvimento e crescimento de tumores primários e metastáticos (KUMAMOTO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004; CARVALHO, 2006; MORRISON *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2009; ZITKA *et al.*, 2010).

Cerca de vinte e quatro tipos de MMPs já foram identificadas em humanos, classificadas de acordo com sua estrutura molecular e o substrato que degradam. Elas se dividem em MMPs associadas à membrana e em MMPs solúveis. As MMPs associadas à membrana são representadas por seis tipos, divididas de acordo com o mecanismo de ancoragem à membrana. As MMPs solúveis são divididas principalmente em collagenases (degradam o colágeno intersticial tipo I, II, III e V), gelatinases (degradam colágenos previamente desnaturados) e estromelisinases (degradam especificamente fibronectina, elastina, laminina e a proteína central das proteoglicanas) (VISSE; NAGASE, 2003; SORSA; TJADERHANE; SALO, 2004; CARVALHO, 2006; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; NADALIN, 2008; MORRISON *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; AMALINEI *et al.*, 2010; ZITKA *et al.*).

A metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1), ou collagenase A, faz parte do grupo das collagenases e participa da clivagem de colágeno tipo

I, II, III, VII, VIII e X, além de outras moléculas como a tenacina C. Ela participa de processos como migração de ceratinócitos e reepitelização, aumento da proliferação celular e ação pró e anti-inflamatória (VISSE; NAGASE, 2003; AMALINEI *et al.*, 2010). É sintetizada por células tumorais, fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos. Durante o processo de invasão, sua produção ocorre em resposta a fatores produzidos pelas células neoplásicas, e sua expressão é observada no estroma junto ao local de invasão (ALA-AHO; KAHARI, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009; AMALINEI *et al.*, 2010).

A metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2), ou gelatinase A, tem como principal função degradar colágeno tipo IV e outros componentes da MEC como colágeno tipo V, VII, X, gelatina tipo I, fibronectina e elastina (VISSE; NAGASE, 2003; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; AMALINEI *et al.*, 2010). Sua expressão está associada à odontogênese, patogênese e progressão de lesões periapicais, cistos odontogênicos (KUBOTA *et al.*, 2002), ameloblastomas (KUMAMOTO *et al.*, 2003) e na invasão do carcinoma epidermóide (BAKER *et al.*, 2006; O'GRADY *et al.*, 2007). Segundo Zhang *et al.* (2009), a MMP-2 é uma das mais importantes enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal e a MEC, estando relacionada à invasão tumoral e metástase.

A metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), ou gelatinase B, assim como a MMP-2, possui a capacidade de degradar colágeno do tipo IV e V, além das gelatinas I e V. É secretada por células tumorais e células inflamatórias, sendo responsável pelo aumento da afinidade ao colágeno, ação pró e anti-inflamatória e resistência das células tumorais aos mecanismos de defesa do hospedeiro (VISSE; NAGASE, 2003; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; AMALINEI *et al.*, 2010).

Nos cistos odontogênicos, estudos indicam que as MMPs estão relacionadas ao crescimento e expansão cística, devido à capacidade dessas proteínas em degradar os componentes da MEC (RIBEIRO *et al.*, 2009). A MMP-1 foi observada no revestimento epitelial, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos dos cistos odontogênicos (LIN *et al.*, 1997), e juntamente com as MMP-2 e a MMP-9, participa do mecanismo de expansão dos cistos odontogênicos (TENERON *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1997). No TOC, essas MMPs são observadas no revestimento epitelial e no tecido conjuntivo da cápsula (CAVALCANTE *et al.*, 2008; HENRIQUES *et al.*, 2011), estando associadas ao comportamento mais agressivo, quando comparadas aos cistos odontogênicos, especialmente as MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 (WAHLGREN *et al.*, 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2008; DE ANDRADE SANTOS *et al.*, 2011; HENRIQUES *et al.*, 2011). No

TOC, a MMP-2 e MMP-13 modulam outras proteínas, como a laminina-5, contribuindo na proliferação e migração das células epiteliais, assim como no desprendimento do revestimento epitelial da cápsula de tecido conjuntivo (WAHLGREN *et al.*, 2003). A MMP-1 tem sido ainda associada à maior agressividade dos casos relacionados à SCNCB (CAVALCANTE *et al.*, 2008). A expressão elevada de MMP-9 no TOC sugere uma possível participação dessa proteína na proliferação e diferenciação celular, causando maior reabsorção óssea e conferindo ao tumor um potencial de invasão maior – e conseqüentemente pior prognóstico – quando comparados aos cistos odontogênicos (HENRIQUES *et al.*, 2011). A imunorreatividade da MMP-9 nos componentes epitelial e mesenquimal dos cistos odontogênicos e TOCs indica que a interação entre o epitélio e mesênquima são determinantes para a regulação do crescimento e progressão das lesões odontogênicas, servindo como indicador do grau de agressividade local desses cistos e TOs (HENRIQUES *et al.*, 2011).

Nos TOs as MMPs estão relacionadas ao mecanismo de crescimento e progressão tumorais (RIBEIRO *et al.*, 2009). Elas já foram observadas no epitélio e estroma de ameloblastomas (KUMAMOTO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2010) tendo sido associada à progressão tumoral (KUMAMOTO *et al.*, 2003) e ao índice proliferativo (RIBEIRO *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011), principalmente a MMP-1 (RIBEIRO *et al.*, 2009) e a MMP-9 (HENRIQUES *et al.*, 2011). A MMP-2 também tem sido associada ao comportamento mais agressivo e infiltrativo do ameloblastoma (ZHANG *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2010). MMP-2 e MMP-9 estão associadas à interação existente entre as células epiteliais e mesenquimais, além da regulação da progressão tumoral (KUMAMOTO *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011).

De acordo com Pinheiro *et al.* (2005), as MMPs participam do processo de reabsorção óssea no ameloblastoma, já que com a solubilização da matriz ocorre a liberação de fatores de crescimento e citocinas que ficam disponíveis para as células do tumor localizadas próximo ao osso. Além de estimular a secreção de mais MMPs pelas células do ameloblastoma, agem também como mitógenos, promovendo aumento na proliferação das células neoplásicas, contribuindo para a invasividade local do ameloblastoma (PINHEIRO *et al.*, 2004). As MMPs contribuem também para o crescimento de outros TOs como o tumor odontogênico cístico calcificante, influenciado principalmente

pela presença de MMP-1, MMP-7 e MMP-9 no epitélio e estroma. (SIQUEIRA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011).



## **JUSTIFICATIVA**

Considerando que o TOC é uma lesão benigna com alto índice de recidiva, associada ao comportamento infiltrativo, isso estimula o desenvolvimento de estudos com a finalidade de elucidar o comportamento biológico do mesmo. Nesse contexto, o estudo da atividade proliferativa do parênquima do TOC, associado interação deste com o estroma, são fatores que podem contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico dessa doença.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliação imuno-histoquímica das metaloproteinases da matriz - 1, -2 e -9 , miofibroblastos e proliferação celular em TOCs e folículos pericoronários (FPs)

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular a frequência da expressão das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9 nos TOCs e FPs;
- Analisar o local da expressão das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9 e do antígeno de proliferação Ki-67 nos TOCs e FPs;
- Avaliar a presença de miofibroblastos, por meio da expressão da proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso em TOCs e FPs;
- Verificar a taxa de proliferação das células epiteliais, por meio da marcação do antígeno de proliferação celular, Ki-67, em TOCs e FPs;
- Comparar a expressão de cada proteína nos casos de TOC e FP;
- Comparar a expressão de cada proteína nos casos de TOC isolados e associados à SCNCB;
- Comparar a expressão das proteínas entre si nos casos de TOC;
- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.



## ARTIGO

Artigo formatado conforme normas da revista *Histopathology* (acessadas em: 06/06/2012), exceto em relação ao idioma.

### TÍTULO

Avaliação de MMPs, miofibroblastos e Ki-67 no TOC e no FP

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), taxa de proliferação celular e a presença de miofibroblastos (MFs), no tumor odontogênico ceratocístico (TOC) e no folículo pericoronário (FP).

**Metodologia e resultados:** Foi realizado o levantamento dos casos de TOC diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Destes, foram selecionados 11 casos de TOC isolados (G1) e 12 casos de TOC associados à SCNCB (G2) para investigação imuno-histoquímica das proteínas MMP-1, MMP-2, MMP-9, Ki-67 e  $\alpha$ -SMA (MFs). Também foi incluído um grupo controle constituído de 6 casos de FP (G3). Na comparação entre os grupos, foi observada diferença estatística para a MMP-1 e MMP-9 (apenas no tecido conjuntivo), assim como para o Ki-67 entre o G3 e os grupos G1/G2. Na correlação de Spearman foi observado que a expressão da MMP-1 no epitélio teve uma correlação positiva com a expressão de Ki-67, assim como os MFs com a MMP-1 no conjuntivo. Outras correlações positivas ocorreram entre a expressão de MMP-1 no conjuntivo com a MMP-2 e a MMP-9 no epitélio, e a expressão da MMP-2 com a MMP-9 no epitélio.

**Conclusão:** A MMP-1 e MMP-9, assim como a atividade proliferativa, têm importante papel na patogênese do TOC, sendo que a maior expressão de MMP-1 está relacionada com aumento da atividade proliferativa nessa lesão.

