



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO

**RENATA ZORAIDA RIZENTAL DELGADO**

AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
TUMORES ODONTOGÊNICOS QUERATOCÍSTICOS ASSOCIADOS À  
SÍNDROME DE GORLIN (SÍNDROME DO CARCINOMA NEVÓIDE  
BASOCELULAR) - ESTUDO COLABORATIVO INTERNACIONAL

CASCAVEL – PR

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO

**RENATA ZORAIDA RIZENTAL DELGADO**

AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
TUMORES ODONTOGÊNICOS QUERATOCÍSTICOS ASSOCIADOS À  
SÍNDROME DE GORLIN (SÍNDROME DO CARCINOMA NEVÓIDE  
BASOCELULAR) - ESTUDO COLABORATIVO INTERNACIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel  
Co-orientador: Prof. Dr. Mário José Romãnach Gonzalez Sobrinho

CASCADEL – PR

2015

**1 Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

D392a Delgado, Renata Zoraida Rizental  
Avaliação clinicopatológica e imuno-histoquímica de tumores odontogênicos queratocísticos associados à Síndrome de Gorlin (Síndrome do carcinoma nevíde basocelular) – Estudo colaborativo internacional. / Renata Zoraida Rizental Delgado. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2015.  
74 p.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel  
Coorientador: Prof. Dr. Mário José Romañach Gonzalez Sobrinho  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia

1.Odontologia. 2. Síndrome do nevo basocelular. 3. Tumor odontogênico queratocístico. 4. Imuno-histoquímica. 5. Cistos ósseos. 6. Maxila. 7. Mandíbula. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 617.63

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9ª/965

Aos meus queridos pais, cuja  
visão extraordinária e amor  
inesgotável tornaram possíveis todas  
as coisas.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido a graça da vida e me fortalecido nos momentos difíceis e duvidosos.

Agradeço em especial aos meus queridos pais René José Delgado Reyes e Simone Mirian Rizental e ao meu “pai do coração” Aloísio da Silva, que se doaram inteiros e muitas vezes renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que seguirei em frente.

A minha família, fonte de amor inesgotável que sempre esteve presente me amparando incondicionalmente através dos seus bons ensinamentos e princípios verdadeiros, o eterno agradecimento.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, na pessoa do Magnífico Reitor, Paulo Sérgio Wolf e ao curso de Odontologia, por meio do Diretor Prof. Dr. Eduardo Tanaka de Castro.

Ao Prof Dr Márcio José Mendonça, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNIOESTE.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel, pela oportunidade desta pós-graduação, paciência, além da grande contribuição dentro de sua área, para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Mário José Romañach Gonzalez Sobrinho, por partilhar dos seus conhecimentos para o enriquecimento deste trabalho, além da doação de parte da amostra deste estudo.

Aos professores membros da banca examinadora pela leitura criteriosa e valiosas sugestões e aos demais professores do programa, não menos importantes, cuja orientação foi de grande importância para a conclusão do mestrado.

Ao Prof Dr. Oslei Paes de Almeida, do Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela doação de parte das amostras, dos anticorpos e pelo pronto atendimento e ajuda sempre que solicitado.

Ao Dr. Román Carlos Bregni, do Centro Clínico de Cabeça e Pescoço – Guatemala, pela doação das amostras associadas à Síndrome de Gorlin, bem como por sua disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento deste estudo.

À aluna de doutorado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Alicia Rumayor, pela importante ajuda através da realização da técnica imuno-histoquímica das amostras, bem como no levantamento dos casos cedidos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Tereza Bittencourt Guimarães, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas do presente estudo.

À *CAPES*, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

Aos amigos que conquistei nestes dois anos, membros da especial primeira turma de mestrado em Odontologia da Unioeste, que fizeram com que esta caminhada fosse a mais agradável possível.

A “mãe emprestada” Marlene Oliveira Baú e a mais nova amiga Jéssica Luana dos Santos, que além de ajudarem muito com a minha pesquisa me encorajaram frente a cada obstáculo que surgia.

As amigas fiéis, especiais e essenciais: Danielle Portinho Coutinho, Lais Kuhn, Juliana Martinelli Araújo, Heloisa Cristina Hendges Fernanda Sabah Gomes Soares, Fabiana Pinto, Liana Ficagna, Angela Souza, Fabiane Muira Ogg de Sales e Ana Eliza Abrão David, que foram sempre meus anjos da guarda mesmo quando distantes, minimizaram minhas tristezas, compartilharam muitos momentos de alegria e que com certeza serão sempre fundamentais em minha vida.

## RESUMO

**Introdução:** A Síndrome de Gorlin (SG) também conhecida como Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular, é uma doença rara resultante de mutações no gene *Patched-1* e caracterizada por uma tríade de alterações que inclui múltiplos carcinomas basocelulares, numerosos tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs) e anormalidades esqueléticas. Cerca de 90% dos portadores desenvolvem TOQs no interior dos ossos gnáticos, preferencialmente na região posterior da mandíbula, apresentando-se radiograficamente como lesões radiolúcidas uni ou multiloculares. Estudos têm sugerido que os TOQs associados à SG (TOQSG) apresentam comportamento distinto e mais agressivo em comparação àqueles que desenvolvem-se de modo esporádico (TOQEs). **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo analisar comparativamente os aspectos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de TOQEs e TOQSGs oriundos de diferentes instituições do Brasil e do exterior, além de entender o papel de proteínas associadas com proliferação/ciclo celular (p53, p63 e Ki-67), da actina de músculo liso-alfa ( $\alpha$ -SMA) e da proteína sindecano-1 (CD138), na tentativa de associar a expressão das mesmas com o comportamento biológico dos TOQs. **Metodologia:** Foram previamente revisados e selecionados 30 TOQSGs e 8 TOQEs, nos quais foram realizadas análises qualitativas e semi-quantitativas histopatológicas e imuno-histoquímicas para p53, p63, Ki-67, AML e CD138. **Resultados:** Trinta casos de TOQSGs foram obtidos de 12 pacientes com SG, 5 do gênero feminino (41,66%) e 7 do gênero masculino (58,33%); ao passo que no grupo dos TOQEs, 5 casos (62,50%) acometeram o gênero feminino e 3 o masculino (37,50%). Cerca de 58,33% dos pacientes com SG apresentaram mais de uma lesão ao longo da vida. A média de idade dos indivíduos com SG foi de 16,81 anos  $\pm$  14,66 enquanto dos portadores de TOEs foi de 41 anos  $\pm$  39,59. O padrão radiográfico predominante foi o radiolúcido unilocular, afetando preferencialmente a região posterior de mandíbula. Foram avaliadas as características histopatológicas de ambos os grupos de lesões, sendo o pleomorfismo celular mais frequente nos TOQSGs. Além disso, observou-se maior expressão de p53 e p63 nos TOQSG e expressão similar de AML e Ki-67 entre os grupos. Observou-se ainda que houve menor reatividade para CD138 no estrato epitelial basal dos TOQSGs e a expressão estromal de CD138 foi similar entre os grupos analisados. **Conclusões:** A maior agressividade dos TOQSGs pode ser explicada pela maior taxa de pleomorfismo celular, maior expressão de p53 e p63 e tendência à perda de expressão de sindecano-1 quando comparados aos TOQEs.

**PALAVRAS CHAVES:** Síndrome do Nevo Basocelular; Tumor odontogênico queratocístico; Imuno-histoquímica; Cistos ósseos; Maxila; Mandíbula.

## ABSTRACT

**Introduction:** Gorlin syndrome (GS) also known as Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome, is a rare disease resulting from mutations in *Patched-1* gene and characterized by triad of disorders comprising multiple basal cell carcinomas, numerous keratocystic odontogenic tumors (KOT) and skeletal abnormalities. About 90% of patients develop KOTs in gnathic bones, preferably in the posterior mandible, presenting radiographically as radiolucent lesions uni- or multilocular. Studies suggests that KOTs associated with GS (KOTGSs) have distinct and more aggressive behavior compared to those who developing sporadically (KOTSPs). **Objectives:** This study aimed at comparing clinical, histopathological and immunohistochemical features of KOTSPs and KOTGSs from different institutions in Brazil and abroad, and understand the role of proteins associated with proliferation/cell cycle (p53, p63 and Ki-67), the alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and syndecan-1 (CD138) in an attempt to associate the expression with biological behavior of KOTs. **Methodology:** Were previously reviewed and selected 30 KOTGSs and 8 KOTSPs, in which were performed qualitative and semi-quantitative analysis histopathological and immunohistochemical to p53, p63, Ki-67, SMA and CD138. **Results:** 30 cases of KOTGSs were obtained from 12 patients with GS, 5 females (41.66%) and 7 men (58.33%); whereas in group of KOTSPs, 5 cases (62.50%) was in females and 3 males (37.50%). About 58.33% of patients with GS had more than one lesion throughout life. The average age of individuals with GS was  $14.66 \pm 16.81$  years, while in patients with KOTSPs was  $41 \pm 39.59$ . The predominant radiographic pattern was radiolucent unilocular, preferably affecting the posterior mandible. Histopathological features in both groups was analyzed, and the most frequent was pleomorphism in KOTGSs. In addition, there was increased expression of p53 and p63 in KOTGSs and similar expression of SMA and Ki-67 between groups. It was also observed that there was a lower reactivity for CD138 in the basal epithelial layer of KOTGSs and stromal expression of CD138 was similar between the groups. **Conclusions:** Aggressiveness of KOTGSs can be explained by increased cellular pleomorphism rate and expression of p53 and p63 and tendency to loss of syndecan-1 expression compared to KOTSPs.

**KEYWORDS:** Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome; Keratocystic Odontogenic Tumor; Immunohistochemistry; Bone cysts; Jaw.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AML/ $\alpha$ -SMA: Alfa actina de músculo liso.

Bax: Proteína reguladora de apoptose.

Ciclina D-1 – proteína reguladora do ciclo celular.

Bcl-2: Proteína reguladora de morte celular.

CBC: Carcinoma basocelular.

CD: Cisto dentífero.

CD138: Proteoglicano transmembranar epitelial.

C-erbB-2: Produto do oncogene *c-erbB-2*.

COO: Cisto Odontogênico Ortoqueratinizado.

CO SOE: Cisto odontogênico sem outra especificação.

CR: Cisto radicular.

DP: Desvio Padrão.

GLI: Oncogene associado a glioma.

HE: Hematoxilina e Eosina.

HH: Hedgehog.

Kbp: Quilo de pares de bases.

Ki-67: Marcador de proteína associada à proliferação celular.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

p27: Proteína inibitória do ciclo celular.

p53: Proteína codificada pelo gene *TP53* supressor tumoral.

p-63: Proteína da família da p53, reguladora de proliferação epitelial.

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular.

PTCH: Proteína Patched.

*PTCH-1*: Gene *PATCHED-1*.

QO: Queratocisto Odontogênico.

SG: Síndrome de Gorlin / Síndrome do carcinoma nevóide basocelular.

SHH: Sonic Hedgehog.

SMO: Smoothened.

*Sufu*: Gene supressor de proteínas *fused*.

TOQ: Tumor Odontogênico Queratocístico.

TOQE: Tumor Odontogênico Queratocístico Esporádico.

TOQSG: Tumor Odontogênico Queratocístico associado à Síndrome de Gorlin.

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

**Figura 1** – Via de Sinalização SHH.

**Figura 2** – Distribuição dos pacientes com TOQs de acordo com a década de vida no momento do diagnóstico.

**Figura 3** – Características histopatológicas dos TOQSGs.

**Figura 4** – Reações imuno-histoquímicas para p53, Ki-67, p63 e AML em TOQs.

**Figura 5** – Expressão de CD138 nas estruturas epiteliais de um TOQSG.

**Figura 6** – Expressão de CD138 em ilha epitelial com característica ameloblastomatosa em um caso de TOQSG.

**Figura 7** – Análise semi-quantitativa da marcação de células estromais para CD138, de acordo com teste t para amostras independentes.

**Tabela 1** – Critérios para o diagnóstico da Síndrome de Gorlin.

**Tabela 2** – Análises imuno-histoquímicas publicadas envolvendo TOQs associados à SG.

**Tabela 3** – Origem e número da amostra utilizada no presente trabalho.

**Tabela 4** – Relação dos anticorpos primários utilizados no presente trabalho.

**Tabela 5** - Método de análise e classificação dos imunomarcadores estudados.

**Tabela 6** – Análise dos dados clínicos dos TOQs.

**Tabela 7** – Ocorrência de características histopatológicas nos TOQSGs e TOQEs.

**Tabela 8** – Análise imuno-histoquímica qualitativa e semi-quantitativa para p53, Ki-67, p63 e AML nos TOQs.

**Tabela 9** – Análise imuno-histoquímica semi-quantitativa comparativa de CD138 entre TOQSGs e TOQEs, considerando as estruturas epiteliais e os escores avaliados.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	HISTÓRICO .....	15
3.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA SÍNDROME DE GORLIN.....	15
3.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS DA SG .....	17
3.4	TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO.....	20
3.5	IMUNOMARCADORES .....	22
3.6	ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS EM TOQs ASSOCIADOS À SG .....	26
4	METODOLOGIA.....	34
4.1	AMOSTRA .....	34
4.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	35
4.3	REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	35
4.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	37
4.5	COLETA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
5	RESULTADOS .....	39
5.1	DADOS CLÍNICOS .....	39
5.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	41
5.3	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	44
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
9	ANEXO .....	74

## 2 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Gorlin (SG), também conhecida como Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular, é uma doença rara (1 caso para cada 60.000 habitantes) que afeta igualmente pacientes de ambos os gêneros, resultante de mutações genéticas no gene *PATCHED-1* (*PTCH-1*) localizado no braço longo do cromossomo 9, o qual tem um papel fundamental no controle do crescimento e desenvolvimento dos tecidos normais (R Yang *et al.*, 2006; Scully *et al.*, 2010). A SG é uma doença multissistêmica, com sinais e sintomas variando desde alterações dermatológicas, ósseas e estomatológicas, incluindo principalmente os carcinomas basocelulares, as deformidades ósseas em crânio e costelas, e os tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs) nos ossos gnáticos (Gorlin, 2004).

Os TOQs estão presentes em cerca de 90% dos pacientes portadores da SG. Desenvolvem-se no interior dos ossos gnáticos, preferencialmente pelos espaços medulares da região posterior da mandíbula, e radiograficamente apresentam-se como lesões radiolúcidas unilocular ou multilocular, bem delimitada e com margens festonadas. Quando isolados e ocorrendo de modo esporádico (TOQEs), manifestam-se geralmente durante a segunda e terceira décadas de vida, enquanto que tumores odontogênicos queratocísticos associados à SG (TOQSG) manifestam-se pela primeira vez na primeira década de vida em 65 a 75% dos casos (Gu *et al.*, 2006; Shear & Speight, 2007; Amezaga *et al.*, 2008).

Embora o mecanismo de crescimento e invasão do TOQ ainda não seja completamente entendido, sabe-se que a atividade proliferativa do epitélio e a sua relação com o estroma são fatores importantes para seu comportamento neoplásico (Kolar, *et al.*, 2006; Ramos, *et al.*, 2014). Vários autores têm demonstrado expressão de Ki-67 e p53 em TOQs, associando com crescimento e atividade proliferativa epitelial, no entanto a marcação imunohistoquímica de p63, AML e CD138 no limitante epitelial e na cápsula estromal de TOQs tem sido pouco investigada.

### 3 OBJETIVOS

#### **Objetivo geral:**

O presente estudo teve como objetivo analisar comparativamente os aspectos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de TOQEs e TOQSGs oriundos de diferentes instituições do Brasil e do exterior, além de entender o papel de proteínas associadas com proliferação/ciclo celular (p53, p63 e Ki-67), da actina de músculo liso-alfa ( $\alpha$ -SMA) e da proteína sindecano-1 (CD138), na tentativa de associar a expressão das mesmas com o comportamento biológico dos TOQs.

#### **Objetivos específicos:**

- Avaliar as características clínicas dos TOQSGs e TOQEs, como gênero, idade do diagnóstico, localização anatômica e padrão radiográfico;
- Avaliar as características histopatológicas dos TOQSGs e TOQEs;
- Avaliar a marcação imuno-histoquímica de p53, p63, Ki-67 e CD138 no limitante epitelial de TOQSGs e TOQEs.
- Avaliar a marcação imuno-histoquímica de AML e CD138 na cápsula estromal de TOQSGs e TOQEs.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos da SG existem desde os tempos da dinastia egípcia visto que características compatíveis com a síndrome foram encontradas em múmias que datavam de 1.000 a.C. (Satinoff & Wells, 1969), entretanto as primeiras descrições de pacientes portadores aconteceram em meados de 1894, quando W. Jarisch e J.C. White destacaram a presença de múltiplos carcinomas basocelulares em alguns pacientes. Por volta de 1939, Straith relatou um caso em que vários carcinomas basocelulares apareciam juntamente com cistos na mandíbula. Bettley e Ward, nos anos de 1953 e 1960, relacionaram a presença de marcas palmares e plantares em seus achados clínicos. Entretanto, só em 1960, com o professor R. J. Gorlin e colaboradores, é que esta condição foi definida como Síndrome de Gorlin, também conhecida como Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular. Os autores descreveram-na como uma tríade de desordens, que incluía múltiplos carcinomas basocelulares, numerosos tumores odontogênicos queratocísticos nos ossos gnáticos e anormalidades esqueléticas (Gorlin & Goltz, 1960; Gorlin, 2004).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA SÍNDROME DE GORLIN

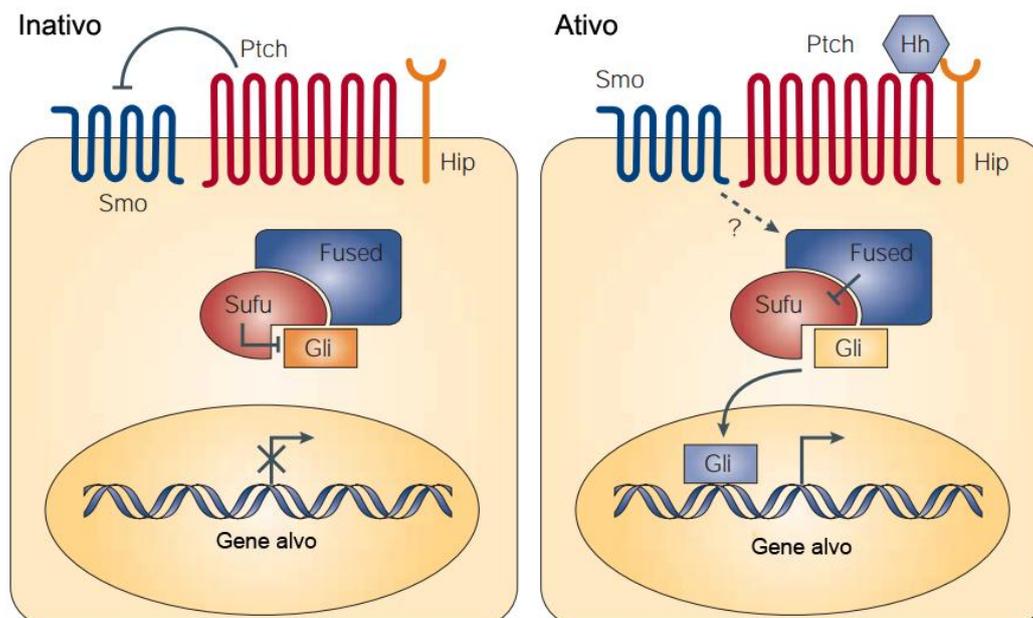
A SG é uma desordem hereditária autossômica dominante com alta penetrância e expressividade fenotípica variável. Ocorre devido a mutações que levam à perda de heterozigiosidade do gene supressor tumoral *PATCHED-1*. Este gene localiza-se no cromossomo 9q 22.3-q31 e desempenha papel fundamental no controle do crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Wicking & Bale, 1997; Gorlin, 1999; Lo Muzio, *et al.*, 1999; Gorlin, 2004; Marsh, *et al.*, 2005). Possui aproximadamente 34kbp e é constituído por 23 éxons que codificam uma proteína de 1447 aminoácidos a qual contém 12

domínios transmembrânicos e 2 grandes *loops* extracelulares, denominada proteína Patched (PTCH), onde ocorre a ligação da proteína “*Sonic Hedgehog*” (SHH) (Gorlin, 2004). Esta proteína faz parte da via de sinalização “*Sonic HedgeHog*”, a qual desempenha um papel de destaque no desenvolvimento embrionário, através da expressão de proteínas em diferentes fases da ontogenia e que podem ter funções biológicas diversas, controlando de forma autócrina e parácrina a proliferação e diferenciação celular (Vorechovsky, *et al.*, 1999). Na ausência da ligação da proteína *Sonic Hedgehog* (SHH) à *Patched* (PTCH), ocorre a inibição da via. Em contrapartida, quando se tem a ligação da SHH a PTCH, ocorre a liberação da proteína *Smoothened* (SMO) que encontrava-se em um estado precursor inativo, tornando-se ativada, alterando o destino das proteínas citoplasmáticas *Glioma associated oncogene* (GLI). As proteínas Gli1 e Gli2 migram para o núcleo celular atuando como ativadoras dos genes alvo (SHH, PTCH, GLI), enquanto Gli3 age suprimindo.

Por outro lado, foi comprovado que o desregulamento na cascata de sinalização do SHH e mutações no gene PTCH-1 estão associados à SG e contribuem para a formação de carcinomas basocelulares associados ou não à síndrome (Zhang *et al.*, 2001). Outros trabalhos também têm demonstrado essas alterações em TOQSGs e TOQEs (Barreto *et al.*, 2000; Ohki *et al.*, 2004; Agaram *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2008).

O gene supressor de proteínas *fused* (Sufu) também tem importante papel na patogenia da SG ao ligar-se à proteína Gli no citoplasma e no núcleo, prevenindo a ativação de genes-alvo da via, por parte desta proteína (Wicking *et al.*, 1999; Evangelista *et al.*, 2006). Alterações dessa via também podem acarretar em mudanças no desenvolvimento e controle de tecidos, o que conseqüentemente pode levar ao surgimento de neoplasias (Hahn *et al.*, 1996; Epstein, 2008; De Zwaan & Haass, 2010). A via de sinalização SHH encontra-se esquematizada na Figura 1.

Nos últimos anos, o conhecimento do mecanismo molecular da SG possibilitou o advento de medicamentos como o “Vismodegib<sup>®</sup>”, para o tratamento de carcinomas basocelulares inoperáveis e TOQs em pacientes com SG, entretanto ainda sem dados conclusivos quanto à sua aplicação clínica nestes últimos (Goldberg *et al.*, 2011; Cirrone *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2014).



**Figura 1-** Via de sinalização SHH. PTCH está ligada a SMO e os genes alvo estão inativos. Quando ocorre a ligação da proteína SHH (Hh) à PTCH, SMO é liberada permitindo a transdução de sinal e GLI ativa a transcrição dos genes alvo (Adaptada de Pasca di Magliano MP, Hebrok M, 2003).

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS DA SG

O paciente portador da SG pode apresentar diversos sinais e sintomas tais como alterações dermatológicas, orofaciais, esqueléticas, anormalidades oculares, neurológicas, cardiovasculares, relativas ao sistema reprodutor e neoplasias, entre outras de menor frequência (Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

O carcinoma basocelular (CBC) ocorre em cerca de 50 a 97% dos pacientes. Apresenta crescimento lento e acomete regiões acima da cintura, principalmente rosto, pescoço, tórax e costas, apresentando-se clinicamente sob formas variadas, desde nódulos ou pápulas com alteração de cor, a placas ulceradas na pele. Geralmente as lesões surgem em múltiplos locais e são idênticas histopatologicamente aos CBCs não associados à síndrome. Exibem ninhos e ilhas de células com núcleos grandes e hipercoreados, sendo que na periferia da lesão, encontram-se células epiteliais polarizadas, semelhantes às células basais cutâneas. Em cerca de 30 a 50% dos casos podem ser observados focos de calcificações e milia misturados às ilhas de células basais (Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

Cerca de 40% dos pacientes com a SG apresentam milia isoladamente, que é um pequeno cisto cutâneo de queratina que acomete preferencialmente a face, próximo aos olhos e à frente (Gorlin, 2004). Aproximadamente 65 a 80% dos pacientes apresentam também depressões palmares e plantares, que são caracterizadas por pontos de coloração avermelhada em caucasianos e escurecidas em africanos. São assimétricas e medem aproximadamente 2 a 3 milímetros de diâmetro, com 1 milímetro de profundidade e geralmente ocorrem mais na palma das mãos (77%) do que na planta dos pés (50%) (Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

Pacientes acometidos pela SG podem apresentar ainda inúmeras alterações esqueléticas, desde a calcificação lamelar da foice cerebral; calcificação da tenda do cerebelo, do ligamento petroclinóide e do diafragma da sela túrcica; alterações na morfologia das costelas – costelas bífidas e/ou fusionadas; além de outras alterações, como estatura elevada; anormalidades no formato do crânio; alterações na coluna vertebral; deformidades escapulares; depressão do osso esterno (*pectus excavatum*); hiperplasia do processo coronóide; polidactilia; entre outras menos frequentes (Leonardi *et al.*, 2002; Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

Problemas oculares também podem ocorrer em 10 a 25% dos pacientes (Gorlin, 2004). As anormalidades oftálmicas incluem: hipertelorismo, que afeta cerca de 70% destes pacientes; exoftalmia; estrabismo; catarata congênita; cistos orbitais; coloboma da íris; microftalmia; entre outras alterações oculares de menor incidência (Evans *et al.*, 1997; Lo Muzio. *et al.*, 1999).

Fibromas e cistos ovarianos estão presentes em 25 a 50% das mulheres afetadas pela síndrome, dos quais a maioria é bilateral e calcificado, diferindo dos casos não associados à síndrome (Yoshizumi *et al.*, 1990). Essa alteração pode causar torção do ovário, embora não esteja associada à redução da fertilidade nessas pacientes (Evans *et al.*, 1997; Gorlin, 2004).

Alterações renais também podem ocorrer, aparecendo na forma de cistos; agenesia renal unilateral; rins em formatos anômalos (em forma de ferradura ou em “L”); além de duplicação de ureteres. Entretanto, estas anomalias são citadas em menor frequência pela literatura visto que necessitam de exames mais específicos para o diagnóstico, como por exemplo, a laparoscopia (Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

Quanto às características estomatológicas, os TOQs estão presentes em 90% dos pacientes (Lo Muzio *et al.*, 1999) e serão descritos mais detalhadamente no próximo tópico. Além deles, outras anormalidades de menor frequência podem ocorrer como as maloclusões; dentes impactados; prognatismo mandibular; dentes em posições ectópicas; agenesia dental; fissuras labiopalatinas; entre outros (Ruprecht *et al.*, 1987; Soekarman *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1997; Lo Muzio, 2008). A hiperplasia bilateral do processo coronóide foi incluída como um critério para o diagnóstico da SG, especialmente em pacientes pediátricos (Leonardi *et al.*, 2001; Leonardi *et al.*, 2002).

Nesta síndrome, além dos principais envolvimento dermatológico, esquelético e estomatognático já citados, podem ser encontradas alterações de menor frequência tais como: fibroma cardíaco; cistos mesentéricos linfáticos solitários ou múltiplos, além de outros tumores como meduloblastoma, rabdomyossarcoma, astrocitoma, craniofaringioma, oligodendroglioma, entre outros (Evans *et al.*, 1997; Gorlin, 2004; Lo Muzio, 2008).

Sendo assim, o diagnóstico da SG baseia-se em características principais e secundárias e é considerado conclusivo, quando o paciente apresenta dois dos critérios principais ou um critério principal e dois secundários (Evans *et al.*, 1997; Kimonis *et al.*, 1997). Estes critérios encontram-se categorizados na Tabela 1. Nos casos em que o diagnóstico não esteja determinado, pode ser feita a análise de DNA, através do mapeamento genético, o qual identificará a mutação no gene associado (R Yang *et al.*, 2006; Soufir *et al.*, 2006; Lo Muzio, 2008).

**Tabela 1** – Critérios para o diagnóstico da Síndrome de Gorlin.

<b>Características Principais</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Múltiplos carcinomas basocelulares (&gt;2), ou um com idade inferior a 20 anos;</li> <li>2. Tumor odontogênico queratocístico comprovado histologicamente;</li> <li>3. Depressões palmares e plantares (3 ou mais);</li> <li>4. Calcificação da foice cerebral;</li> <li>5. Costelas bífidas, fusionadas ou marcadamente abertas;</li> <li>6. Parentes de primeiro grau com a Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular.</li> </ol>
<b>Características Secundárias</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Macrocefalia determinada após término do crescimento;</li> <li>2. Malformações congênitas: fissura labial ou palatina, bossa frontal, face grosseira, hipertelorismo moderado ou severo;</li> <li>3. Outras anormalidades esqueléticas: deformidade de Sprengel, <i>pectus scavatum</i>, sindactilia;</li> <li>4. Anormalidades radiológicas: alterações vertebrais como fusão ou alongamento do corpo da vértebra, defeitos na modelagem das mãos e pés;</li> <li>5. Fibroma de ovário;</li> <li>6. Meduloblastoma;</li> <li>7. Outras alterações menos frequentes.</li> </ol>

\*Adaptada de Evans *et al.*, 1997 e Kimonis *et al.*, 1997.