**Palavras-chave:** Metaloproteinase de Matriz-1, Metaloproteinase de Matriz-2, Metaloproteinase de Matriz-9, Miofibroblastos, Proliferação celular, Tumores odontogênicos, Síndrome de Gorlin.

## INTRODUÇÃO

O Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC) é classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma neoplasia odontogênica cística, de comportamento agressivo, associado a alto grau de recidiva após tratamento conservador, podendo estar associada à síndrome do carcinoma nevoide de células basais - SCNCB<sup>1</sup>. A atividade proliferativa do parênquima e a interação entre este e o estroma são fatores envolvidos no padrão de crescimento e proliferação desse tumor<sup>2,3</sup>.

A expressão aumentada de Ki-67 tem se mostrado útil no entendimento da biologia neoplásica, sendo usada como um importante marcador para determinar o índice de proliferação celular<sup>2,4</sup>. A cooperação entre estroma e parênquima também é de fundamental importância na progressão tumoral. A reação estromal, caracterizada pelo acúmulo local de células e de componentes do tecido conjuntivo - e na qual é fundamental a participação dos miofibroblastos (MFs) - é uma característica bem conhecida de muitas neoplasias epiteliais<sup>5</sup>.

Os MFs são fibroblastos que expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)<sup>3,6</sup>, estando presentes tanto em tecidos normais que necessitam de resistência mecânica<sup>7</sup> como em diversas doenças<sup>5,8</sup>.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz extracelular (MEC) em condições fisiológicas e patológicas<sup>9,10</sup>. A MMP-1 (colagenase A) participa de processos como a migração de ceratinócitos e reepitelização, aumento da proliferação celular e ação pró e anti-inflamatória<sup>11</sup>. A MMP-2 (gelatinase A) participa da degradação do colágeno tipo IV e outros componentes da MEC como o colágeno tipo V, VII, X, gelatina tipo I, fibronectina e elastina<sup>11,12</sup>. A MMP-9 (gelatinase B) participa da degradação do colágeno tipo IV e V, além das gelatinases I e V. É responsável pelo aumento da afinidade pelo colágeno, tem ação pró e anti-inflamatória e aumenta a resistência das células tumorais aos mecanismos de defesa do hospedeiro<sup>11,12</sup>.

Considerando que a atividade proliferativa, além da interação entre estroma e parênquima, são fatores fundamentais para o processo de invasão neoplásica e compreensão do comportamento biológico do TOC, objetivamos neste estudo a avaliação da expressão das proteínas MMP-1, 2, 9, Ki-67 e presença dos MFs em casos de TOC associados ou não à SCNCB e em FPs.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção da amostra

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC. As amostras foram selecionadas nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP-HU) da UFSC, com laudos histopatológicos de TOC. Foram selecionados ainda, 6 folículos pericoronários (FP) removidos de terceiros molares completamente inclusos e livres de processo inflamatório, para controle da expressão imuno-histoquímica nos tecidos odontogênicos normais. Para a realização da técnica imuno-histoquímica foram selecionados 23 casos de TOC onde era possível observar a presença de revestimento epitelial e cápsula fibrosa. As amostras foram divididas em três grupos G1: 11 casos de TOC isolados; G2, 12 casos de TOC associados à SCNCB; e G3, 6 casos controle (FP).

### Técnica imuno-histoquímica

As amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3 $\mu$ m de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com a solução de 3-aminopropyltriethoxylene (Sigma®, St. Louis, MO, EUA). Para as reações imuno-histoquímicas, foi realizada a desparafinização e reidratação dos cortes, seguidas de imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 2% com metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato em banho-maria. Os anticorpos primários (Quadro 1) foram incubados por 18 horas em temperatura ambiente (TA). O anticorpo secundário (anti-IgG biotinado – Dako, Dinamarca) foi incubado em TA por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação do complexo streptavidina-biotina-peroxidase durante 40 minutos. As lâminas foram coradas com solução cromógena DAB (Biocare CA, USA) e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha).

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Controle Positivo
MMP-1	Policlonal	DBS	1:400	Placenta
MMP-2	Policlonal	Sigma	1:100	Carcinoma de mama
MMP-9	Policlonal	Sigma	1:250	Medula
$\alpha$ -SMA	Policlonal	Sigma	1:1000	HFI; Vasos sanguíneos
Ki- 67	Monoclonal – SP6	Biocare	1:100	Carcinoma epidermóide

### Quadro 1: Anticorpos utilizados.

HFI – hiperplasia fibrosa inflamatória

#### Análise imuno-histoquímica

A análise das reações imuno-histoquímicas foi realizada utilizando o software NIH ImageJ 1.45q (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica (Cannon, A620) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400X.

A imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais (positivas e negativas) em até 10 campos consecutivos. Posteriormente, foi realizada a média de células positivas para cada caso.

A avaliação para MMP-1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma, foi obtida individualmente no estroma e epitélio, através da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do epitélio ou estroma em cada campo (pixels totais), em 10 campos consecutivos para cada caso, quando avaliamos o revestimento epitelial removemos da imagem a porção referente ao tecido conjuntivo e quando avaliamos o tecido conjuntivo removemos da imagem a porção referente ao tecido epitelial. No estroma também foram excluídas as células inflamatórias e endoteliais. Essas exclusões foram realizadas com auxílio do programa ImageJ, onde era possível selecionar essas porções e remove-las das imagens.

Para verificar a presença de MFs foi observada a expressão de  $\alpha$ -SMA nos fibroblastos presentes na cápsula de tecido conjuntivo fibroso, logo abaixo do revestimento epitelial. A avaliação do antígeno  $\alpha$ -SMA foi realizada através da contagem do total de células positivas por campo, em 10 campos consecutivos para cada caso. Posteriormente, foi calculada a média de células positivas para cada caso, somando-se o total de células positivas em todos os campos e dividindo-se pelo total de campos. Foram consideradas positivas as células que tiveram



marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e células nas proximidades dos vasos sanguíneos, pois essas células podem interferir nos resultados devido a expressão de  $\alpha$ -SMA.

### Análise estatística

Para a comparação entre os três grupos (G1, G2 e G3), a partir dos resultados da análise quantitativa dos anticorpos estudados, foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Para comparar resultados dos casos de TOC associados ou não à SCNCB foi realizado teste estatístico de Mann Whitney. Também foi avaliada a correlação entre a marcação das proteínas em estudo por meio da comparação de Spearman, através das médias obtidas.

Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas/ área corada  $\pm$  os desvios-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de  $P \leq 0,05$  para dados com significância estatística.

## RESULTADOS

No TOC (Figura 1A), as células positivas para Ki-67 estavam localizadas principalmente na camada suprabasal do revestimento epitelial (Figura 1B). No FP (Figura 2A), a marcação para esse antígeno foi escassa (Figura 2B).

A expressão de MMP-1 e MMP-2 (Figura 1 C e D), no TOC mostrou marcação intensa em toda a extensão do epitélio, bem como nos fibroblastos localizados no tecido conjuntivo logo abaixo do revestimento epitelial. No FP, a marcação para MMP-1 foi semelhante ao TOC, porém no tecido conjuntivo foi escasso (Figura 2C). A MMP-2 foi abundante no epitélio e no tecido conjuntivo dos casos de FP (Figura 2D).

A expressão de MMP-9 nos casos de TOC (Figura 2E) foi observada em toda a extensão do revestimento epitelial com intensidade fraca, porém com intensidade maior nas camadas basais e suprabasais. No tecido conjuntivo, os fibroblastos positivos foram observados logo abaixo do revestimento epitelial. Nos FP a marcação no epitélio foi semelhante ao TOC, já no tecido conjuntivo foi escassa (Figura 2E).

A marcação para  $\alpha$ -SMA foi observada de maneira difusa pelo tecido conjuntivo, em todos os casos de TOC estudados (Figura 1F),

bem como nos casos de FPs (Figura 2F). Nos FP a marcação foi levemente superior quando comparados aos casos de TOC.

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 1) demonstrou diferença estatisticamente significativa para a marcação de Ki-67, MMP-1 e MMP-9, os dois últimos apenas no tecido conjuntivo, entre os casos de TOC e de FP.

O teste de Mann Whitney (Tabela 2) não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os TOCs isolados e associados à SCNCB.

Na correlação de Spearman (Tabela 3) verificou-se forte correlação positiva entre MMP-1 e MMP-2 no revestimento epitelial, indicando que quando uma estiver aumentada no revestimento epitelial a outra também estará. Outras correlações positivas encontradas foram entre MMP-1 em epitélio e conjuntivo, MMP-2 em epitélio e MMP-1 em conjuntivo, MMP-9 em epitélio e MMP-1 em conjuntivo, MMP-2 e MMP-9 no epitélio, Ki-67 e MMP-1 no epitélio, MFs e MMP-1 no epitélio.

## DISCUSSÃO

A reclassificação do TOC ocorreu considerando-se o seu comportamento mais agressivo, o alto índice de recidiva após tratamento conservador e associação com a SCNCB<sup>1</sup>. Entre os TOs diagnosticados em dois Laboratórios de Histopatologia da UFSC, o TOC representou 51% dos casos (dados ainda não publicados). Outros estudos também têm demonstrado a maior frequência de TOC entre os TOs<sup>13, 14</sup>.