#### **4.4 TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO**

O Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ) foi primeiramente descrito por Philipsen em 1956 como um cisto de desenvolvimento, chamado de Queratocisto Odontogênico (QO). No entanto, em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reclassificou-o como neoplasia benigna, denominando-o Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), justificado pelo seu comportamento clínico agressivo, alto potencial recidivante e associação com a SG. O TOQ consiste de uma entidade patológica que se origina de

remanescentes da lâmina dentária (Barnes *et al.*, 2005). Estas lesões, quando isoladas e ocorrendo de modo esporádico, manifestam-se geralmente durante a segunda e terceira décadas de vida, representando de 3 a 15% do total dos cistos odontogênicos (Regezi, 2002). Já quando associadas à SG, manifestam-se pela primeira vez na primeira década de vida em 65 a 75% dos casos (Manfredi *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2006; Amezaga *et al.*, 2008). De um modo geral, localizam-se preferencialmente no corpo e ramo mandibular, embora também possam ser encontrados na maxila. Radiograficamente, aparecem como lesões uni ou multiloculares radiolúcidas, com bordas escleróticas definidas, podendo estar associadas a dentes que apresentam-se deslocados (Gorlin, 2004; Manfredi *et al.*, 2004; Amezaga *et al.*, 2008; Lo Muzio, 2008). Histologicamente, os TOQs apresentam um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado na maioria dos casos (80-90%) ou, em menor frequência, ortoqueratinizado, contudo ambas as formas podem encontrar-se mescladas numa mesma lesão (Shear & Speight, 2007). A camada de paraqueratina geralmente apresenta-se ondulada e corrugada e o tecido epitelial composto por 5 a 8 camadas de células aproximadamente. Devido à semelhança histopatológica é importante diferenciá-lo do Cisto Odontogênico Ortoqueratinizado (COO) que era caracterizado como uma variante do TOQ. No entanto, baseando-se no comportamento clínico, Wright (1981) sugeriu a distinção entre as duas lesões. Em concordância, alguns estudos também mostraram diferenças histopatológicas e imuno-histoquímicas e atualmente, o COO é considerado como uma entidade distinta (Crowley *et al.*, 1992; Vuahula *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 2005). A camada basal dos TOQs apresenta-se bem definida, com suas células dispostas em paliçada, algumas vezes podendo exibir edema intracelular e núcleos orientados distantes da membrana basal e com aspecto basofílico (Forsell & Sainio, 1979 *apud* Shear & Speight, 2007). Possuem cápsula fibrosa fina com poucas células. A união entre o epitélio e a cápsula tende a ser fraca e com frequência ocorre sua separação (Waldron, 1969 *apud* Shear & Speight, 2007). As células da inflamação apresentam-se pouco frequentes, podendo haver uma infiltração discreta de linfócitos e macrófagos. Mastócitos também podem estar presentes em quantidades substanciais na parede dos TOQs, o que sugere que estas células, através de estímulo quimiotático, sejam atraídas para o revestimento epitelial ou para o

lúmen. Na presença de processo inflamatório intenso, o epitélio adjacente pode perder sua superfície queratinizada e tornar-se espessado. No interior dos TOQs, pode ser encontrada queratina, proveniente da descamação epitelial (Shear & Speight, 2007). Em alguns casos, pode-se observar brotamentos epiteliais basais (“*buddings*”), restos odontogênicos, ilhas epiteliais, áreas ameloblastomatosas e cistos satélites na cápsula cística, particularmente nos pacientes com múltiplas lesões e em portadores da SG. Nestes indivíduos, Waldron (1969) descreveu que o revestimento epitelial era consideravelmente mais fino que dos casos clássicos e mostraram proeminentes brotamentos da camada basal. De acordo com os estudos de Ahlfors *et al.*(1984) a ocorrência dos brotamentos basais apresentou maior frequência (25%) em indivíduos com TOQs associados à síndrome e que exibiam múltiplas lesões, quando comparada aos pacientes que apresentaram TOQs esporádicos recidivados pós tratamento cirúrgico. Pode ocorrer também, grande atividade mitótica nas camadas basal e suprabasal do epitélio. Estas duas características supracitadas podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela alta taxa de recorrência destas lesões (Browne, 1971a *apud* Shear & Speight, 2007; Woolgar *et al.*, 1987; Lo Muzio *et al.*, 1999; Gorlin, 2004; Manfredi *et al.*, 2004; Shear & Speight, 2007; Amezaga *et al.*, 2008).

### 3.5 IMUNOMARCADORES

Sabe-se que o ciclo celular é regulado por diversos proto-oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento, citocinas, hormônios, além de outras proteínas, e é neste contexto que a imuno-histoquímica pode ser utilizada como método indicador do comportamento biológico de tumores. Sendo assim, as proteínas codificadas por alguns genes podem ser estudadas a fim de elucidar seu papel na tumorigênese (Alberts *et al.*, 2010; Kierszenbaum, 2008).

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17 p13.1, codifica a proteína p53, que tem função supressora tumoral. Este gene é considerado o guardião do genoma, garantindo a homeostase dos tecidos e em condições fisiológicas

é expresso em baixos níveis e possui meia-vida curta, exercendo função no ciclo celular na interface G1-S, cumprindo o papel de reparo do DNA e/ou no envio da célula para apoptose quando o reparo não pode ser completado (Darnton, 1998). Quando existe o acúmulo desta proteína no núcleo celular, ocorre a ativação maciça de diversos genes pró-apoptóticos e anti-proliferação e por consequência estes genes medeiam mecanismos supressores de tumor como a parada do ciclo celular, a senescência e a apoptose celular (Vousden & Lu, 2002; Vogelstein *et al.*, 2000). Esta proteína pode encontrar-se expressa tanto em sua forma normal ou “selvagem”, quanto em sua forma mutada ou disfuncional (Darnton, 1998). Quando expressa em sua forma normal, acredita-se que representa uma resposta à alta atividade proliferativa de determinadas lesões como por exemplo, em tumores odontogênicos queratocísticos (Li *et al.*, 1996).

Já a imunopositividade para a forma mutada (uma única mutação aumenta a sua meia-vida), que geralmente ocorre em altos níveis nas células transformadas, elucida que não ocorreu a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA (Darnton, 1998; Cavalcanti Júnior *et al.*, 2002). A forma mutada da p53 apresenta ainda a capacidade de interagir com a proteína selvagem impedindo assim a supressão tumoral, fenômeno conhecido como efeito dominante, conferindo assim uma associação com o surgimento de uma variedade de neoplasias humanas benignas e malignas (Lemos, 1995; YIN *et al.*, 2002). Esta forma possui meia-vida longa comparada com a forma selvagem, que possui meia-vida inferior a vinte minutos, além de ser encontrada em maiores quantidades, expressando então, maior imunopositividade quando comparada à marcação da proteína em sua forma selvagem (Darnton, 1998; Cavalcanti Júnior *et al.*, 2002). Mutações ou a inativação dessa proteína estão implicadas no surgimento de tumores por acarretar um aumento de populações celulares com maior instabilidade genética. A p53 mutada também está relacionada com um pior prognóstico de neoplasias (Goh *et al.*, 2011; Muller & Vousden, 2013).

O Gene *p63*, localizado no cromossomo 3q27-28 é um membro da família do gene *TP53*. Este gene apresenta variadas isoformas de acordo com a presença ou ausência do domínio de ativação transcricional, sendo imprescindível para a morfogênese, regulando a proliferação e diferenciação

epitelial. Por outro lado, esta proteína pode apresentar-se mutada e superexpressa, podendo atuar como oncogene, regulando positivamente a proliferação celular e sua superexpressão já foi verificada em carcinomas espinocelulares, linfomas e timomas (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Parsa *et al.*, 1999; Di Como, *et al.*, 2002; Lo Muzio *et al.*, 2005).

O gene *MKI-67* codifica uma proteína nuclear (Ki-67) expressa por células em proliferação em todas as fases do ciclo celular ativo (G1, S, G2 e M), com exceção da fase G0, contudo encontra-se ausente em células quiescentes. Apresenta-se em pico nas fases G2 e M e é degradada rapidamente após a mitose. Ki-67 está associada além da proliferação celular, também com a transcrição de RNA ribossômico (Gerdes *et al.*, 1992; Key *et al.*, 1993). A aplicação do Ki-67 no estudo do desenvolvimento das neoplasias humanas constitui um método fácil e útil, pois fornece informações sobre o prognóstico das lesões devido à detecção de certas populações celulares. A imunomarcagem desta proteína é amplamente utilizada para o estudo de cânceres como o de próstata, mama, linfomas de Hodking, melanomas, entre outros e tem sido utilizada também como valioso marcador preditor do comportamento biológico de lesões císticas no campo da odontologia (Scholzen & Gerdens, 2000; Kolar *et al.*, 2006; Ayoub *et al.*, 2011).

O gene *ACTA2*, localizado no braço longo do cromossomo 10p23.3, fornece subsídios para a síntese de actinas citoplasmáticas, que fazem parte do sistema de microfilamento das proteínas citoesqueléticas. Uma de suas isoformas é a proteína actina-alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA ou AML) que é imprescindível para o movimento celular além do estiramento das fibras musculares durante a contração dos músculos. Age na manutenção do citoesqueleto que determina o formato e organiza todo o conteúdo celular. A  $\alpha$ -SMA é encontrada nos núcleos de células de músculo liso do sistema vascular, como na parede das artérias, mucosas musculares intestinais e muscular própria e no estroma de vários tecidos (Lambrechts *et al.*, 2004). Anticorpos contra  $\alpha$ -SMA identificam células que apresentam características de músculo liso e células com diferenciação miofibroblástica. Este anticorpo tem sido usado como ferramenta útil para identificar células mioepiteliais misturadas a células epiteliais em lesões proliferativas benignas de mama, ajudando na diferenciação de lesões malignas. É usado também como marcador de

músculo liso em tumores fusiformes e pleomórficos, como leiomiossarcomas, leiomiomas e adenomas pleomórficos e recentemente tem sido relacionada com lesões de origem odontogênica que apresentam comportamento biológico mais agressivo como em ameloblastomas, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos (Leong *et al.*, 1999; Vered, *et al.*, 2005; Nonaka, *et al.*, 2011; Nadalin, *et al.*, 2012; Ramos, *et al.*, 2014).

O gene *SDC-1* localizado no braço curto do cromossomo 2 é responsável pela codificação da proteína transmembranar sindecano-1 ou CD138. Este produto consiste em um proteoglicano transmembranar de sulfato de heparano que se encontra expresso em células endoteliais, fibroblastos estromais e células inflamatórias, porém tem máxima expressão no epitélio normal, principalmente no epitélio pavimentoso estratificado da pele. Sindecano-1 é imprescindível para a manutenção da morfologia e organização do citoesqueleto de controle epitelial, além disso, é essencial para a expressão de moléculas de adesão, crescimento celular o qual depende de ancoragem bem como para a interação epitélio-mesênquima. Este proteoglicano também se encontra expresso no epitélio odontogênico e mesênquima, durante o desenvolvimento dentário (Elenius & Jalkanen, 1994; Inki *et al.*, 1994; Soukka *et al.*, 2000). Alterações mais significativas na expressão de CD138 ocorrem durante a embriogênese, em processos de reparo e também na carcinogênese, o que reflete em mudanças relacionadas ao crescimento, forma, comportamento, organização, migração celular e também na modificação do citoesqueleto das células. Pesquisas apontam que a perda de expressão do sindecano-1 em neoplasias epiteliais malignas tem sido associada à invasão de tecidos, metástase além de estar relacionada a um prognóstico reservado para essas lesões (Anttonen *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2004). No ramo da odontologia, estudos relacionados à essa proteína tem demonstrado que a ausência de imunoreatividade para CD138 em ameloblastomas sólidos está associada com o comportamento biológico mais agressivo dessas lesões. Em pesquisa com lesões císticas odontogênicas, Nadalin *et al.* (2011) analisaram a expressão de CD138 e Ki-67 em cistos dentígeros, cistos radiculares e tumores odontogênicos queratocísticos. Entre as lesões estudadas, não foi observada diferença entre a expressão de CD138, ao passo que a expressão suprabasal

de Ki-67 foi significativamente maior nos TOQs em comparação às demais lesões.

Al-Otaibi *et al.* (2013) avaliaram a expressão de CD138 em ameloblastomas, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Observaram que houve expressão em todas as lesões estudadas, tanto no tecido epitelial quanto no conjuntivo e que a expressão epitelial foi associada a lesões que se estendiam e invadiam estruturas adjacentes. Nas amostras de ameloblastomas, puderam constatar que as células da periferia da lesão não foram reativas ao marcador e que essas lesões apresentaram menor expressão de CD138 que os cistos dentígeros e TOQs. Quanto aos TOQs, houve alta expressão de CD138 no limitante cístico em 92,3% dos casos. Além disso, o padrão de marcação dos cistos satélites foi similar ao do revestimento cístico, por outro lado observou-se diminuição da expressão em áreas de brotamento epitelial. Apesar dos autores avaliarem tanto o tecido epitelial como conjuntivo dos TOQs, relataram dificuldade para a interpretação da reatividade estromal.

### **3.6 ESTUDOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS EM TOQs ASSOCIADOS À SG**

Desde 1992, muitos estudos imuno-histoquímicos têm sido realizados com TOQs associados ou não à SG, e eventualmente em comparação a outras lesões císticas e a tumores odontogênicos. Na tabela 2, encontram-se listados os principais estudos publicados, considerando a amostra e os imunomarcadores utilizados. Até o momento, foi avaliada a expressão das proteínas p53 (Ogden *et al.*, 1992; Lo Muzio *et al.*, 1999; González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et.al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Mendes *et al.*,2011); Ki-67 (González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et.al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Mateus *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2010; Mendes *et al.*,2011; Kadlub *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014), p63 (Foschini *et al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Friedrich *et al.*, 2012), AML (Nonaka *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014), PCNA (El Murtadi *et al.*, 1996; Lo Muzio *et al.*, 1999; Kolar *et.al.*, 2006), Bcl-2 (Lo Muzio *et al.*, 1999; Kolar *et.al.*, 2006), Ciclina D1 (Lo Muzio *et al.*, 1999), Vimentina (Hong *et al.*,

2014), Tenascina, Fibronectina, Laminina, Colágeno tipo IV (Amorim *et al.*, 2004), CK AE3, CK17, CK19 (Hong *et al.*, 2014), Cox-2 (Mendes *et al.*, 2011), além das metaloproteinases de matriz (MMPs) 1, 7 e 26 (Cavalcante *et al.*, 2008) em TOQs esporádicos e associados à SG.

De um modo geral, os resultados desses estudos sugerem um comportamento biológico mais agressivo dos TOQSGs quando comparados aos TOQEs e às demais lesões (Ogden *et al.*, 1992; El Murtadi *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; Zedan *et al.*, 2001; Ohki *et al.*, 2004; González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Mateus *et al.*, 2008; Nonaka *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014).

**Tabela 2** - Análises imuno-histoquímicas publicadas envolvendo TOQs associados à SG.

<i>Autor/Ano</i>	<i>n</i> <i>(total)</i>	<i>n</i> <i>(Gorlin)</i>	<i>Amostra</i>	<i>Marcador imuno-histoquímico</i>
<b>Ogden et al. (1992)</b>	36	2	12 CR/12 CD/12 TOQs	p53
<b>El Mutardi et al. (1996)</b>	41	21	21 TOQSGs/20 TOQEs	PCNA
<b>Li et al. (1997)</b>	47	9	27 TOQs/10 CD/10 CR	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ e EGF
<b>Lo Muzio et al. (1999)</b>	32	16	16 TOQEs/16 TOQSGs	p53, PCNA, Bcl-2, Ciclina D1
<b>Zedan et al. (2001)</b>	27	13	11 TOQSGs/8 TOQEs/2 CBCSG/6 CBCE	PTCH, GLI-1
<b>Amorim et al. (2004)</b>	15	5	10 TOQSGs/5 TOQs	Tenascina, Fibronectina, Colágeno IV, Lamnina
<b>Ohki et al. (2004)</b>	22	4	18 TOQEs/4 TOQSGs/7 G	SHH, PTC, SMO, GLI-1
<b>Foschini et al. (2006)</b>	40	7	33 TOQEs/7 TOQSGs	p63
<b>González-Moles et al. (2006)</b>	83	29	29 TOQSGs/29 CSNR/20 CSR/5 QC	p53, Ki-67
<b>Kolar et al. (2006)</b>	107	18	57 TOQs/10 CD/29 CR/11 COsSOE	p53, p53 fosforilada, Bcl-2, Bax, p21, p27, c-erbB-2, HER2/neu, PCNA, Ki-67
<b>Cavalcante et al. (2008)</b>	41	21	20 TOQEs/21 TOQSGs	MMP-1, MMP-7, MMP-26
<b>Gurgel et al. (2008)</b>	37	9	9 TOQSGs/28 TOQRs	Ki-67, p53, p63

<b>Mateus et al. (2008)</b>	37	15	11 TOQEs/15 TOQSGs/11 CD	Ki-67
<b>Figuerola et al. (2010)</b>	19	7	12 TOQEs/7 TOQSGs	PCNA, Ki-67; p53
<b>Mendes et al. (2011)</b>	20	2	18 TOQEs/2 TOQSGs	COX-2, p53, Ki-67
<b>Nonaka et al. (2012)</b>	52	22	22 TOQSGs/22 TOQEPs/8 TOQERs	RANKL, OPG, CD-34, AML
<b>Kadlub et al. (2013)</b>	16	5	5 TOQSGs/11 TOQEs	Ki-67
<b>Hong et al. (2014)</b>	16	8	8 TOQSGs/8 TOQEs	Vimentina, Ck AE3, Ck17, Ck19
<b>Ramos et al. (2014)</b>	29	12	11 TOQEs/12 TOQSGs/6 FP	MMP-1, MMP-9, Ki-67, $\alpha$ -SMA
<b>Delgado et al. (2015)</b>	38	30	30 TOQSGs/8 TOQEs	p53, p63, Ki67, AML, CD138

---

\*CR: cisto radicular; CD: cisto dentífero; TOQ: tumor odontogênico queratocístico; TOQE: tumor odontogênico queratocístico esporádico; TOQSG: tumor odontogênico queratocístico associado à Síndrome de Gorlin; CBCSG: carcinoma basocelular associado à Síndrome de Gorlin; CBCE: carcinoma basocelular esporádico; G: gengiva; CSNR: cistos solitários não recorrentes; CSR: cistos solitários recorrentes; QC: queratocisto condróide; COs SOE: cisto odontogênico sem outra especificação; TOQR: tumor odontogênico queratocístico recorrente; TOQEP: tumor odontogênico queratocístico esporádico primário; TOQER: tumor odontogênico queratocístico esporádico recorrente; FP: folículo pericoronário.

Quanto aos principais resultados encontrados, em ordem cronológica, Ogden *et al.* (1992) observaram que apenas os TOQs apresentaram imunoreatividade para p53, sugerindo uma maior agressividade dessas lesões.

El Murtadi *et al.* (1996) avaliaram a correlação entre o grau de imunoreatividade para PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) e o comportamento dos TOQs associados ou não à SG e observaram que a imunomarcção foi estatisticamente maior nos TOQSGs quando comparados aos TOQEs, sugerindo uma taxa de proliferação mais elevada nesses casos.

Li *et al.* (1997) avaliaram a expressão de TGF $\alpha$  (fator de crescimento transformante alfa), TGF $\beta$  (fator de crescimento transformante beta) e EGF (fator de crescimento epidérmico) em 27 TOQs (9 deles associados à SG), 10 cistos dentígeros (CD) e 10 cistos radiculares (CR). Neste estudo, 8 TOQSGs apresentaram imunoreatividade fortemente positiva para TGF $\alpha$ , além de apontarem imunoreatividade positiva para EGF, sugerindo que estes fatores/receptores de crescimento possam estar envolvidos na patogênese destas lesões.

Lo Muzio *et al.* (1999) observaram imunopositividade para p53 e Ciclina D1 nos TOQSGs em comparação aos TOQEs, sugerindo que o comportamento agressivo dos TOQSGs possa estar associado à expressão desregulada de proteínas envolvidas no ciclo celular.

Zedan *et al.* (2001) avaliaram a expressão de PTCH e GLI-1 em TOQs e em carcinomas basocelulares, associados ou não à SG, e observaram imunoreatividade para ambos marcadores na maioria dos TOQSGs e diferenças qualitativas na marcação entre os grupos, sugerindo que esses marcadores podem ser úteis na diferenciação entre lesões síndrômicas e não síndrômicas.

Amorim *et al.* (2004), analisando a expressão de tenascina, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV em TOQSGs e TOQEs, encontraram que todos os TOQSGs apresentaram imunoreatividade para a tenascina, ao passo que os TOQEs foram negativos. Em relação à imunomarcção para fibronectina, esta apresentou-se na forma de banda “descontínua” nas paredes císticas dos TOQSGs e “contínua” nos TOQEs, sugerindo um comportamento biológico mais agressivo dos TOQSGs quando comparados aos TOQEs.

Ohki *et al.* (2004), avaliaram a expressão dos marcadores SHH, PTC, SMO e GLI-1 em TOQSGs, TOQEs e em tecido gengival e observaram

imunoreatividade para todos os marcadores em todos os casos de TOQs, esporádicos ou sindrômicos, entretanto a positividade para GLI-1 nas células subepiteliais foi significativamente maior em TOQSGs quando comparado aos TOQEs. Os resultados sugerem que a via de sinalização SHH pode também estar envolvida com a etiopatogenia dos TOQEs.

Foschini *et al.* (2006) estudaram a expressão da isoforma  $\Delta N$  p63 em TOQs paraqueratinizados não recorrentes e recorrentes, TOQs ortoqueratinizados não recorrentes e TOQs paraqueratinizados associados à SG e observaram que a maior expressão de p63 no limitante epitelial (75,88%) ocorreu nos TOQs paraqueratinizados recorrentes.

González-Moles *et al.* (2006) objetivaram correlacionar a expressão imuno-histoquímica de p53 e Ki-67 com a detecção de HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em TOQSGs, cistos solitários não recorrentes, cistos solitários recorrentes e queratocistos condróides. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a marcação de Ki-67 entre TOQSGs e demais tipos de TOQs (condróide, recorrente e solitário). Além disso, não foi provada a associação do HPV na etiopatogenia dos TOQs.

Em 2006, Kolar *et al.*, avaliaram marcadores de apoptose e proliferação celular em TOQSGs, TOQEs, CDs, CRs e cistos odontogênicos sem outra especificação (COs SOE). Os TOQSGs apresentaram imunofenótipo diferente dos TOQEs, e esses por conseguinte, imunofenótipo diferente das demais lesões analisadas, confirmando o potencial biológico distinto dos TOQs.

Cavalcante *et al.* (2008) avaliaram a expressão imuno-histoquímica das MMPs 1, 7 e 26 em TOQEs e TOQSGs. Cerca de 76% dos TOQSGs apresentaram intensidade forte de marcação para MMP-1; 67% para MMP-7 e 62% para MMP-26, concluindo que a alta expressão dessas proteases pode explicar a maior agressividade dos TOQSGs.

Gurgel *et al.* (2008) analisaram a expressão dos marcadores Ki-67, p53 e p63 em TOQSGs e TOQEs e não encontraram diferenças significativas de imunomarcação nessas lesões.

Mateus *et al.* (2008) estudaram a expressão imuno-histoquímica para Ki-67 em TOQSGs, TOQEs e CDs e não encontraram diferenças significativas de imunoreatividade entre TOQEs e TOQSGs. Comparando os TOQs com os CDs, encontraram maior reatividade nos TOQs tanto esporádicos quanto

associados à SG, demonstrando que a camada epitelial dos TOQs apresenta um distinto padrão de proliferação celular, refletindo assim no seu alto *turnover* celular, reforçando sua classificação como um tumor odontogênico.

Figueroa *et al.* (2010) compararam a expressão de PCNA, p53 e Ki-67 em TOQEs e TOQSGs. As marcações para PCNA nos casos esporádicos e sindrômicos foi de 75% e 86%, respectivamente. Para Ki-67, considerando a totalidade da amostra, observaram positividade em apenas 1 caso sindrômico. Quanto à positividade para p53, ocorreu em 1 TOQSG e em 5 TOQEs (42%).

Em 2011, Mendes e colaboradores avaliaram a expressão de COX-2, p53 e Ki-67 em 18 TOQEs e 2 TOQSGs e encontraram positividade para COX-2 em 100% das lesões. A imunoreatividade para p53 foi observada em 15 TOQs (75%) enquanto a imunomarcagem para Ki-67 ocorreu em 18 TOQs (90%). Os resultados deste estudo sugerem que embora a COX-2 seja raramente usada para avaliar a atividade biológica dos TOQs, ela possa ter um papel relevante na tumorigênese, podendo ser um importante marcador relacionado com o comportamento biológico dessas lesões.

Nonaka *et al.* (2012) analisaram a imunoreatividade para os marcadores RANKL, OPG, CD-34 e AML em 22 TOQSGs, 22 TOQEPs, 8 TOQERs e não encontraram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos marcadores, sugerindo que a diferença do comportamento biológico entre TOQEs e TOQSGs pode não estar relacionada com a expressão desses marcadores.

Kadlub *et al.* (2013) avaliaram a imunoreatividade para Ki-67 em 5 TOQSGs e 11 TOQEs. A imunopositividade para Ki-67 foi detectada nas células suprabasais em 35,5% dos casos e em 3% dos casos nas células do estroma de todos os TOQs, sugerindo que fatores genéticos podem interagir impulsionando o desenvolvimento de tumores.

Em 2014, Hong e colaboradores, analisaram a expressão imunohistoquímica para vimentina, CK AE3, CK17 e CK19 em 8 TOQEs e 8 TOQSGs e observaram que os fibroblastos apresentaram características distintas nos TOQSGs, o que pode explicar sua maior agressividade.

Ramos *et al.* (2014) estudaram a imunoreatividade para MMPs 1, 2 e 9 além de Ki-67 e AML em 11 TOQEs, 12 TOQSG e 6 folículos pericoronários. Os resultados mostraram que os TOQs apresentaram imunoreatividade para

Ki-67 principalmente nas camadas suprabasais do epitélio. Houve também positividade para MMP-1 e 2 em 100% dos casos de TOQs. Já a expressão de MMP-9 ocorreu em 100% dos casos de TOQs, embora em baixa intensidade, quando comparada às demais MMPs. A imunopositividade para AML foi observada em todos os casos de TOQs, estando confinada às células estromais. Estes dados sugerem que as MMPs supracitadas apresentam importante papel na patogênese dos TOQs. O aumento da atividade proliferativa dos TOQs também foi associada com a produção elevada de MMP-1 no parênquima, possivelmente influenciando no crescimento da lesão pelo aumento de número de miofibroblastos.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 AMOSTRA

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sob o nº de parecer 898.505 (Anexo). Foram selecionados 38 TOQs primários, dos quais 30 TOQSGs e 8 TOQEs, provenientes de instituições nacionais e do exterior, conforme mostra a Tabela 3. Foram incluídos os casos em que o bloco apresentava-se em bom estado de conservação e com quantidade suficiente de material representativo da lesão. Os 30 casos de TOQSGs foram provenientes de 12 pacientes, dos quais 3 pacientes apresentaram 3 lesões cada; 2 pacientes 4 lesões cada; 1 paciente 6 lesões; 1 paciente 2 lesões e 5 pacientes uma lesão cada. A partir da seleção inicial, todos os casos foram revisados histopatologicamente de acordo com os critérios de classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde (Barnes *et al.* 2005).

**Tabela 3** – Origem e número da amostra utilizada no presente trabalho.

<i>Origem</i>	<i>Número de pacientes/número de TOQSG</i>	<i>Número de pacientes/número de TOQEs</i>
<i>Centro Clínico de Cabeza y Cuello, Guatemala</i>	8/21	--
FOP/UNICAMP, Brasil	1/3	8/8
UNIOESTE, Brasil	1/4	--
UFRJ, Brasil	2/2	--
Total	30	8

\*Centro Clínico de Cabeça e Pescoço (Cidade da Guatemala, Guatemala); FOP/UNICAMP, Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas; UFRJ, Departamento de Patologia e Diagnóstico Oral da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A partir dos registros laboratoriais e dos prontuários dos casos selecionados foram coletados dados relativos ao gênero, idade no diagnóstico, localização anatômica e padrão radiográfico das lesões.

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Para todos os casos, foram realizados cortes de 5µm em micrótomo semi-automático (Hestion ERM 3000, Daintree Scientific<sup>®</sup>, St. Helens, Austrália) que foram montados em lâminas histológicas e corados pela técnica histoquímica de Hematoxilina e Eosina (HE). A análise microscópica dos cortes histológicos foi realizada por um único examinador previamente calibrado com auxílio de um microscópio óptico de luz (Leica DM500, Leica Microsystems<sup>®</sup>, Switzerland) e pesquisadas, pela totalidade dos cortes, às seguintes características histopatológicas: presença ou não de ilhas epiteliais; brotamento epitelial; cistos satélites; inflamação; pleomorfismo celular; áreas ameloblastomatosas e a presença de ortoqueratina.

## 5.3 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

As reações imuno-histoquímicas seguiram a metodologia descrita por Rumayor *et al.* (2014). Foram obtidos cortes de 3µm de espessura que foram montados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, EUA). Os cortes foram desparafinizados através de duas trocas de xilol por 10 minutos cada, em temperatura ambiente, seguidas de hidratação em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%), e posterior lavagem em água corrente e destilada.

A recuperação antigênica foi feita através da imersão das lâminas em solução de tampão citrato a 10 mM (pH 6,0) em panela de pressão (Eterna, Nigro Alumínio LTDA), por um ciclo de 3 minutos sob pressão. Após 20 minutos

de resfriamento do líquido em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água corrente e destilada, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 volumes) por 25 minutos através de cinco incubações de cinco minutos cada, após as quais os cortes foram lavados em água corrente e colocados em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS: *phosphate-buffered saline*). Os anticorpos primários foram diluídos em albumina sérica bovina (BSA) a 1% e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) a 0,1% em PBS e o cortes incubados com os anticorpos primários (listados na Tabela 4) em câmara úmida, por 16 horas a 4°C.