Embora o TOC seja uma lesão com características morfológicas de cisto, o seu comportamento biológico é condizente com lesão tumoral, o que estimula o desenvolvimento de pesquisas para avaliação desse comportamento. No presente estudo, na avaliação da taxa proliferativa do TOC observamos que o Ki-67 foi expresso principalmente nas camadas basal e suprabasal, como já relatado por outros autores<sup>2, 4, 15-17</sup>. Em nosso estudo o índice de proliferação celular foi mais elevado nos casos de TOC isolados, porém sem diferença estatisticamente significativa, achado também descrito por Li *et al.* (1995)<sup>4</sup>, Kolar *et al.* (2006)<sup>18</sup> e Gurgel *et al.* (2008)<sup>19</sup>. Outros autores<sup>15, 20, 21</sup> realizaram estudos com antígeno de proliferação nuclear (PCNA), e verificaram que a proliferação celular foi maior nos casos associados à SCNCB, indicando que esse é um provável fator para o comportamento mais agressivo desses casos. No presente estudo na comparação do índice proliferativo nos casos de TOC com os casos controle,

observamos uma diferença estatisticamente significativa, o que já era esperado visto que a atividade proliferativa é um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento e crescimento do TOC<sup>22, 23</sup>.

Uma vez que a presença de inflamação além de alterar o revestimento epitelial do TOC<sup>24, 25</sup>, interfere na produção das MMPs<sup>26, 27</sup>, tivemos o cuidado de não incluir na avaliação das MMPs as áreas inflamadas do estroma.

Com relação à MMP-1, sua expressão em TOCs foi observada no revestimento epitelial e no tecido conjuntivo em 100% dos casos. Em estudo semelhante ao nosso<sup>28</sup>, foi observada a expressão dessa MMP no revestimento epitelial em 95% dos casos de TOCs e no tecido conjuntivo em 80% dos casos. Esses mesmos autores observaram uma maior marcação da MMP-1 nos casos associados à SCNCB<sup>28</sup>. Em nosso estudo, embora tenha ocorrido uma marcação superior de MMP-1 no conjuntivo dos casos relacionados à SCNCB, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Encontrou-se, ainda, diferença estatisticamente significativa na expressão de MMP-1 no tecido conjuntivo dos TOCs, em relação aos FPs, demonstrando uma possível associação dessa MMP com a progressão da lesão.

A expressão da MMP-2 tem sido relacionada, em ameloblastomas, ao crescimento e progressão tumoral<sup>29</sup>, ao comportamento infiltrativo mais agressivo<sup>30, 31</sup>, bem como ao processo de reabsorção e ruptura de corticais ósseas<sup>30</sup>. Considerando a maior expressão de MMP-2 nos casos de TOC, quando comparados aos cistos odontogênicos<sup>32</sup>, essa MMP tem sido associada ao comportamento mais agressivo do TOC, influenciando o crescimento tumoral e a migração celular. Em nosso estudo, a MMP-2 foi observada em 100% dos casos, conforme já relatado por outros autores<sup>32-34</sup>; no entanto, não observou-se diferença estatística entre os grupos.

A expressão de MMP-9 foi observada no revestimento epitelial em 100% dos casos, assim como nos estudos de Henriques *et al.* (2011)<sup>35</sup> e de Andrade Santos *et al.* (2011)<sup>36</sup>, e no tecido conjuntivo em 91% dos casos, semelhante ao encontrado por outros autores que afirmam que a expressão da MMP-9 varia entre 85%<sup>36</sup> e 100%<sup>35</sup>. Na comparação entre os grupos, os casos de TOC apresentaram uma expressão significativamente superior de MMP-9 no tecido conjuntivo quando comparados aos casos de FPs, indicando que essa MMP pode estar associada à progressão da lesão, como já demonstrado por De Andrade Santos *et al.* (2011)<sup>36</sup>. De acordo com esses autores, a alta expressão de MMP-9 no conjuntivo contribui para o comportamento mais agressivo, promovendo a destruição da MEC<sup>36</sup>. Esses mesmos

autores encontraram maior expressão da MMP-9 no revestimento epitelial do TOC, quando comparadas aos cistos radiculares e dentígeros, associando-a com a degradação da membrana basal<sup>36</sup>. De acordo com Henriques *et al.* (2011)<sup>35</sup> a produção elevada de MMP-9, em ameloblastomas e TOCs pode servir como um indicador do grau de agressividade local desses TOs.

Muitos estudos têm demonstrado a importância dos MFs na biologia dos TOs. Smith<sup>37</sup>, em 1986, foi o primeiro a inferir que a presença de MFs no estroma poderia estar associada ao comportamento mais agressivo dos ameloblastomas. De acordo com Vered *et al.* (2005)<sup>3</sup>, a maior incidência de MFs no estroma de TOCs e ameloblastomas, quando comparada à incidência dessas células no conjuntivo de cistos radiculares e dentígeros, estaria relacionada à maior agressividade dessas lesões; esse grupo também afirmou que a atuação dessas células pode ser modulada pelo epitélio em TOCs e ameloblastomas, de forma semelhante ao que ocorre no carcinoma epidermóide.

Em nosso estudo, os MFs estiveram presentes em 100% dos casos, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, semelhante ao observado por Nonaka *et al.*, 2011<sup>38</sup>. Os MFs são um componente importante no tecido conjuntivo dos TOCs, porém a presença dos mesmos não parece relacionada ao comportamento mais agressivo dos casos associados à SCNCB. Apesar de não apresentar diferença estatística cabe ressaltar que a presença dos MFs foi mais intensa nos casos de FP (controle), sendo que esse achado não foi relatado anteriormente. Essa maior expressão de  $\alpha$ -SMA nos FP, provavelmente está associada a remodelação óssea que ocorre durante o processo de formação e erupção dental<sup>39</sup>.

A associação entre a MMP-1 e MMP-2 no epitélio e entre a MMP-2 e MMP-9 no revestimento epitelial, observada na correlação de Spearman, indica a interação existente entre elas, pois a MMP-1 realiza a ativação da MMP-2 que por sua vez realiza a ativação da MMP-9<sup>40, 41</sup>, além da ativação de outras MMPs que não foram alvo do presente estudo<sup>40, 42</sup>. A correlação entre MMP-2 e MMP-9 observada em nosso estudo foi divergente do relatado por Moraes (2010)<sup>34</sup>, segundo o qual essas MMPs estariam inversamente associadas, possuindo funções diferentes no processo patológico.

Outra importante interação observada entre parênquima e estroma foi a associação entre MMP-1 no conjuntivo e a MMP-2 e MMP-9 no revestimento epitelial, indicando que a presença de uma MMP ativa a produção das demais.

A associação entre a MMP-1 no epitélio e o Ki-67 evidencia que a MMP-1 está associada ao grau de proliferação dessas lesões, corroborando estudos de outros autores<sup>11, 26, 43, 44</sup>.

Os MFs estão relacionados à MMP-1 no revestimento epitelial indicando uma interação entre o parênquima e o estroma dessas lesões, sendo possível afirmar que os MFs, presentes no estroma, induzem a produção de MMP-1 no epitélio, visto que a MMP-1 pode ser produzida por fibroblastos<sup>9, 44</sup>. A relação dos MFs com a MMP-2 não foi observada, assim como no estudo de Nadalin (2008)<sup>33</sup>, permitindo concluir que a presença de MFs no tecido conjuntivo não está associada à maior expressão de MMP-2, diferente do que foi relatado para ameloblastomas<sup>30</sup>.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, concluiu-se que a expressão elevada de MMP-1, MMP-9 e Ki-67 pode estar associada ao comportamento biológico dos TOCs.

A MMP-1 pode estar associada ao grau de proliferação celular dos TOCs, participando do processo de crescimento tumoral.

A presença de MFs no tecido conjuntivo pode induzir a produção de MMP-1 no revestimento epitelial, demonstrando assim uma interação entre estroma e parênquima.

Outra forma de interação entre estroma e parênquima pode ser demonstrada pela associação entre a MMP-1 no tecido conjuntivo e MMP-2 e MMP-9 no revestimento epitelial, indicando uma interação entre essas MMPs.

A associação entre a MMP-1 e MMP-2, bem como entre a MMP-2 e MMP-9 no revestimento epitelial, pode sugerir a interação que ocorre entre essas MMPs, visto que a MMP-1 realiza a ativação da MMP-2 que por sua vez realiza a ativação da MMP-9.

## REFERÊNCIAS

1. Philipsen HP. Keratocystic odontogenic tumour. In Barnes L, W. EJ, P. R, D. S eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon, 2005;296-300.
2. de Vicente JC, Torre-Iturraspe A, Gutiérrez AM, Lequerica-Fernandez P. Immunohistochemical comparative study of the

odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15:e709-715.

3. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncology* 2005;41:1028-1033.

4. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med* 1995;24:221-226.

5. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani C. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *International Journal of Developmental Biology* 2004;48:509-517.

6. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics* 2010;43:146-155.

7. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.

8. Dayan D, Nasrallah V, Vered M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. nodular fasciitis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2005;34:426-435.

9. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:215-228.

10. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2009;1803:39-54.

11. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.

12. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573.

13. Avelar RL, Antunes AA, Santos TS, Andrade ES, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74:668-673.

14. Gaitán-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER. Reclassification of odontogenic keratocyst as

tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. *Oral Dis*;16;185-187.

15. Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, K M. Analysis of apoptosis-related factors and apoptotic cells in lining epithelium of odontogenic keratocystic. *Oral Med Pathol* 2000;5;35-40.

16. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34;280-286.

17. Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111;333-339.

18. Kolár Z, Geierová M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006;35;75-80.

19. 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;39;311-316.

20. el Murtadi A, Grehan D, Toner M, McCartan BE. Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81;217-220.

21. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G et al. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevroid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res* 1999;78;1345-1353.

22. de Oliveira M, da Silva Lauxen I, Chaves A, Rados P, Sant'Ana Filho M. Odontogenic Epithelium: Immunolabeling of Ki-67, EGFR and Survivin in Pericoronal Follicles, Dentigerous Cysts and Keratocystic Odontogenic Tumors. *Head and Neck Pathology*;5;1-7.

23. Soluk Tekkesin M, Mutlu S, Olgaac V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. *Turk Patoloji Derg* 2012;28;49-55.

24. Paula AMB, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2000;29;477-482.

25. Jordan RCK. Histology and ultrastructural features of the odontogenic keratocyst. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am* 2003;15;325-333.
26. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology* 2001;11;S37-S43.
27. Swarnakar S, Paul S, Singh LP, Reiter RJ. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *Journal of Pineal Research* 2011;50;8-20.
28. Cavalcante RB, Pereira KM, Nonaka CF, Nogueira RL, de Souza LB. Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106;99-105.
29. Ribeiro BF, Iglesias DPP, Nascimento GJF, Galvao HC, Medeiros AMC, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1,-2, and-9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Diseases* 2009;15;472-477.
30. Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of Myofibroblasts and Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in Ameloblastomas Correlate with Rupture of the Osseous Cortical. *Pathology & Oncology Research* 2009;15;231-240.
31. Siqueira AS, Carvalho MRD, Monteiro ACD, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJV. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology* 2010;57;128-137.
32. Wahlgren J, Vaananen A, Teronen O et al. Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2003;32;100-107.
33. Nadalin M. Estudo imunoistoquímico da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Ribeirão Preto: Universidade De Ribeirão Preto, 2008.
34. Moraes R. Correlação entre a área radiográfica e a imunolocalização da MMP-2 e MMP-9 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos uniloculares. Odontologia. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010;74.
35. Henriques ÁCG, Vasconcelos MG, Galvão HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Comparative analysis of the



immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2011;112;468-475.

36. de Andrade Santos PP, de Aquino ARL, Oliveira Barreto A, de Almeida Freitas R, Galvão HC, de Souza LB. Immunohistochemical expression of nuclear factor  $\kappa$ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2011;112;476-483.

37. Smith SM, Bartov SA. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. *J Oral Pathol* 1986;15;284-286.

38. Nonaka CF, Cavalcante RB, Nogueira RL, de Souza LB, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol* 2011.

39. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T et al. Immunohistochemical Localization of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin During Rat Molar Tooth Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2006;54;1371-1378.

40. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003;253;269-285.

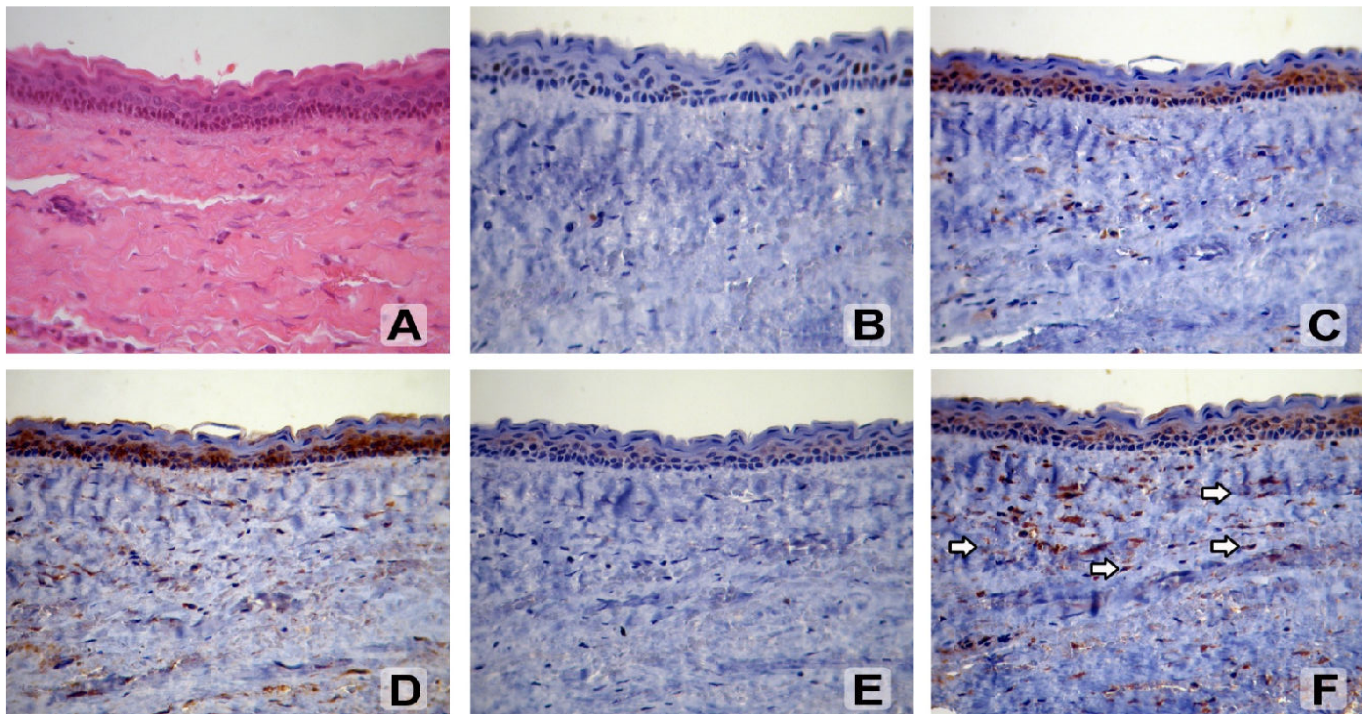
41. Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005;87;273-286.

42. Leonardi R, Matthews JB, Caltabiano R et al. MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumour associated with NBCCS and sporadic keratocysts. *Oral Diseases* 2010;16;795-800.

43. Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminars in Cancer Biology* 2001;11;143-153.

44. Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncology* 2011;47;840-846.

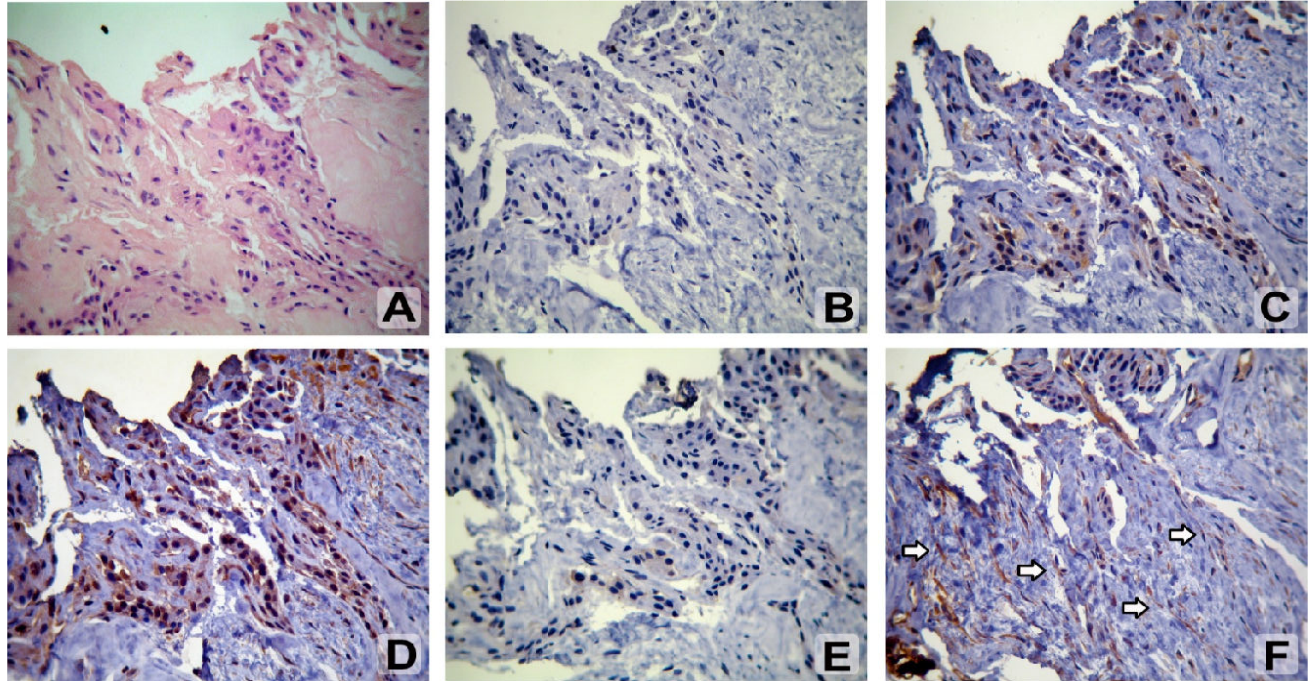




**Figura 1: Análise histopatológica e imuno-histoquímica do tumor odontogênico ceratocístico .**

Análise histopatológica (HE, 400X): A) Revestimento epitelial pavimentoso estratificado, fino e uniforme, com paracarina corrugada na superfície e camada basal em paliçada. Análise imuno-histoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase, 400X): B) Expressão nuclear de Ki-67 na camada suprabasal; C) Expressão citoplasmática de MMP-1; D) Expressão citoplasmática de MMP-2; E) Expressão citoplasmática de MMP-9; F) Expressão citoplasmática de  $\alpha$ -SMA evidenciando a presença de miofibroblastos no tecido conjuntivo.