**Tabela 4** – Relação dos anticorpos primários utilizados no presente trabalho.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Titulação</i>	<i>Fabricante</i>
p53	DO-7	1:300	Dako®, Via Real Carpinteria, CA
p63	4A4	1:300	Dako®, Via Real Carpinteria, CA
Ki-67	MIB-1	1:100	Dako®, Via Real Carpinteria, CA
AML	1A4	1:400	Dako®, Via Real Carpinteria, CA
CD138	MI15	1:100	Dako®, Via Real Carpinteria, CA

A seguir, os cortes foram lavados com três trocas de PBS e o anticorpo secundário conjugado à biotina foi então adicionado (LSAB, Dako, EUA), durante trinta minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram novamente lavados em PBS (3 trocas) e expostos ao complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako, EUA) por mais 30 minutos a 37°. Em seguida, após três lavagens com PBS, as reações foram evidenciadas com solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB) a 0,06% (Sigma, EUA) em PBS contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA) por cinco minutos a 37°C. Os cortes foram lavados em água corrente e contracolorados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos. Seguindo-se nova lavagem com água corrente para eliminar os excessos do corante, os cortes foram desidratados em três trocas de álcool absoluto, diafanizados em xilol e finalmente montados com Bálsamo do Canadá. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos (carcinoma espinocelular para Ki-67, p53; tecido endometrial para

AML; hiperplasia fibrosa para p63 e CD138) e por controles negativos, pela omissão do anticorpo primário.

#### **5.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA**

A análise imuno-histoquímica foi feita por um único examinador previamente calibrado, com auxílio de microscópio óptico de luz (Leica DM500, Leica Microsystems<sup>®</sup>, Switzerland) acoplado à câmera digital (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems<sup>®</sup>, Switzerland) e software LAS versão 4.2.0. (Leica Microsystems<sup>®</sup>, Switzerland). Além da análise descritiva do padrão de marcação de todos os anticorpos, foi realizada análise semi-quantitativa de p53, p63 e Ki-67 por meio da contagem das células positivas em todos os estratos epiteliais do revestimento cístico em 10 campos randomizados (aumento de 1000x). A avaliação semi-quantitativa do AML foi feita pela contagem de células positivas na porção subepitelial do tecido conjuntivo em 10 campos randomizados (aumento de 400x), excluindo as células circundantes aos vasos sanguíneos. Já para o anticorpo CD138, foi avaliada a expressão em 10 campos randomizados, com o aumento de 400x. A avaliação do epitélio cístico foi feita por estrato epitelial, isto é considerando 3 estratos (basal, suprabasal e superficial), de acordo com o seguinte escore: 0 (ausência de expressão); +1 (expressão fraca); +2 (expressão forte). Foram avaliadas também, quando presentes, por meio deste mesmo escore, as seguintes estruturas: cistos satélites, ilhas epiteliais e brotamentos epiteliais. A avaliação da marcação de células estromais por CD138 no tecido conjuntivo subepitelial foi realizada do mesmo modo que para AML. Os métodos de análise dos marcadores utilizados encontram-se descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** – Métodos de análise dos imunomarcadores utilizados.

<i>Marcador</i>	<i>Critério de análise</i>	<i>Descrição</i>
p53	Frequência relativa	Células reativas/nº total de células do campo
p63	Frequência relativa	Células reativas/nº total de células do campo
Ki-67	Frequência relativa	Células reativas/nº total de células do campo
AML	Frequência absoluta	nº de células reativas por campo
CD138	Escore e frequência absoluta	Expressão: ausente(0), fraca (+1) e forte (+2) e nº de células reativas por campo

## 5.5 COLETA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados e armazenados em planilhas do Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office, 2010). Para checar a normalidade das variáveis quantitativas da amostra foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados clínicos foi aplicado o teste de Qui-Quadrado para Independência apenas para a variável “gênero”, seguido do teste de acompanhamento de Resíduos Ajustados. Para as variáveis “localização anatômica” e “padrão radiográfico” foi aplicado o teste de Qui-Quadrado para K proporções, seguido do teste de Marascuilo. Para a análise das características histopatológicas foi aplicado o teste do Qui-Quadrado para K proporções, seguido do teste de acompanhamento de Marascuilo. Para a comparação dos dados imuno-histoquímicos (p63, Ki-67 e AML) entre os grupos estudados foi realizado o teste t para amostras independentes, após a verificação da homocedasticidade pelo teste F. Já para o marcador p53, foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para a análise do CD138 para estruturas epiteliais foi aplicado o teste de Qui-Quadrado para Independência, seguido do teste de acompanhamento de Resíduos Ajustados e para a análise estromal o teste t para amostras independentes. O nível de significância assumido foi de  $p \leq 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software XLSTAT (Addinsoft<sup>®</sup>, 2015 – França - Paris).

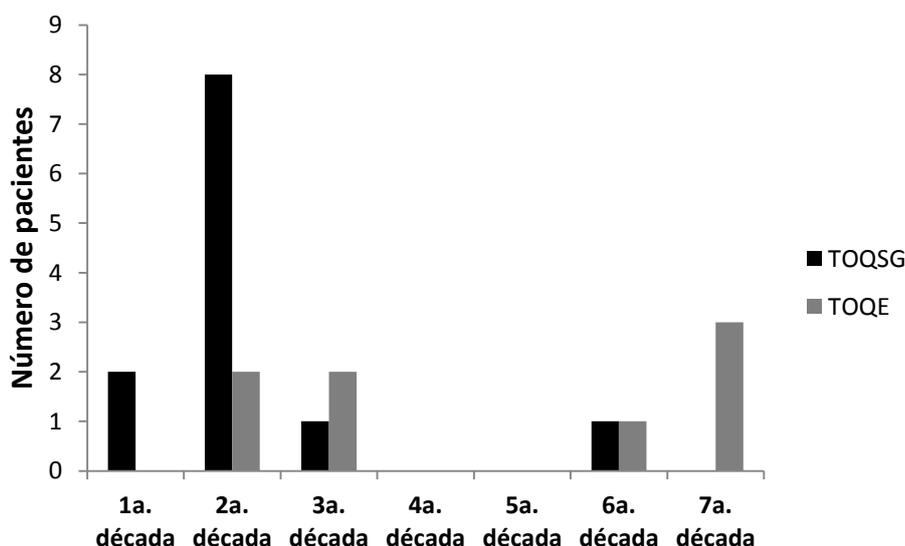
## 6 RESULTADOS

### 6.1 DADOS CLÍNICOS

Trinta casos de TOQSGs afetaram 12 pacientes com SG, 5 do gênero feminino (41,66%) e 7 do gênero masculino (58,33%), ao passo que no grupo dos TOQEs, 5 casos (62,50%) acometeram o gênero feminino e 3 o masculino (37,50%).

Considerando os 12 pacientes portadores de TOQSGs, 7 (58,33%) apresentaram mais de uma lesão ao longo da vida, sendo que 1 paciente tinha 4 lesões sincrônicas, 4 pacientes apresentaram 3 lesões sincrônicas e 2 pacientes apresentaram 2 lesões sincrônicas.

Quanto à idade no momento do diagnóstico, houve variação de 9 meses a 59 anos, com média de 16,81 anos  $\pm$  14,66. Já os pacientes com TOQEs apresentaram variação da idade de 13 a 69 anos, com média de 41 anos  $\pm$  39,59. Dez (83,33%) dos 12 pacientes portadores de TOQSG desenvolveram lesões nas primeiras duas décadas de vida, enquanto 4 (50%) dos 8 pacientes com TOQEs encontraram-se na segunda e terceira décadas e outros 4 pacientes (50%) na sexta e sétimas décadas (Figura 2).



**Figura 2** – Distribuição dos pacientes com TOQs de acordo com a década de vida no momento do diagnóstico.

Quanto à localização anatômica, dos 30 casos de TOQSGs, 13 ocorreram em maxila (43,33%) e 17 em mandíbula (56,66%). Dos 30 TOQSGs, foi possível obter informações mais detalhadas quanto à localização em 22 casos, dos quais 12 lesões (54%) localizaram-se em região posterior de mandíbula, 6 lesões (27%) em região posterior de maxila, 3 (13%) em região anterior de maxila e 1 (4%) em região anterior de mandíbula. Já dos 8 casos de TOQEs, 3 lesões (37,50%) acometeram a maxila e 5 (62,50%) a mandíbula.

As informações quanto ao padrão radiográfico estavam disponíveis em 19 dos 30 TOQSGs, dos quais 14 lesões (73,68%) apresentaram padrão radiolúcido unilocular e 5 (26,31%) o padrão radiolúcido multilocular. No grupo dos TOQEs, o padrão radiográfico radiolúcido unilocular ocorreu em 100% dos casos. Não houve diferença estatística significativa para as variáveis “gênero” e “localização anatômica” entre os grupos sindrômico e esporádico.

Todos os resultados relativos aos dados clínicos dos TOQSGs e TOQEs encontram-se descritos na Tabela 6.

**Tabela 6** – Análise dos dados clínicos dos TOQs.

	Gênero <sup>#</sup>		Localização anatômica		Padrão radiográfico <sup>+</sup>	
	n=20		n=38		n=27	
	Fem	Masc	Maxila	Mandíbula	Unilocular	Multilocular
<b>TOQSG</b>	5 (41,66%)	7 (58,33%)	13 (43,33%)	17 (56,66%)	14 (73,68%)	5 (26,31%)
<b>TOQE</b>	5 (62,50%)	3 (37,50%)	3 (37,50%)	5 (62,50%)	8 (100%)	0 (0%)
<i>p valor</i>	0,655		0,767	0,767	0,108	0,108

\*Nível de significância  $p \leq 0,05$ ;

<sup>#</sup>Para fins de cálculo de porcentagem e *p valor* relativo ao gênero, foi considerado o número de pacientes (8 pacientes portadores de TOQEs e 12 pacientes com TOQSG);

<sup>+</sup>Para fins de cálculo de porcentagem e *p valor* relativo ao padrão radiográfico, foram considerados os casos com informações disponíveis (8 TOQEs e 19 TOQSGs).

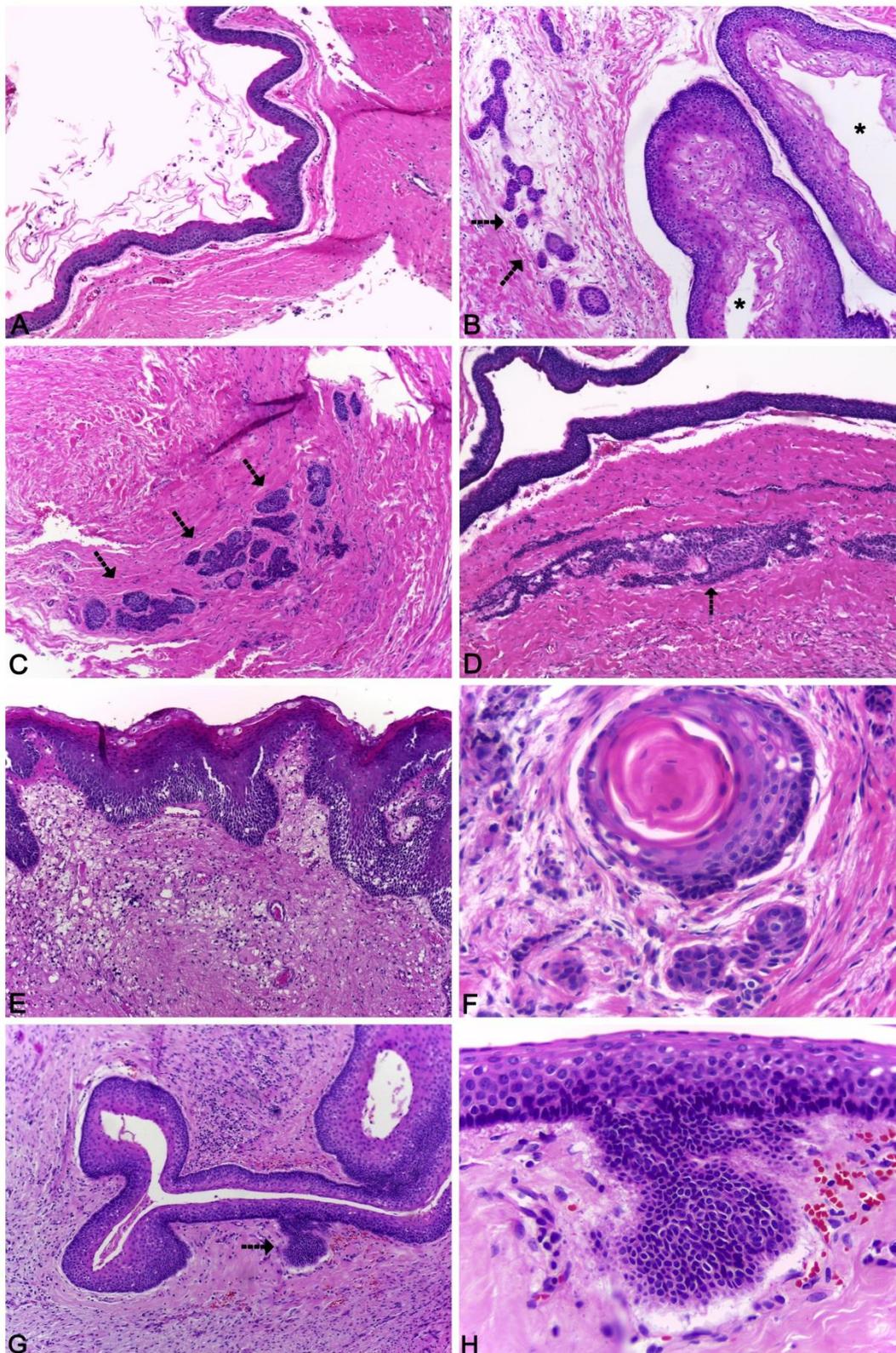
## 6.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os 30 TOQSGs apresentaram-se como cavidades císticas revestidas por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado com espessura variável de 5 à 8 camadas de células justapostas e com a camada córnea superficial corrugada. A camada basal do epitélio apresentou-se composta por células cúbicas e/ou colunares dispostas em paliçada. Notaram-se brotamentos epiteliais para o interior da cápsula, bem como áreas epiteliais modificadas pela inflamação e na maioria dos casos analisados, observou-se o destacamento epitelial da cápsula. Além disso, foi identificada a presença de filamentos de queratina no lúmen em algumas amostras. A cápsula cística, composta por tecido conjuntivo fibrovascular, apresentou-se em alguns casos, com inflamação crônica; proliferação fibroangioblástica; áreas contendo macrófagos espumosos, além de cistos satélites, áreas ameloblastomatosas e ilhas epiteliais. Na Tabela 7, encontra-se a ocorrência das características histopatológicas observadas nos grupos estudados, e como pode ser verificado, a presença de ilhas epiteliais, cistos satélites e pleomorfismo celular foram mais freqüentes nos TOQSGs que nos TOQEs. Entretanto, apenas o pleomorfismo celular mostrou diferença estatística significativa entre os grupos analisados ( $p=0,042$ ). Em apenas 1 caso de TOQSG, observou-se o epitélio cístico paraqueratinizado associado a uma área focal de ortoqueratina. Não se observou diferença nas demais características entre os grupos. Imagens microscópicas representativas das características histopatológicas encontram-se na Figura 3.

**Tabela 7** – Ocorrência de características histopatológicas nos TOQSGs e TOQEs.

<i>Características Histopatológicas</i>	<i>TOQSGs (n=30)</i>	<i>TOQEs (n=8)</i>	<i>p valor</i>
<b>Ilhas epiteliais</b>	15 (50%)	3 (37,50%)	0,529
<b>Brotamentos epiteliais</b>	16 (53,33%)	6 (75%)	0,270
<b>Cistos satélites</b>	14 (46,66%)	2 (25%)	0,270
<b>Ortoqueratina</b>	1 (3%)	0	0,601
<b>Pleomorfismo celular</b>	11 (36,66%)	0	0,042*
<b>Inflamação</b>	22 (73,33%)	6 (75%)	0,924
<b>Áreas ameloblastomatosas</b>	2 (6,66%)	0	0,453

\*Nível de significância  $p \leq 0,05$ .



**Figura 3** - Características histopatológicas dos TOQSGs. A, Epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado e presença de filamentos de queratina no lúmen cístico. B, Ilhas epiteliais na cápsula cística (setas) e cistos satélites (\*). C, Ilhas epiteliais (setas). D, Revestimento epitelial cístico (acima) e ilhas epiteliais com características ameloblastomatosas no interior da cápsula cística (seta). E, Epitélio cístico apresentando displasia epitelial. F, Ilhas epiteliais no interior da cápsula cística. G, Epitélio cístico apresentando área de brotamento epitelial (seta). H, Maior aumento do brotamento epitelial mostrado na imagem G. (H&E; A, B, C, D, E e G: 100x, F e H: 400x).

### 6.3 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todos os casos de TOQs esporádicos foram negativos para p53 em todos os estratos epiteliais, enquanto observou-se marcação nuclear em  $13,84\% \pm 0,08\%$  das células nos estratos basal e suprabasal do epitélio cístico dos TOQSGs. Além disso, em 6 casos de TOQSGs notou-se maior reatividade em áreas em que o epitélio estava modificado pela inflamação, entretanto essas áreas foram desconsideradas para a análise estatística.

Quanto à imunoreatividade para Ki-67 em ambos os grupos observou-se marcação nuclear nos estratos basal e suprabasal, com exceção do estrato superficial. Para ambos os grupos, a marcação nuclear ocorreu predominantemente no estrato suprabasal, apresentando ocasional positividade nuclear no estrato epitelial basal. A porcentagem média de células positivas para Ki-67 foi de  $11\% \pm 7\%$  para os TOQSGs e de  $15\% \pm 5\%$  para os TOQEs. Entretanto, não se observou diferença estatística significativa entre os grupos.

O marcador p63 mostrou-se reativo em toda a amostra, tanto no grupo síndrômico como no esporádico. Nos TOQSGs observou-se marcação nuclear nos estratos basal e suprabasal do epitélio, excetuando-se o estrato superficial. Já nos TOQEs a marcação ocorreu predominantemente na camada suprabasal do epitélio cístico, excetuando-se a camada superficial. O grupo dos TOQSGs apresentou maior índice de positividade celular ( $58\% \pm 14\%$ ) em comparação aos TOQEs ( $44\% \pm 13\%$ ), com valor de  $p=0,016$ .

Para ambos os grupos, observou-se imunoreatividade para AML na cápsula cística tanto na porção subepitelial como nas camadas mais profundas. A média da positividade celular no tecido conjuntivo subepitelial dos TOQSGs foi de  $16,8\% \pm 10,76\%$ , enquanto dos TOQEs foi de  $7\% \pm 5,26\%$ .

Todas as médias de positividade celular, encontradas para todos os anticorpos, encontram-se na Tabela 8 e a Figura 4 traz imagens representativas das reações imuno-histoquímicas realizadas.

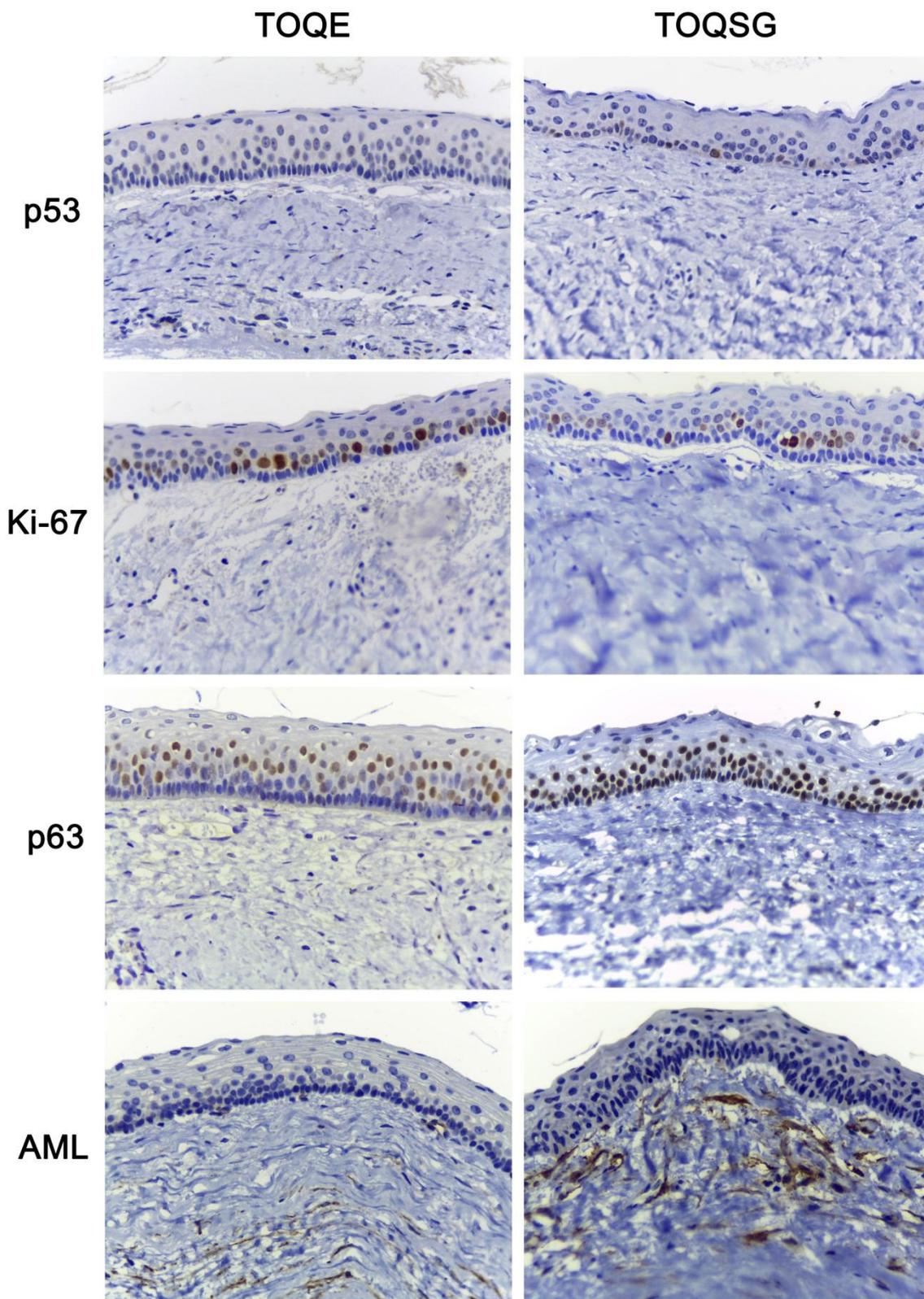
**Tabela 8** – Análise imuno-histoquímica qualitativa e semi-quantitativa para p53, Ki-67, p63 e AML nos TOQs.

	<i>Avaliação qualitativa</i>		<i>TOQSGs</i>		<i>TOQEs</i>		<i>p valor</i>
	<i>TOQSG</i>	<i>TOQE</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	
<b>p53**</b>	Basal e suprabasal	Ausente	13,84%	± 0,08%	0	0	<0,0001*
<b>Ki-67***</b>	Suprabasal predominante	Suprabasal predominante	11%	± 7%	15%	± 5%	0,114
<b>p63***</b>	Basal e suprabasal	Suprabasal predominante	58%	±14%	44%	± 13%	0,016*
<b>AML***</b>	Tecido conjuntivo subepitelial e profundo	Tecido conjuntivo subepitelial e profundo	16,86	±10,76	5,4	± 2,26	0,151

\*Nível de significância  $p \leq 0,05$ ;

\*\*Teste não paramétrico de Mann Whitney;

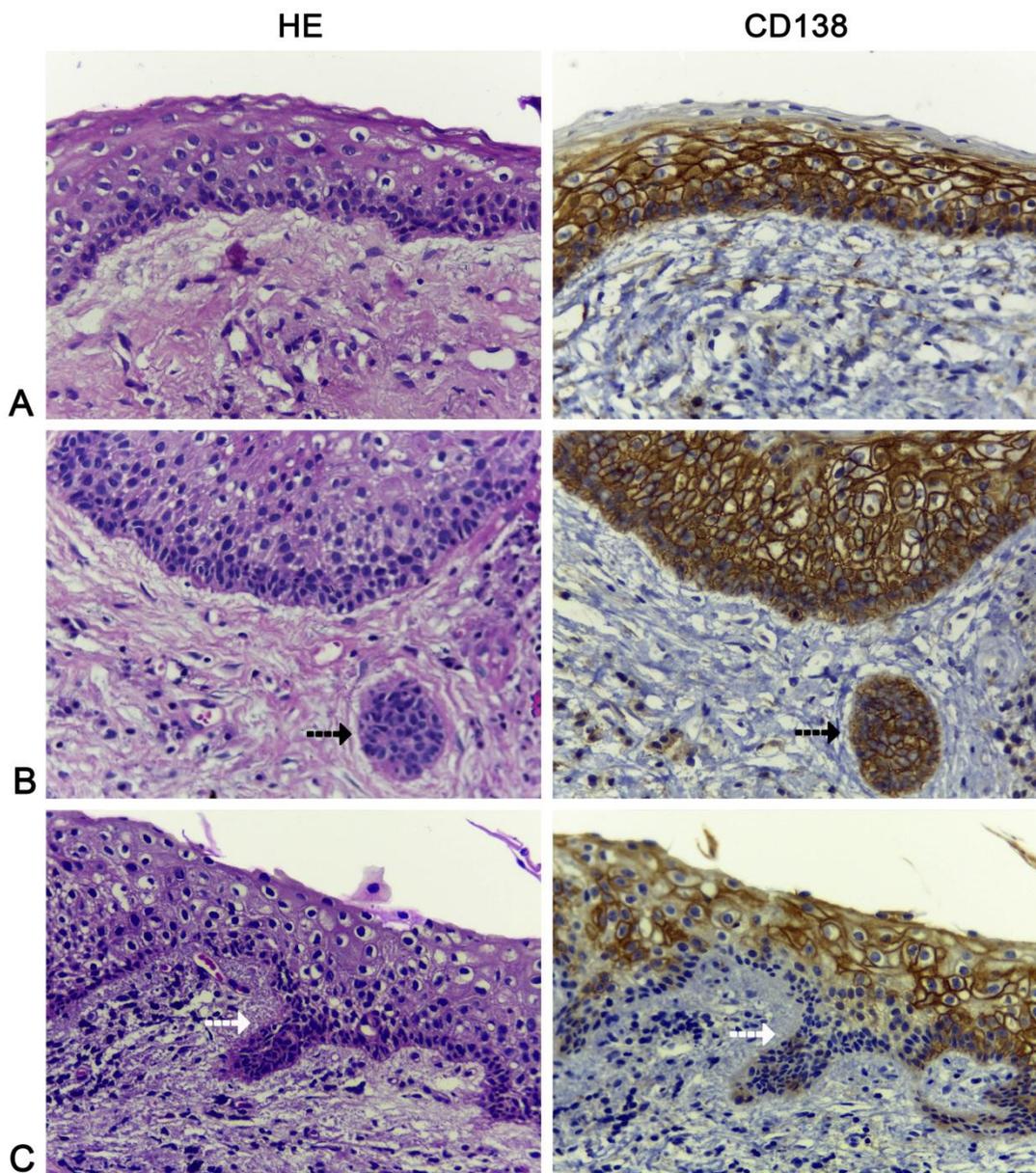
\*\*\*Teste t para amostras independentes.



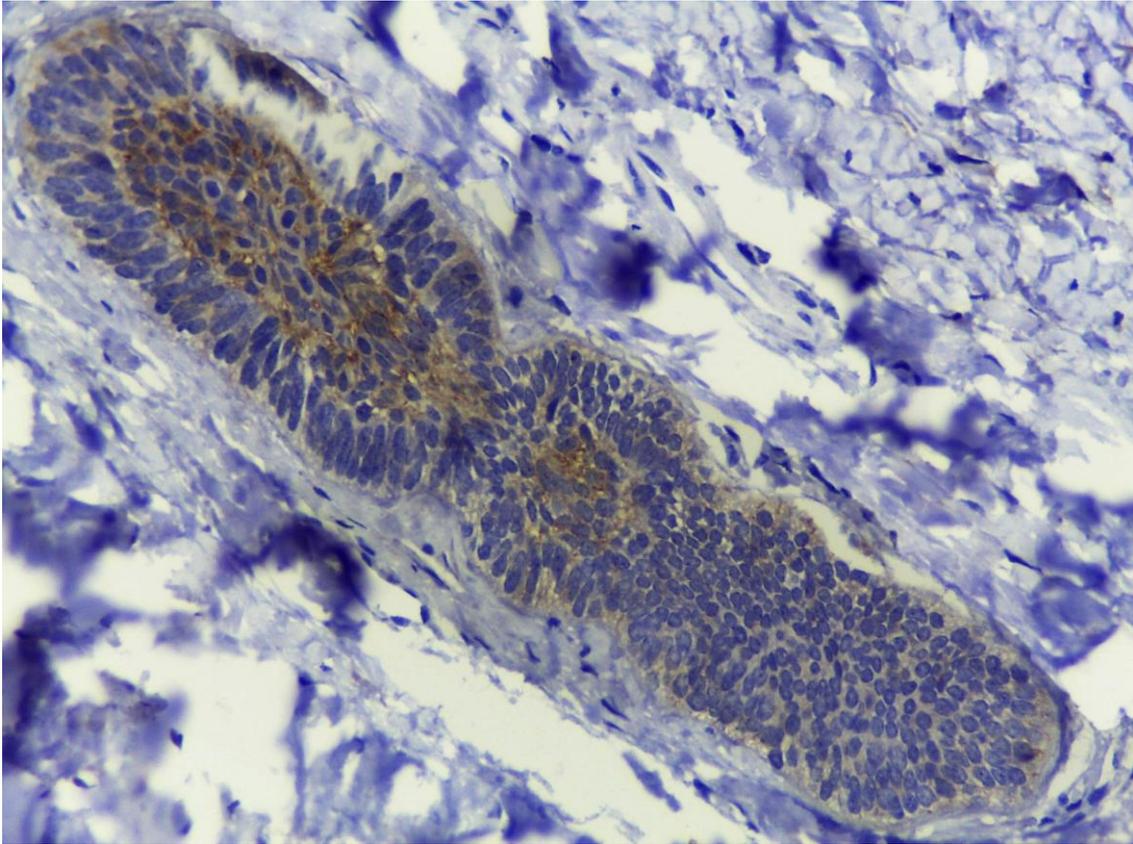
**Figura 4** – Reações imuno-histoquímicas para p53, Ki-67, p63 e AML em TOQs. Expressão negativa para p53 em TOQE e discreta positividade em TOQSG. Expressão predominantemente suprabasal para Ki-67 em TOQE e TOQSG. Expressão de p63 nas camadas basal e suprabasal em TOQSGs e predominantemente suprabasal no TOQEs. Note a maior expressão de p63 no grupo de TOQSG em relação ao TOQE. Expressão de AML no tecido conjuntivo subepitelial. (Imuno-histoquímica; 400x).