**Figura 2: Análise histopatológica e imuno-histoquímica do folículo pericoronário.**

Análise histopatológica (HE, 400X): A) Cordões de epitélio odontogênico suportados por tecido conjuntivo fibroso denso e ausência de processo inflamatório. Análise imuno-histoquímica (streptavidina-biotina-peroxidase, 400X): B) Expressão nuclear de Ki-67 com raras células marcadas; C) Expressão citoplasmática de MMP-1, com fraca marcação no tecido conjuntivo; D) Expressão citoplasmática de MMP-2; E) Expressão citoplasmática de MMP-9, com fraca marcação no tecido conjuntivo; F) Expressão citoplasmática de  $\alpha$ -SMA, evidenciando a presença intensa de miofibroblastos no tecido conjuntivo.



**Tabela 1: Média e desvio-padrão dos 3 grupos**

	MMP-1		MMP-2		MMP-9		Ki-67	MFs
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
G1	58.74 ± 20.59	5.82 ± 3.57	63.17 ± 17.21	14.22 ± 7.35	31.94 ± 11.84	4.91 ± 4.10	25.27 ± 11.13	55.91 ± 16.05
G2	52.73 ± 20.76	7.43 ± 4.44	54.80 ± 15.18	13.38 ± 5.24	34.85 ± 14.78	6.04 ± 5.36	19.58 ± 6.35	60.67 ± 35.56
G3	47.67 ± 25.57	2.62 ± 1.94	46.15 ± 23.40	9.17 ± 5.79	27.49 ± 13.29	1.05 ± 0.85	8 ± 9.50	69.83 ± 13.73
P	0.5886	0.0338*	0.3886	0.2691	0.7405	0.0184*	0.0115*	0.2263

Teste de Kruskal-Wallis

Significância estatística: \*p < 0.05

Valores expressos como média ± desvio-padrão (%)





**Tabela 2: Média e desvio-padrão dos 2 grupos**

	MMP-1		MMP-2		MMP-9		Ki-67	MFs
	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
G1	58.74 ± 20.59	5.82 ± 3.57	63.17 ± 17.21	14.22 ± 7.35	31.94 ± 11.84	4.91 ± 4.10	25.27 ± 11.13	55.91 ± 16.05
G2	52.73 ± 20.76	7.43 ± 4.44	54.80 ± 15.18	13.38 ± 5.24	34.85 ± 14.78	6.04 ± 5.36	19.58 ± 6.35	60.67 ± 35.56
P	0.538	0.424	0.460	0.854	0.951	0.758	0.166	0.951

Teste de Mann-Whitney

Significância estatística: \* $p \leq 0.05$

Valores expressos como média ± desvio-padrão (%)



**Tabela 3: Correlação entre a marcação dos anticorpos**

		MMP-1		MMP-2		MMP-9		Ki-67	MF
		Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo	Epitélio	Conjuntivo
MMP-1	Epitélio	r = 1.0000	r = 0.4328 p = 0.0391*	r = 0.7391 p = 0.0001*	r = -0.0751 p = 0.7334	r = 0.2875 p = 0.1834	r = -0.1324 p = 0.5470	r = 0.5080 p = 0.0133*	r = 0.4947 p = 0.0164*
	Conjuntivo	r = 1.0000		r = 0.5257 p = 0.0100*	r = 0.3014 p = 0.1623	r = 0.5277 p = 0.0097*	r = 0.1038 p = 0.6376	r = 0.1984 p = 0.3642	r = 0.1384 p = 0.5289
MMP-2	Epitélio			r = 1.0000	r = 0.0237 p = 0.9145	r = 0.4713 p = 0.0232*	r = -0.1166 p = 0.5962	r = 0.2196 p = 0.3139	r = 0.0613 p = 0.7812
	Conjuntivo			r = 1.0000		r = 0.1265 p = 0.5652	r = 0.3281 p = 0.1264	r = -0.3943 p = 0.0627	r = -0.0667 p = 0.7623
MMP-9	Epitélio					r = 1.0000	r = 0.0385 p = 0.8614	r = 0.1647 p = 0.4526	r = 0.0652 p = 0.7674
	Conjuntivo					r = 1.0000		r = -0.3804 p = 0.0733	r = -0.0899 p = 0.6832
Ki-67	Epitélio							r = 1.0000	r = 0.3144 p = 0.1439
MF	Conjuntivo							r = 1.0000	

Teste de Correlação de Spearman

Valor de correlação; r

Significância estatística: \* $p \leq 0.05$



## REFERÊNCIAS

- ALA-AHO, R.; KAHARI, V. M. Collagenases in cancer. **Biochimie**, v. 87, n. 3-4, p. 273-86, Mar-Apr 2005. ISSN 0300-9084. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15781314](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15781314) >.
- AMALINEI, C. *et al.* Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495735> >.
- ANGADI, P. V.; KALE, A. D.; HALLIKERIMATH, S. Evaluation of myofibroblasts in oral submucous fibrosis: correlation with disease severity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 208-213, 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00995.x> >.
- ARISAWA, E. A. L. *et al.* Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 Breve Revisão. Pós - Graduação em Revista São José dos Campos, v. 1, p. 54-60, 1999. Disponível em: < <http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/article/view/37/17> >.
- AVELAR, R. L. *et al.* Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 5, p. 668-73, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1808-8694. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19082347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19082347) >.
- BAKAEEN, G. *et al.* Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature and a report of a case. **Int J Paediatr Dent**, v. 14, n. 4, p. 279-87, Jul 2004. ISSN 0960-7439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242385> >.
- BAKER, E. A. *et al.* The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 6, p. 482-6, Dec 2006. ISSN 0266-4356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338034> >.
- BANERJEE, A. G. *et al.* Aberrant Expression and Localization of Decorin in Human Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 63, n. 22, p. 7769-7776, November 15 2003. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/22/7769.abstract> >.
- BARNES, L. *et al.* **WHO Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.
- BARRETO, D. C. *et al.* Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 11, p. 757-760, 2002. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407090> >.

\_\_\_\_\_. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1418-1422, 2000. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890722> >.

BELL, R. B.; DIERKS, E. J. Treatment options for the recurrent odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 429-46, Aug 2003. ISSN 1042-3699. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088694](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088694) >.

BORGONOVO, A. E. *et al.* Two-stage treatment protocol of keratocystic odontogenic tumour in young patients with Gorlinâ€™s Goltz syndrome: Marsupialization and later enucleation with peripheral ostectomy. A 5-year-follow-up experience. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 12, p. 1565-1571, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165587611004435> >.

BROCA, P. **Traité des Tumeurs. Classification of odontogenic tumours. A histological review.** PHILIPSEN, H. P. , REICHART, P. A.: J Oral Pathol Med. 35: 525 - 9 p. 1869.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67 - it use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, 1990. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076881> >.

CARVALHO, M. R. D. D. **Padrão de imunorreatividade de fatores de crescimento, metaloproteínas da matriz e seus inibidores no ameloblastoma.** 2006. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Pará, Belém.

CAVALCANTE, R. B. *et al.* Immunohistochemical expression of MMPs 1, 7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 1, p. 99-105, Jul 2008. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585626> >.

CHAKRABORTI, S. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 269-285, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026028303196> >.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. S37-S43, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892401021225> >.

DAYAN, D.; BUCHNER, A.; DAVID, R. Myofibroblasts in peripheral giant cell granuloma. Light and electron microscopic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 18, n. 5, p. 258-261, 1989. ISSN 0901-5027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509574> >.

DAYAN, D.; NASRALLAH, V.; VERED, M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. nodular fasciitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n. 7, p. 426-435, 2005. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011613> >.

DE ANDRADE SANTOS, P. P. *et al.* Immunohistochemical expression of nuclear factor kB, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 4, p. 476-483, 2011. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210411002745> >.

DE OLIVEIRA, M. *et al.* Odontogenic Epithelium: Immunolabeling of Ki-67, EGFR and Survivin in Pericoronal Follicles, Dentigerous Cysts and Keratocystic Odontogenic Tumors. **Head and Neck Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-7, Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-010-0216-0> >.

DE VICENTE, J. C. *et al.* Immunohistochemical comparative study of the odontogenic keratocysts and other odontogenic lesions. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 5, p. e709-15, 2010. ISSN 1698-6946. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20383104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20383104) >.

DESMOULIERE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, C. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 509-517, 2004. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349825> >.

EL MURTADI, A. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 81, n. 2, p. 217-20, Feb 1996. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665318> >.

FLETCHER, C. D. M. **Myofibroblastic tumors: an update.** 1998. 75 - 82

FREGNANI, E. R. *et al.* Presence of Myofibroblasts and Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in Ameloblastomas Correlate with Rupture of the Osseous Cortical. **Pathology & Oncology Research**, v. 15, n. 2, p. 231-240, 2009. ISSN 1219-4956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096916> >.

GAITÁN-CEPEDA, L. A. *et al.* Reclassification of odontogenic keratocyst as tumour. Impact on the odontogenic tumours prevalence. **Oral Dis**, v. 16, n. 2, p. 185-7, Mar ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747351> >.

GHALI, G. E.; CONNOR, M. S. Surgical management of the odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 383-92, Aug 2003. ISSN 1042-3699. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088690) >.

GOMES, C. C.; DINIZ, M. G.; GOMEZ, R. S. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. **Oral Oncology**, v. 45, n. 12, p. 1011-1014, 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796981> >.

GORLIN, R. J.; GOLTZ, R. W. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. **N Engl J Med**, v. 262, p. 908-12, May 1960. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13851319> >.

GORLIN, R. J. *et al.* Nevoid Basal Cell Carcinoma (Gorlin) Syndrome Neurocutaneous Disorders Phakomatoses and Hamartoneoplastic Syndromes. In: (Ed.): Springer Vienna, 2008. p.669-694.

GURGEL, C. A. *et al.* Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. **J Mol Histol**, v. 39, n. 3, p. 311-6, Jun 2008. ISSN 1567-2379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256893> >.

HALL, R. C.; EMBERY, G. The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 4, p. 478-486, 1997. ISSN 08959374. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=36578935&site=ehost-live> >.

HENRIQUES, Á. C. G. *et al.* Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 4, p. 468-475, 2011. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210411003623> >.

HILLMANN, G.; GEURTSSEN, W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. **Cell and Tissue Research**, v. 289, n. 1, p. 145-154, 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s004410050860> >.

HINZ, B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 146-155, 2010. ISSN 0021-9290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800625> >.

HOSOYA, A. *et al.* Immunohistochemical Localization of alfa-Smooth Muscle Actin During Rat Molar Tooth Development. **Journal of Histochemistry &**



**Cytochemistry**, v. 54, n. 12, p. 1371-1378, December 1 2006. Disponível em: < <http://jhc.sagepub.com/content/54/12/1371.abstract> >.

JONES, A. V.; FRANKLIN, C. D. An analysis of oral and maxillofacial pathology found in adults over a 30-year period. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 7, p. 392-401, Aug 2006. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16827841> >.

JORDAN, R. C. K. Histology and ultrastructural features of the odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am**, v. 15, n. 3, p. 325-333, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088686> >.

KELLERMANN, M. G. *et al.* Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, p. 849-853, 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042073> >.

KICHI, E. *et al.* Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 5, p. 280-6, May 2005. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817071> >.

KIMI, K. *et al.* Analysis of apoptosis-related factors and apoptotic cells in lining epithelium of odontogenic keratocystic. **Oral Med Pathol**, v. 5, p. 35-40, 2000. Disponível em: < [http://www.jstage.jst.go.jp/article/omp/5/1/5\\_35/article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/omp/5/1/5_35/article) >.

KOENIG *et al.* **Diagnostic Imaging: Oral and maxillofacial** 1º ed Canada: 2012. ISBN 978-1-931884-20-4.

KOLÁR, Z. *et al.* Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 2, p. 75-80, Feb 2006. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430736> >.

KOLOKYTHAS, A. *et al.* Odontogenic Keratocyst: To Decompress or Not to Decompress? A Comparative Study of Decompression and Enucleation Versus Resection/Peripheral Osteotomy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 4, p. 640-644, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239106014431> >.

KUBOTA, Y. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  Enhances Type I Collagen-induced Activation of Matrix Metalloproteinase-2 in Odontogenic Keratocyst Fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 1, p. 23-27, January 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://jdr.sagepub.com/content/81/1/23.abstract> >.

KUMAMOTO, H. *et al.* Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 2, p. 114-120,

2003. ISSN 0904-2512. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542835>>.

LADEINDE, A. L. *et al.* Odontogenic tumors: a review of 319 cases in a Nigerian teaching hospital. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 2, p. 191-5, Feb 2005. ISSN 1079-2104. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660091>>.

LANGLAIS, R. P.; LANGLAND, O. E.; NORTJÉ, C. J. **Diagnostic imaging of the jaws**. 1st. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. 661 ISBN 068304809-0.

LEDESMA-MONTES, C. *et al.* Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. **Oral Dis**, v. 13, n. 3, p. 303-7, May 2007. ISSN 1354-523X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448213>>.

LEONARDI, R. *et al.* MMP-13 expression in keratocyst odontogenic tumour associated with NBCCS and sporadic keratocysts. **Oral Diseases**, v. 16, n. 8, p. 795-800, 2010. ISSN 1601-0825. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01690.x>>.

LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 5, p. 221-6, May 1995. ISSN 0904-2512. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7542341](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7542341)>.

LIN, S. K. *et al.* Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. **J Oral Pathol Med**, v. 26, n. 10, p. 458-63, Nov 1997. ISSN 0904-2512. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9416577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9416577)>.

LO MUZIO, L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). **Orphanet J Rare Dis**, v. 3, p. 32, 2008. ISSN 1750-1172. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19032739>>.

LO MUZIO, L. *et al.* 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**, v. 78, n. 7, p. 1345-53, Jul 1999. ISSN 0022-0345. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403462>>.

LOMBARDI, T.; MORGAN, P. R. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 4, p. 170-6, Apr 1995. ISSN 0904-2512. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783006>>.

MACDONALD-JANKOWSKI, D. S. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 40, n. 1, p. 1-23, January 1, 2011. Disponível em: < <http://dmfr.birjournals.org/content/40/1/1.abstract> >.

MADRAS, J.; LAPOINTE, H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **J Can Dent Assoc**, v. 74, n. 2, p. 165-165h, Mar 2008. ISSN 1488-2159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353202> >.

MENDES, R. A.; CARVALHO, J. F.; VAN DER WAAL, I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - an overview. **Oral Oncol**, v. 46, n. 1, p. 19-24, Jan 2010. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004133> >.

\_\_\_\_\_. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 111, n. 3, p. 333-9, Mar 2011. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215666> >.

MORAES, R. **Correlação entre a área radiográfica e a imunolocalização da MMP-2 e MMP-9 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos ceratocísticos uniloculares**. 2010. 74 Dissertação (Dissertação de mestrado). Odontologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MORRISON, C. J. *et al.* Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 645-653, 2009. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506740900132X> >.

NADALIN, M. **Estudo imunoistoquímico da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos**. 2008. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade De Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 2006. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877> >.

NONAKA, C. F. *et al.* Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. **Arch Oral Biol**, Aug 2011. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871606> >.

O'GRADY, A. *et al.* Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 793-804, Dec 2007. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042068> >.

OCHSENIUS, G. *et al.* Odontogenic tumors in Chile: a study of 362 cases. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 7, p. 415-20, Aug 2002. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165060> >.

ODUKOYA, O. Odontogenic tumors: analysis of 289 Nigerian cases. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 10, p. 454-7, Nov 1995. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600281> >.

PAN, S.; LI, T.-J. PTCH mutations in odontogenic keratocysts: are they related to epithelial cell proliferation? **Oral Oncology**, v. 45, p. 861-5, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362041> >.

PAULA, A. M. B. *et al.* Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 10, p. 477-482, 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0714.2000.291001.x> >.

PHILIPSEN, H. P. Keratocystic odontogenic tumour. In: BARNES, L., *et al* (Ed.). **World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon, 2005. p.296-300.

PINDBORG, J. J.; KRAMER, I. R. H.; TORLONI, H. **Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions**. Geneva; [London]: World Health Organization, 1971. ISBN 0119503948 9780119503944.

PINHEIRO, J. J. V. *et al.* Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. **Histopathology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, 2004. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228445> >.

POGREL, M. A. Decompression and marsupialization as a treatment for the odontogenic keratocyst. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 15, n. 3, p. 415-427, 2003a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1042369903000384> >.

\_\_\_\_\_. The history of the odontogenic keratocyst. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 311-5, Aug 2003b. ISSN 1042-3699. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088684](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088684) >.

\_\_\_\_\_. Treatment of Keratocysts: The Case for Decompression and Marsupialization. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1667-1673, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239105013558> >.

POGREL, M. A.; JORDAN, R. C. K. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 6, p. 651-655, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239104001260> >.

REICHART, P.; PHILLIPSEN, H. **Odontogenic tumors and allied lesions**. Londres: 2004.

RENSBURG, L. J. V.; PAQUETTE, M.; NORTJÉ, C. J. Correlative MRI and CT imaging of the odontogenic keratocyst: a review of twenty-one cases. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am**, p. 363-382, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088689> >.

RIBEIRO, B. F. *et al.* Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 7, 9, and 26 in the calcifying cystic odontogenic tumor. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 5, p. 609-615, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210411003878> >.