Quanto à análise qualitativa do padrão de marcação para CD138, foi observada positividade predominante no tecido epitelial, apesar de haver reatividade difusa no tecido conjuntivo. Todos os estratos epiteliais (basal, suprabasal e superficial), cistos satélites, ilhas epiteliais e brotamentos epiteliais apresentaram positividade, embora com graus variados de intensidade (Figura 5). No tecido conjuntivo, evidenciou-se a marcação de células fusiformes de modo difuso, assim como em campos com intenso infiltrado inflamatório, que por sua vez foram descartados da análise. Em alguns TOQSGs e TOQEs observou-se reatividade no estrato superficial, no entanto de intensidade fraca, enquanto o estrato suprabasal apresentou marcação forte na maioria dos campos avaliados. Já o estrato basal mostrou variação na intensidade de marcação, sendo inversamente proporcional ao grau de celularidade e atipia celular. Ainda neste contexto, observou-se que alguns brotamentos epiteliais apresentaram intensidade fraca ou ausência de reatividade. Já as ilhas epiteliais e cistos satélites apresentaram reatividade similar à do revestimento cístico, com exceção de um cisto satélite que se apresentou não reativo em um dos casos de TOQSG. Quanto às ilhas com alterações ameloblastomatosas, presentes apenas nos TOQSGs, notou-se que o centro das ilhas apresentou positividade, ao passo que a periferia mostrou ausência de reatividade, como mostra a figura 6.

Quanto à análise da marcação das estruturas epiteliais por CD138, observou-se que na maior parte dos campos analisados, tanto dos TOQSGs como TOQEs, o estrato basal e suprabasal mostraram-se intensamente marcados. Já o estrato superficial mostrou-se negativo na maior parte dos TOQSGs e negativo ou fraco nos TOQEs. Entretanto, como mostra a Tabela 9, interessantes diferenças estatisticamente significantes foram verificadas. Observou-se que uma porcentagem maior de TOQSGs apresentou ausência de marcação no estrato basal do que os TOQEs. Além disso, em uma porcentagem maior de campos, o estrato suprabasal dos TOQEs mostrou marcação mais intensa (score +2) em relação aos TOQSGs. Quanto às ilhas epiteliais e cistos satélites, a marcação parece ser similar ao observado no epitélio cístico.



**Figura 5**– Expressão de CD138 nas estruturas epiteliais de TOQSGs. Em A, observa-se o padrão de marcação de membrana dos estratos epiteliais basal e suprabasal (escore +2) e ausência de marcação no estrato superficial. Em B, nota-se que o padrão de marcação de uma ilha epitelial é similar ao observado no limitante epitelial. Em C, observa-se a ausência de marcação em área de brotamento epitelial. (H&E e Imuno-histoquímica; 400x).



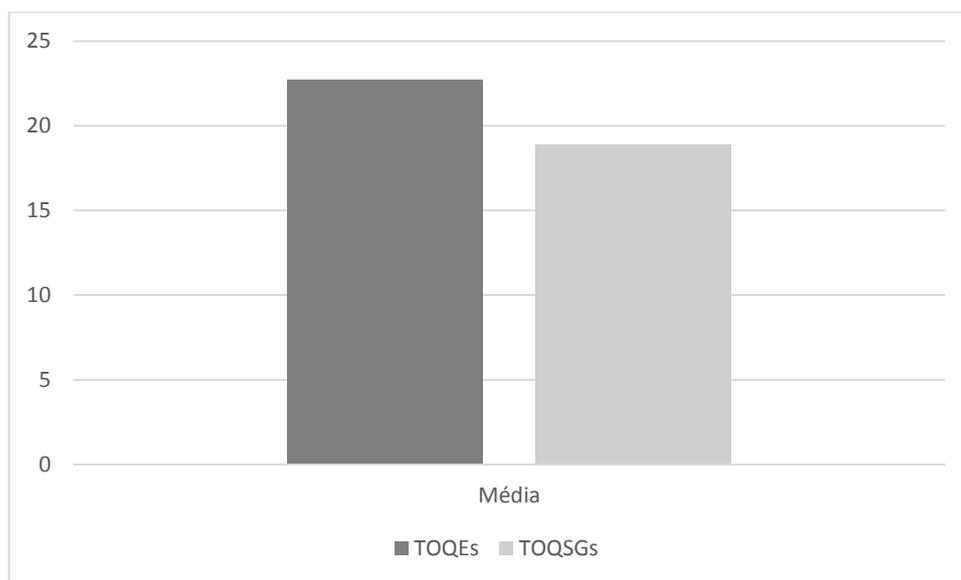
**Figura 6** – Expressão de CD138 em ilha epitelial com característica ameloblastomatosa em um caso de TOQSG. Note a disposição em paliçada das células colunares periféricas e a ausência de imunoreatividade. Por outro lado, observa-se positividade na área central da ilha epitelial (Imuno-histoquímica; 400x).

**Tabela 9** – Análise imuno-histoquímica semi-quantitativa comparativa de CD138 entre TOQSGs e TOQEs, considerando as estruturas epiteliais e os escores avaliados.

<i>Estruturas epiteliais</i>	<i>Número de campos</i>	<i>Escore 0</i>	<i>Escore+1</i>	<i>Escore +2</i>	<i>p valor</i>
<b>Estrato basal</b>	TOQSG (n=299)	40 (13%) <sup>a</sup>	93 (31%)	166 (56%)	0,005*
	TOQE (n=80)	1 (2%) <sup>b</sup>	33 (41%)	46 (57%)	
<b>Estrato suprabasal</b>	TOQSG (n=299)	14 (5%)	80 (27%) <sup>a</sup>	198 (66%) <sup>b</sup>	0,000*
	TOQE (n=80)	0 (0%)	8 (10%) <sup>b</sup>	72 (90%) <sup>a</sup>	
<b>Estrato superficial</b>	TOQSG (n=272)	207 (76%) <sup>a</sup>	68 (25%) <sup>b</sup>	7 (3%)	0,000*
	TOQE (n=80)	42 (52,5%) <sup>b</sup>	38 (47,5%) <sup>a</sup>	0 (0%)	
<b>Ilhas epiteliais</b>	TOQSG (n=30)	0 (0%)	4 (13%)	26 (87%)	0,143
	TOQE (n=5)	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)	
<b>Cistos satélites</b>	TOQSG (n=12)	1 (8%)	0 (0%)	11 (92%)	0,672
	TOQE (n=2)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
<b>Brotamentos epiteliais</b>	TOQSG (n=108)	9 (8%)	44 (41%)	55 (51%)	0,677
	TOQE (n=3)	0 (0%)	2 (67%)	1 (33%)	

\*Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos.

Quanto à análise da marcação estromal para CD138, observou-se uma tendência à marcação de um maior número de células nos TOQEs (22,67%  $\pm$  13,47%) que nos TOQSGs (18,84%  $\pm$  13,33%), embora sem significância estatística ( $p=0,507$ ), conforme pode ser observado na Figura 7.



**Figura 7** – Análise semi-quantitativa da marcação de células estromais para CD138, de acordo com teste t para amostras independentes.

## 7 DISCUSSÃO

Estudos prévios sugerem que tumores odontogênicos queratocísticos, tanto esporádicos como associados à SG compartilham da mesma patogênese, a qual é associada a mutações no gene *PATCHED-1*, com consequente ativação anômala da via de sinalização SHH (Sun *et al.*, 2008). Apesar desta afirmação, os TOQSGs apresentam alto potencial de crescimento, infiltração, recorrência e tendem a ocorrer na forma de múltiplas lesões quando comparados aos TOQs esporádicos. Por consequência disso, pesquisas sustentam a existência de um comportamento biológico distinto entre as duas lesões. Estudos que avaliam a expressão de proteínas associadas à atividade proliferativa do epitélio, bem como sua relação com o estroma, têm sido realizados a fim de demonstrar o potencial neoplásico dessas lesões (Kimi *et al.*, 2001; Shear, 2002; Manfredi *et al.*, 2004; Kolar *et al.*, 2006).

O presente trabalho apresentou uma casuística de 38 TOQs, dos quais 30 associados à SG, o que constitui até o presente momento, a maior casuística de análises imuno-histoquímicas envolvendo TOQSGs. Alguns trabalhos propuseram-se a realizar diferentes análises comparativas entre TOQSGs e TOQEs (El Mutardi *et al.*, 1996; Lo Muzio *et al.*, 1998; Amorim *et al.*, 2004; Ohki *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2008; Gurgel *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2011; Nonaka *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014); ao passo que outros realizaram estudos entre TOQs, incluindo TOQSGs, e outras lesões de origem odontogênica (González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2006). No estudo de González-Moles *et al.* (2006) foram incluídas 83 lesões odontogênicas na totalidade, das quais 29 correspondiam a TOQSGs, constituindo a segunda maior casuística de análises imuno-histoquímicas envolvendo casos de TOQs sindrômicos até o presente momento. Entretanto, a maior casuística de TOQSGs, embora abrangendo apenas aspectos clínicos e histopatológicos foi a de Woolgar *et al.* (1987) que reuniu 164 QOs associados à SG provenientes de 60 pacientes e 379 QOs esporádicos não recorrentes.

A média de idade no momento do diagnóstico dos 12 pacientes portadores da SG do presente estudo foi de 16,81 anos, o que se aproxima da

análise de Kimonis *et al.* (1997), Amorim *et al.* (2004) e González-Alva *et al.* (2008), que encontraram como média de idade: 17,1; 15,2 e 19,5 anos, respectivamente. Já no grupo dos TOQEs, a média de idade foi maior (41 anos). Estes dados são similares ao estudo de Jones *et al.* (2006), no qual a média de idade foi de 41,3 anos, entretanto diferem do estudo de Amorim *et al.* (2004), no qual a média de idade dos portadores de lesões esporádicas foi de 19,8 anos. Ainda com relação à idade, este estudo demonstrou que 83,33% dos TOQSGs desenvolveram-se em indivíduos pertencentes à primeira e segunda décadas de vida, de modo similar às análises de Ahn *et al.* (2004) e Oda *et al.* (1999), em que o pico de incidência também esteve entre a primeira e segunda décadas de vida. No grupo das lesões esporádicas, verificou-se um padrão bimodal de distribuição, com 50% das lesões ocorrendo na segunda e terceira décadas e outros 50% na sexta e sétima décadas de vida, o que está de acordo com os achados de Oda *et al.* (1999), Jones *et al.* (2006) e Mendes *et al.* (2011) que demonstraram o mesmo padrão bimodal.

Neste estudo, dos 12 pacientes com SG, 7 pacientes (58,33%) apresentaram mais de uma lesão ao longo da vida. Entretanto, 4 dos 5 pacientes com lesões únicas, apresentaram no momento da primeira biópsia, idade inferior ou igual a 13 anos, o que se pode presumir que o desenvolvimento de outras lesões ainda possa ocorrer ao longo da vida. No trabalho de Woolgar *et al.* (1987), 55 (91,66%) dos 60 pacientes portadores da SG, apresentaram 2 ou mais TOQs ao longo da vida.

Ainda referente aos 12 pacientes portadores da SG do presente trabalho, 7 (58,33%) pertenceram ao gênero masculino e 5 (41,66%) ao feminino. Já no estudo de González-Alva *et al.* (2008) foi observada uma maior prevalência no gênero feminino (63,6%). Para o grupo dos TOQEs do presente trabalho, 5 casos (62,50%) ocorreram no gênero feminino e 3 (37,50%) no masculino, o que também difere da pesquisa de Zhao *et al.* (2002) que em uma série de 489 lesões advindas de 484 pacientes não portadores da SG, houve o predomínio do gênero masculino em 65,91% da amostra.

Anatomicamente, a maior parte tanto dos TOQSGs como dos TOEs do presente estudo, acometeu a mandíbula (56,66% e 62,50% respectivamente). Além disso, em 22 dos 30 TOQSGs foi possível obter dados mais detalhados quanto à localização, dos quais 12 lesões (54%) localizaram-se em região

posterior de mandíbula e 1 (4%) em região anterior de mandíbula. Estes dados se assemelham a outros encontrados na literatura como no trabalho de Woolgar *et al.* (1987) em que o osso mandibular, mais especificamente a região posterior, foi a mais afetada em 66% dos TOQSGs. Dados similares aos de outros estudos que encontraram as seguintes porcentagens de acometimento mandibular: 70,5% do total de sua amostra que incluiu TOQs esporádicos e sindrômicos (González-Alva *et al.*, 2008); 90% dos TOQEs e 80% dos TOQSGs (Amorim *et al.*, 2004); 85% da amostra de TOQs esporádicos e sindrômicos (Mendes *et al.*, 2011) e em 80% dos TOQs esporádicos e 70% dos sindrômicos (Kadlub *et al.*, 2013).

Em relação ao padrão radiográfico dos TOQs do presente estudo, o padrão radiolúcido unilocular foi observado em 73,68% dos TOQSGs com informações disponíveis e em 100% dos TOQEs. A maior parte dos autores relata que a maioria dos TOQs também exibem o padrão unilocular (Zhao *et al.*, 2004; Chirapathomsaku *et al.*, 2006; Titinchi *et al.*, 2012).

Embora escassas, encontram-se na literatura análises relativas às características histopatológicas dos TOQs e que se propõem a comparar TOQs sindrômicos e esporádicos. O presente trabalho se propôs a avaliar e quantificar as características histopatológicas passíveis de serem encontradas em TOQs, assim como compará-las entre os dois grupos. De todas as características histopatológicas pesquisadas, observou-se que o pleomorfismo celular mostrou-se estatisticamente mais frequente nos TOQSGs que nos TOEs. Além disso, embora não estatisticamente significante, cistos satélites, ilhas epiteliais e áreas com características ameloblastomatosas ao longo da cápsula cística, parecem ser mais frequentes nos casos sindrômicos. Em 1972, Payne comparou os achados histopatológicos de TOQs, incluindo casos recorrentes, não recorrentes e associados à SG, a outras lesões císticas não queratinizadas e demonstrou que a presença de cistos satélites, ilhas epiteliais e inflamação foi mais frequente nos casos associados à SG. Adicionalmente, Woolgar *et al.* (1987) apresentaram a maior casuística de dados histopatológicos comparativos entre QCs associados ou não à SG e dentre as 11 características histológicas analisadas, os cistos satélites, inflamação, restos odontogênicos e ilhas epiteliais foram mais frequentes nos casos sindrômicos, de modo similar aos resultados encontrados na presente análise.

Esses autores também não encontraram a presença de áreas com características ameloblastomatosas em nenhum TOQE.