\_\_\_\_\_. Immunoexpression of MMPs-1,-2, and-9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. **Oral Diseases**, v. 15, n. 7, p. 472-477, 2009. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522745> >.

RIBEIRO JUNIOR, O. *et al.* Keratocystic odontogenic tumors and Carnoy's solution: results and complications assessment. **Oral Diseases**, p. no-no, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01907.x> >.

RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C. J.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 39-54, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488909002407> >.

SANTOS, J. N. *et al.* Odontogenic tumors: analysis of 127 cases. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 308-13, 2001 Oct-Dec 2001. ISSN 1517-7491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11787319> >.

SCHMIDT, B. L.; POGREL, M. A. The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and**

**Maxillofacial Surgeons**, v. 59, n. 7, p. 720-725, 2001. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239101897433?showall=true> >.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T. A.; LAGACE, R. Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas - A combined immunological, light and electron microscopic study. **Virchows Archiv a-Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 391, n. 2, p. 125-139, 1981. ISSN 0174-7398. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7013254> >.

SEDENTEXCT. **Radiation Protection: Cone Beam CT for Dental and Maxillofacial Radiology. Evidence based guidelines (v. 2.0)**. European Academy of Dentomaxillofacial Radiology / SEDENTEXCT Project Manchester, UK, p.139. 2011

SEEMAYER, T. A.; SCHÜRCH, W.; LAGACÉ, R. The myofibroblast and defense against neoplasia: a hypothesis. **Surv Immunol Res**, v. 1, n. 3, p. 268-73, 1982. ISSN 0252-9564. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6314469](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6314469) >.

SHARIF FYEZA, N. J. *et al.* Intervention for the treatment of keratocystic odontogenic tumours (KCOT, odontogenic keratocysts (OKC)) **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. CD008464, n. 9, 2010.

SHEAR, M. Odontogenic keratocysts: clinical features. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 335-45, Aug 2003a. ISSN 1042-3699. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088687](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088687) >.

\_\_\_\_\_. Odontogenic keratocysts: natural history and immunohistochemistry. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 347-62, Aug 2003b. ISSN 1042-3699. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088688) >.

SIQUEIRA, A. S. *et al.* Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. **Histopathology**, v. 57, n. 1, p. 128-137, Jul 2010. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653784> >.

SMITH, S. M.; BARTOV, S. A. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. **J Oral Pathol**, v. 15, n. 5, p. 284-6, May 1986. ISSN 0300-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3091797> >.

SOBRAL, L. M. *et al.* Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. **Oral Oncology**, v. 47, n. 9, p. 840-846,

2011. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837511002053>>.
- SOLUK TEKKESIN, M.; MUTLU, S.; OLGAAC, V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in odontogenic keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in comparison with ameloblastomas and radicular cysts. **Turk Patoloji Derg**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2012. ISSN 1018-5615. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22207432>>.
- SORSA, T.; TJADERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 6, p. 311-318, 2004. ISSN 1601-0825. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01038.x>>.
- SOUSA, F. B. *et al.* Pediatric oral lesions: a 15-year review from São Paulo, Brazil. **J Clin Pediatr Dent**, v. 26, n. 4, p. 413-8, 2002. ISSN 1053-4628. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175139>>.
- STETLER-STEVENSON, W. G.; YU, A. E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 2, p. 143-153, 2001. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X00903651>>.
- STOELINGA, P. J. Etiology and pathogenesis of keratocysts. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 15, n. 3, p. 317-24, Aug 2003. ISSN 1042-3699. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18088685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088685)>.
- SWARNAKAR, S. *et al.* Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 1, p. 8-20, 2011. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00812.x>>.
- TAYLOR, A. M. New findings and controversies in odontogenic tumors. **Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal**, v. 13, n. 9, p. E555-E558, 2008. ISSN 1698-4447. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259667500005 >.
- TENERON, O. *et al.* Identification and characterization of gelatinases/type IV collagenases in jaw cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 24, p. 78-84, 1995. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7745546>>.
- THODE, C. *et al.* Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 201-207, 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00999.x>>.
- THOSAPORN, W. *et al.* A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous

cyst, and ameloblastoma. **Oral Diseases**, v. 10, n. 1, p. 22-26, 2004. ISSN 1354-523X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996290> >.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 5, p. 349-63, May 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11988769](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11988769) >.

TONIETTO, L. *et al.* Enucleation and Liquid Nitrogen Cryotherapy in the Treatment of Keratocystic Odontogenic Tumors: A Case Series. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 6, p. e112-e117, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239111000097> >.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7212-7220, October 1 2005. Disponível em: < <http://jco.ascopubs.org/content/23/28/7212.abstract> >.

VERED, M. *et al.* Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. **Oral Oncology**, v. 41, n. 10, p. 1028-1033, 2005. ISSN 0964-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139563> >.

VISIOLI, F. *et al.* Is nevoid basal cell carcinoma syndrome really so rare? Proposal for an investigative protocol based on a case series. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 4, p. 903-8, Apr 2010. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307772> >.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128> >.

WAHLGREN, J. *et al.* Laminin-5 gamma 2 chain is colocalized with gelatinase-A (MMP-2) and collagenase-3 (MMP-13) in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 2, p. 100-7, Feb 2003. ISSN 0904-2512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542833> >.

WEATHERS, D. R.; CAMPBELL, W. G. Ultrastructure of the giant-cell fibroma of the oral mucosa. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 38, n. 4, p. 550-561, 1974. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0030422074900863> >.

WESTERMARCK, J.; KAHARI, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB J**, v. 13, n. 8, p. 781-92, May 1999. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224222> >.



WHITE, S. C.; PHAROAH, M. J. **Oral radiology: principles and interpretation**. Mosby, 2004. ISBN 9780323020015. Disponível em: <  
<http://books.google.com.br/books?id=asVpAAAAMAAJ>>.

YAMAMOTO, T. *et al.* Nevoid basal cell carcinoma syndrome: Clinical features and implications of development of basal cell carcinoma in skin and keratocystic odontogenic tumor in jaw and their gene expressions. **Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 23, n. 3, p. 105-112, 2011. ISSN 0915-6992. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0915699211000057>>.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev**, v. 14, n. 2, p. 163-76, Jan 2000. ISSN 0890-9369. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652271>>.

ZECHA, J. A. E. M. *et al.* Recurrence rate of keratocystic odontogenic tumor after conservative surgical treatment without adjunctive therapies - A 35-year single institution experience. **Oral Oncology**, v. 46, n. 10, p. 740-742, 2010. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837510002186>>.

ZHANG, B. *et al.* Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. **Bmc Cancer**, v. 9, 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272773100001 >.

ZHOU, H. *et al.* Secondary Healing After Removal of Large Keratocystic Odontogenic Tumor in the Mandible: Enucleation Followed by Open Packing of Iodoform Gauze. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 0, 2012. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239111018921>>.

ZITKA, O. *et al.* Matrix metalloproteinases. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 31, p. 3751-68, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846107>>.



# *Apêndices*



## APÊNDICE A - Metodologia Expandida

### Aspectos legais e éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH), sob o número 1055/10 (Anexo A), bem como pelo Hospital Universitário e pelo Departamento de Patologia da UFSC.

### Seleção da amostra

As amostras estudadas foram selecionadas nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC) e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC (SAP-HU-UFSC), através dos diagnósticos de TOC realizados nesses serviços. Foram selecionadas as lâminas coradas em HE e os blocos de parafina contendo fragmentos de tecido obtido através de biópsia incisional ou excisional. Para a realização da técnica imuno-histoquímica, foram selecionados 23 casos onde era possível observar a presença do revestimento epitelial e da cápsula de tecido conjuntivo. Foram excluídos da amostra os casos que possuíam abundante presença de infiltrado inflamatório. Foram selecionados 6 folículos pericoronários de terceiros molares completamente inclusos, comprovados radiograficamente, e livres de processo inflamatório, para controle da expressão imuno-histoquímica nos tecidos odontogênicos normais. Os casos de TOCs foram divididos em dois grupos, o grupo 1 composto por 11 casos de TOC isolados (G1) e o grupo 2 por 12 casos de TOC associados à SCNCB (G2). O grupo controle (G3) foi composto por 6 folículos pericoronários.

### Análise microscópica

As lâminas coradas em HE foram analisadas em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico prévio de TOC. Para essa avaliação foram confeccionadas novas lâminas dos casos selecionados e elas foram coradas em HE.

## Procedimentos laboratoriais

As amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método streptavidina-biotina-peroxidase. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos, sendo estes: placenta (MMP1), carcinoma de mama (MMP 2), medula (MMP 9), hiperplasia fibrosa inflamatória e vasos sanguíneos como controle interno (miofibroblastos -  $\alpha$ -SMA) e carcinoma epidermóide (Ki-67). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

A desparafinização dos cortes foi realizada mantendo as lâminas em estufa a 60°C durante 2 minutos. Posteriormente as lâminas foram submetidas a dez banhos em xilol (primeiro) aquecido (60°C) e deixadas imersas durante 5 minutos em xilol aquecido (segundo). Após realizar 10 banhos em 3 frascos de xilol em temperatura ambiente (TA) mais 10 banhos em álcool etílico absoluto e 5 minutos no último álcool, as lâminas foram submetidas a dois banhos de 5 minutos cada em água destilada. Para realizar o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas na solução de peróxido de hidrogênio (100 ml de PBS + 100ml de álcool metílico + 2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 20 minutos, e posteriormente submetidas à solução de peróxido de hidrogênio (360ml de álcool metílico + 40 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 minutos. A reativação antigênica foi realizada mantendo-se as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0 pré aquecido em banho-maria e mantidos durante 40 minutos em temperatura constante de 95 – 98°C. Posteriormente, os anticorpos primários (Quadro 1) foram incubados em câmara úmida, durante 18 horas em TA. As lâminas foram submetidas à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG biotinado (Dako, Dinamarca), durante 30 minutos, e posteriormente incubadas com streptavidina-biotina-peroxidase durante 30 minutos. As lâminas foram submetidas a coloração com a solução cromógena DAB (Biocare, CA, EUA), com exposição dos cortes por no máximo 5 minutos. Posteriormente foram submetidas a contracoloração com Hematoxilina de Harris e montagem com Entellan (Merck, Alemanha). Entre as etapas, as lâminas foram lavadas em solução de Tampão Fosfato Salina (PBS), durante 5 minutos.

## Análise imuno-histoquímica

A análise das reações imuno-histoquímicas foi realizada utilizando o software NIH ImageJ 1.45q (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica

(Cannon, A620) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400X.

Para cada anticorpo, em cada caso, foi avaliada a frequência e local de marcação, bem como a análise quantitativa da expressão.

A imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo nas células epiteliais, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais (positivas e negativas) em até 10 campos consecutivos, sendo posteriormente realizada a média de células positivas para cada caso, multiplicando-se o total de células positivas por 100 e dividindo-se esse valor pelo total de células epiteliais.

A avaliação para MMP-1, -2 e -9, caracterizada pela coloração castanha no citoplasma, foi obtida individualmente no estroma e no epitélio, através da média da porcentagem da área marcada (pixels positivos) em relação à área total do epitélio ou estroma em cada campo (pixels totais), em 10 campos consecutivos para cada caso, quando avaliamos o revestimento epitelial removemos da imagem a porção referente ao tecido conjuntivo e quando avaliamos o tecido conjuntivo removemos da imagem a porção referente ao tecido epitelial. No estroma também foram excluídas as células inflamatórias e endoteliais. Essas exclusões foram realizadas com auxílio da programa ImageJ, onde era possível selecionar essas porções e remove-las das imagens. Para verificar a presença de MFs foi observada a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) nos fibroblastos presentes na cápsula de tecido conjuntivo fibroso, logo abaixo do revestimento epitelial. A avaliação do antígeno  $\alpha$ -SMA foi realizada através da contagem do total de células positivas para cada campo, no total de 10 campos consecutivos para cada caso, sendo posteriormente realizada a média de células positivas para cada caso, somando-se o total de células positivas em todos os campos e dividindo-se pelo total de campos. Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação castanha no citoplasma, excluindo-se as células inflamatórias, células endoteliais e células nas proximidades dos vasos sanguíneos, pois essas células podem interferir nos resultados devido a expressão de  $\alpha$ -SMA.

O resultado de cada caso para cada anticorpo foi armazenado em fichas previamente elaboradas e arquivadas em uma planilha do software Microsoft Excell<sup>®</sup> (Microsoft Office Corporation).

## Análise estatística

Para realizar a comparação entre os três grupos, a partir dos resultados da análise quantitativa, para cada anticorpo estudado, foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, teste não paramétrico para comparar 3 ou mais amostras independentes.

Para a comparar os casos de TOCs associados ou não à SCNCB, foi aplicado o teste estatístico de Mann Whitney, teste não paramétrico para comparar 2 amostras independentes.

Também foi avaliada a correlação entre a marcação das proteínas em estudo por meio da correlação de Spearman, a partir das médias obtidas.

Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas/ área corada  $\pm$  os desvios-padrão da média (DPM). Considerou-se valor de  $P \leq 0,05$  para dados com significância estatística.





**Tabela 4: Valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado**

G	MMP-1				MMP-2				MMP-9				Ki-67		MF	
	Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	56.66	5.53	3.22	1.06	60.58	3.08	19.07	4.34	33.96	2.59	7.59	3.6	19	2	54	14.5
1	67.85	2.24	2.33	1.07	67.21	3.53	9.45	2.63	33.45	3.00	3.14	0.7	28	5	45	14.3
1	84.59	3.39	7.23	1.61	99.83	3.10	5.19	1.89	14.93	3.98	1.46	0.3	32	8	61	12.3
1	84.93	6.30	4.92	1.11	65.45	2.91	12.57	1.25	34.33	2.88	4.38	2.1	46	4	77	17.0
1	33.43	7.81	2.69	1.00	44.29	3.44	11.82	3.07	22.17	1.98	1.43	0.8	33	4	54	11.1
1	85.26	1.26	5.50	2.20	78.93	2.80	14.45	2.51	51.63	4.41	1.00	0.8	20	2	105	17.3
1	48.00	5.18	9.79	4.65	59.82	3.88	15.44	4.19	40.41	4.24	7.80	5.0	27	12	39	18.6
1	27.26	2.85	1.90	0.65	50.74	4.28	25.94	4.76	11.03	1.73	10.94	2.7	5	2	43	21.3
1	56.89	6.30	13.17	3.41	61.41	5.72	26.59	5.91	31.01	3.63	12.16	4.2	18	6	62	18.6
1	60.88	3.42	8.76	4.48	70.89	4.13	12.06	4.50	39.55	3.38	3.64	1.2	16	4	40	24.1
1	40.36	5.08	4.47	3.55	35.67	4.66	3.84	1.63	38.91	3.30	0.49	0.2	34	7	62	19.2
?	69.18	4.11	14.96	6.40	66.14	5.93	19.84	4.48	28.03	6.34	3.27	1.4	24	7	66	18.3
2	80.67	5.39	9.56	3.42	66.79	3.92	11.10	2.10	43.85	4.54	16.34	3.3	28	2	94	44.2
2	67.72	2.60	14.46	3.49	69.14	3.26	13.30	6.13	42.49	2.81	1.13	0.5	25	6	119	38.3
2	66.57	7.03	5.96	2.63	67.59	4.03	8.48	2.35	32.83	1.65	0.80	0.4	26	4	25	7.92
2	51.65	6.04	11.31	3.89	61.09	5.37	19.80	3.33	48.66	3.90	1.33	0.3	24	3	50	19
2	42.45	7.53	8.32	3.42	67.31	8.49	17.82	4.56	66.88	9.87	14.56	3.8	12	5	37	8.52
2	67.60	7.82	6.53	5.69	41.48	5.51	16.83	5.39	30.35	3.77	16.47	2.6	21	3	54	18.8
2	55.65	8.59	5.41	1.78	64.04	5.74	11.76	2.77	38.04	2.73	0.61	4.6	16	5	55	16.1
2	62.46	4.25	4.24	1.90	53.77	8.82	8.88	2.68	24.62	2.46	3.81	1.0	21	4	61	18.5
2	25.88	6.29	5.17	1.27	31.51	4.04	6.51	1.56	30.58	3.30	8.76	2.8	18	3	35	14.1

APÊNDICE B – Tabela com os valores da média e desvio-padrão para cada caso estudado.

G	MMP-1				MMP-2				MMP-9				Ki-67		MF	
	Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo		Epitélio		Conjuntivo	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
2	12.38	1.40	1.87	1.00	36.73	3.74	19.77	4.14	23.94	2.36	2.68	1.00	9	5	40	10.53
2	30.52	3.01	1.37	1.74	29.03	2.30	6.48	1.71	7.97	3.01	2.72	1.15	11	2	61	24.53
3	35.44	3.10	1.09	0.46	30.92	3.76	4.82	1.22	20.16	1.58	0.37	0.21	4	2	57	20.42
3	22.58	0.16	1.88	0.87	26.87	0.33	7.38	1.69	12.90	0.38	0.70	0.46	2	3	71	12.14
3	21.72	0.30	1.76	0.38	22.85	0.47	7.53	2.37	15.46	0.31	0.56	0.20	3	5	81	20.43
3	71.48	5.42	1.82	0.39	70.42	5.38	13.75	3.29	31.19	1.74	0.50	0.24	27	18	66	19.22
3	82.75	3.41	6.43	2.81	77.75	3.35	18.42	4.92	41.61	4.50	1.65	0.37	6	3	82	34.92
3	52.04	0.67	2.75	1.51	48.06	0.65	3.14	0.85	43.59	0.97	2.50	0.72	5	3	74	11.29

Grupo: G1 –TOCs isolados; G2 – TOCs associados à síndrome do carcinoma nevíde de células basais;  
G3 –Folículos pericoronários (controle).  
Desvio-padrão: DP



*Anexos*



## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 Pós-Graduação de Pós-graduação e Extensão  
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



**CERTIFICADO** Nº 1055

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 9284/GP/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o pedido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos, no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

**APROVADO**

**PROCESSO:** 1055 **FR:** 371735

**TÍTULO:** Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo

**AUTOR:** Eliana Riet Correa Ribeiro, Grazieli de Oliveira Ramos

FLORIANÓPOLIS, 25 de Outubro de 2010.

Coordenador do CEPSH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza  
 Coordenador do CEPSH/UFSC