Muitos estudos sobre a expressão de proteínas relacionadas à atividade proliferativa celular, assim como de genes supressores tumorais e oncogenes, têm sido realizados com o intuito de elucidar a natureza neoplásica dos TOQs (Shear, 2002). Neste contexto, alguns pesquisadores analisaram a expressão de p53 em TOQs esporádicos e sindrômicos (Ogden *et al.*, 1992; Lombardi *et al.*, 1995; Lo Muzio *et al.*, 1999; González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011). O p53 que é um gene supressor tumoral, em condições normais é efetivo durante o ciclo celular, controlando o crescimento celular, iniciando o reparo ou até mesmo induzindo a apoptose (Darnton, 1998). O papel exato de p53 na patogenia dos TOQs ainda não está completamente entendido, todavia o comportamento agressivo e a alta taxa de recorrência dessas lesões têm sido relacionados à maior expressão dessa proteína (Lombardi *et al.*, 1995). No presente estudo, todos os TOQEs foram negativos para p53 em todos os estratos epiteliais, enquanto a média de positividade no limitante epitelial (estratos basal e suprabasal) nos TOQSGs foi de 13,84%, apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Este dado assemelha-se ao estudo de Lo Muzio *et al.* (1999) no qual nenhum dos TOQEs mostrou-se reativo para p53, enquanto 93,75% da amostra de TOQSGs mostrou algum grau de positividade, sendo que a maioria dos casos apresentou positividade entre 10 a 20% das células ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, os dados do corrente trabalho diferem dos de Lombardi *et al.* (1995), Figueroa *et al.* (2010) e Gurgel *et al.* (2008), que não encontraram diferenças estatísticas na expressão deste marcador entre os grupos. No trabalho de Kolar *et al.* (2006) foi observada diferença estatística significativa quanto à reatividade de p53 entre o grupo dos TOQs (incluindo casos sindrômicos e esporádicos) e o grupo de outras lesões odontogênicas, apresentando média de 8,6% de positividade no limitante epitelial dos TOQs contra 1,4% de positividade das demais lesões.

Ki-67 é uma proteína nuclear que é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) e sua expressão está associada à atividade proliferativa das células (Gerdes *et al.*, 1992, Key *et al.*, 1993). A aplicação do Ki-67 no estudo de neoplasias humanas constitui um método fácil e útil, pois

pode fornecer informações sobre o prognóstico das lesões. Sendo assim, a imunomarcção desta proteína é amplamente utilizada para o estudo de cânceres como os de próstata, mama, linfomas de Hodking, melanomas, entre outros e tem sido utilizada também como valioso marcador preditivo do comportamento biológico de lesões císticas no campo da odontologia, especialmente os TOQs (Scholzen & Gerdens, 2000; González-Moles *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2006; Gurgel *et al.*, 2008; Mateus *et al.*, 2008;. Ayoub *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011). No presente trabalho, encontrou-se positividade para Ki-67, que ocorreu predominantemente no estrato suprabasal do limitante epitelial, tanto dos TOQSGs como dos TOQEs. Gurgel *et al.* (2008), Kadlub *et al.* (2013), González-Moles *et al.* (2006) e Ramos *et al.* (2014) também observaram predominante marcação no estrato suprabasal. O índice de proliferação médio encontrado no presente trabalho foi de 11% para os TOQSGs e 15% para os TOQEs, embora sem significância estatística. De modo similar, Mateus *et al.* (2008) não encontraram diferenças estatísticas significantes no índice de proliferação para Ki-67 entre os grupos de TOQs esporádicos e síndrômicos, embora a positividade também tenha sido maior no grupo dos TOQEs que dos TOQSGs. Ainda quanto à porcentagem de positividade encontrada, nossos achados demonstraram valores inferiores aos encontrados por González-Moles *et al.* (2006) que foram de 30% e 46% para os TOQs síndrômicos e esporádicos, respectivamente; e por Ramos *et al.* (2014) que reportaram porcentagens de 25,3% nos TOQEs e 19,6% nos TOQSGs. Lo Muzio *et al.* (1999) sugerem que a alta expressão de marcadores de proliferação celular em TOQSGs reflete o comportamento mais agressivo, o que não foi observado, pelo menos em parte, no presente trabalho.

O Gene *p63*, localizado no cromossomo 3q27-28 é um membro da família do gene *TP53*. Este gene apresenta variadas isoformas (*p63*, *TAp63* e  $\Delta$ *Np63*) de acordo com a presença ou ausência do domínio de ativação transcricional, sendo imprescindível para a morfogênese, regulação da proliferação celular, além de estar envolvido nos mecanismos de apoptose e diferenciação epitelial. Por outro lado, esta proteína pode apresentar-se mutada e superexpressa, podendo atuar como oncogene e regulando positivamente a proliferação celular. Sua superexpressão já foi verificada em carcinomas espinocelulares, linfomas e timomas (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Parsa

*et al.*, 1999; Di Como *et al.*, 2002; Lo Muzio *et al.*, 2005). No entanto, são poucos os estudos que avaliam a expressão de p63 em TOQSGs e TOQEs. Nos presentes achados, todos os casos sindrômicos e esporádicos apresentaram positividade para p63, sendo verificada nos estratos basal e suprabasal do epitélio cístico dos TOQSGs e predominantemente no estrato suprabasal dos TOQEs. Observou-se maior reatividade estatisticamente significativa para o grupo dos TOQSGs ( $p=0,016$ ), correspondendo à 58% frente à 44% do grupo de lesões esporádicas. Entretanto, este dado difere dos encontrados por Gurgel *et al.* (2008), que não observaram diferenças significantes entre os grupos, e dos encontrados por Foschini *et al.* (2006), os quais apresentaram uma maior média de positividade celular (55,7%) para os TOQEs. Nesse último estudo, assim como no de Friedrich *et al.* (2012), também foi analisada a localização da marcação para p63, que foi idêntica à observada no presente estudo, ou seja, nas camadas basal e suprabasal dos casos sindrômicos. Outros trabalhos que buscaram avaliar a expressão de p63 em TOQs e outras lesões odontogênicas mostraram que a maior expressão da proteína está associada com lesões que apresentam comportamento biológico mais agressivo, como por exemplo os tumores odontogênicos queratocísticos em comparação como cistos radiculares, que apresentam menor porcentagem de reatividade (Lo Muzio *et al.*, 2005; Seyedmajidi *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Moghadam *et al.*, 2013).

Pesquisas sobre a expressão de marcadores estromais também têm sido realizadas, com o intuito de relacioná-las com a agressividade de neoplasias. A actina alfa de músculo liso (AML) é uma proteína essencial para a motilidade e manutenção do citoesqueleto e que está presente em tecidos normais que necessitam de alta resistência mecânica, mas também se encontra associada a muitas neoplasias (Leong *et al.*, 1999). A AML é reconhecida pela literatura como uma ferramenta útil para a identificação de neoplasias como leiomiomas, leiomiiossarcomas e adenomas pleomórficos (Surowiak *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2012; Altaf *et al.*, 2014; Enescu *et al.*, 2014). Recentemente, a expressão para este marcador vem sendo estudada em lesões de origem odontogênica que exibem comportamento biológico agressivo, como ameloblastomas; cisto odontogênico glandular; cistos dentígeros; TOQs; além de outras lesões, incluindo o carcinoma espinocelular

oral (Vered *et al.*, 2005; Nonaka *et al.*, 2011; Nadalin *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014). Pesquisas exclusivas de TOQs esporádicos e sindrômicos, no entanto, são escassas. Nonaka *et al.* (2012) e Ramos *et al.* (2014) foram os pesquisadores que até o presente momento analisaram a expressão de AML nesse grupo de lesões. No presente estudo, a média de células positivas para AML no tecido conjuntivo subepitelial foi de 16,8% nos TOQSGs e 5% nos TOQEs, porém não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos. Acreditamos que a análise de um número maior de casos de TOQEs possa contribuir para o melhor entendimento desse padrão de marcação. Na análise de Ramos *et al.* (2014), apesar de não haver diferença estatística significativa, observou-se uma maior média de células reativas nos TOQSGs (60,7%) que nos TOQEs (55,9%). Nonaka *et al.* (2012) encontraram que a positividade celular foi bastante similar entre os grupos (33,7% para os TOQSGs e 34,4% para os TOQEs), também sem significância estatística.

Já o Sindecano-1 ou CD138, outra proteína analisada no presente estudo, é um proteoglicano transmembrânico que é expresso em células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias. Apresenta alta expressão no epitélio normal, especialmente no epitélio estratificado escamoso e é útil para a manutenção da morfologia epitelial, organização do citoesqueleto, além de ser essencial para a expressão de moléculas de adesão. É também expresso no epitélio odontogênico e no mesênquima, durante o desenvolvimento dos dentes. A literatura aponta que a perda da expressão do CD138 em neoplasias epiteliais malignas tem sido associada à invasão tecidual e metástases, relacionando-a a um pior prognóstico (Anttonen *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2004). Além do CD138 ser considerado um marcador fenotípico útil para identificar neoplasias epiteliais, a sua alta expressão no estroma vem sendo considerada um fator prognóstico desfavorável para cânceres de mama, pâncreas, ovário, próstata, endométrio e gástrico (Wiksten *et al.*, 2000; Wiksten *et al.*, 2001; Zellweger *et al.*, 2003; Hasengaowa *et al.*, 2005; Juuti *et al.*, 2005; Gotte, *et al.*, 2006; Kusumoto *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013). No câncer de mama, a expressão de CD138 correlaciona-se com fraca resposta à quimioterapia. Além disso, a expressão concomitante de CD138 em epitélio e conjuntivo está associada a um prognóstico desfavorável, ao passo que a diminuição da expressão no epitélio associa-se a um melhor prognóstico (Leivonen *et al.*,

2004; Gotte *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2013). Já para o câncer de próstata, a expressão elevada de CD138 é uma característica já estabelecida de progressão biológica agressiva, resultante da estabilização e manutenção de células tumorais (Shimada *et al.*, 2013). No que concerne à Odontologia, dois trabalhos avaliaram a expressão de CD138 em diferentes lesões odontogênicas como ameloblastomas, TOQs, cistos dentígeros e cistos radiculares (Nadalin *et al.*, 2012; Al-Otaibi *et al.*, 2013) e os resultados sugerem que a diminuição ou ausência de sua reatividade pode estar associada a um comportamento mais agressivo (Elenius & Jalkanen, 1994; Inki *et al.*, 1994; Soukka *et al.*, 2000; Bologna-Molina *et al.*, 2008; Bologna-Molina *et al.*, 2009; Nadalin *et al.*, 2012; Al-Otaibi *et al.*, 2013). No presente estudo, a marcação para CD138 foi verificada nos TOQs síndromicos e esporádicos, tanto nas estruturas epiteliais, como no estroma de forma difusa, padrão que também foi verificado nos estudos de Nadalin *et al.* (2012) e Al-Otaibi *et al.* (2013). No presente trabalho, foi observada a expressão de CD138 em cistos satélites, ilhas e brotamentos epiteliais, bem como em todos os estratos epiteliais, entretanto em variados graus de intensidade. O padrão de marcação das ilhas epiteliais e cistos satélites foi similar ao epitélio cístico principal, assim como nos resultados descritos por Al-Otaibi *et al.* (2013). Outros dois dados similares foram: a ausência ou diminuição de marcação em áreas de brotamento epitelial e ausência de marcação na periferia de ilhas com características ameloblastomatosas e positividade no centro das mesmas. De acordo com esses autores, a expressão diminuída de CD138 nos brotamentos epiteliais pode indicar o início do padrão de crescimento invasivo e infiltrativo, associado com o aumento da atividade proliferativa das células. Nesse contexto, é possível correlacionar estes achados com os resultados obtidos por Kurokawa *et al.* (2006) que associou a diminuição da expressão do sindecano-1 com maior grau de malignidade em carcinomas espinocelulares orais.

Já quanto à análise estromal de CD138 nos TOQs, observou-se uma tendência a maior marcação nos TOQEs que nos TOQSGs. Entretanto, algumas pesquisas têm mostrado que a marcação estromal de CD138 parece não diferir entre lesões odontogênicas, como ameloblastomas, TOQs e cistos dentígeros e não estar relacionada com o comportamento biológico (Nadalin *et al.*, 2012; Al-Otaibi *et al.*, 2013). Normalmente, a expressão do sindecano-1 é

limitada às células epiteliais e a algumas células mesenquimais como linfócitos B imaturos e plasmócitos. Por outro lado, em muitos estudos com lesões de outra natureza, como neoplasias de estômago, mama, ovário e pâncreas (Stanley *et al.*, 1999; Conejo *et al.*, 2000; Wiksten *et al.*, 2000; Wiksten *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2004) a expressão estromal de sindecano-1 parece estar associada com pior prognóstico. Al-Otaibi *et al.* (2013) hipotetizaram que em ameloblastomas a marcação estromal de CD138 pode ser um fator crítico para a carcinogênese e invasão local. Além disso, parece que ocorre uma mudança no padrão de expressão, diminuindo a expressão epitelial e aumentando a estromal. A explicação para essa alteração pode ser atribuída ao fato de que a expressão de CD138 parece ser necessária para manter o fenótipo celular diferenciado, de modo que com a supressão da expressão de sindecano-1 endógeno pode ocorrer uma mudança notável na morfologia celular, ou seja células que antes apresentavam formato achatado e cuboidal passam a assumir um padrão fusiforme e alongado, típico de células estromais (Jiang *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1995; Mennerich *et al.*, 2004). Sendo assim, mais estudos são necessários para o melhor entendimento do padrão de marcação de CD138, particularmente estromal, em lesões odontogênicas, incluindo os TOQs.

Em resumo este trabalho se propôs a analisar comparativamente os aspectos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de TOQEs e TOQSGs oriundos de diferentes instituições do Brasil e do exterior, além de entender o papel de proteínas associadas com proliferação/ciclo celular (p53, p63 e Ki-67), da actina de músculo liso-alfa ( $\alpha$ -SMA) e da proteína sindecano-1 (CD138), na tentativa de associar a expressão das mesmas com o comportamento biológico dos TOQs. Sendo assim, pode-se dizer que os TOQSGs apresentam características indicativas de maior agressividade como a maior taxa de pleomorfismo celular, maior expressão de p53 e p63 e tendência à perda de expressão de sindecano-1 quando comparados aos TOQEs.

## 8 CONCLUSÕES

1. A média de idade no momento do diagnóstico dos indivíduos portadores de TOQSGs é menor que a dos acometidos por TOQEs;
2. O padrão de distribuição dos TOQSGs ocorreu nas duas primeiras décadas de vida, enquanto nos TOQEs ocorreu em um padrão bimodal, envolvendo a segunda e terceira décadas e a sexta e sétima décadas;
3. A maioria dos pacientes sindrômicos apresentaram múltiplas lesões;
4. A mandíbula foi a região mais acometida para ambos os grupos;
5. No grupo dos TOQSG o gênero predominante foi o masculino, enquanto no de TOQEs foi o feminino;
6. O padrão radiográfico unilocular foi o mais comum para ambos os grupos analisados;
7. O pleomorfismo celular foi mais frequente nos TOQSGs que nos TOQEs;
8. A expressão de Ki-67 e AML foi similar entre os TOQs esporádicos e sindrômicos;
9. A expressão de p53 e p63 foi maior nos TOQSG que nos TOQESs;
10. A ausência de reatividade para CD138 no estrato epitelial basal foi maior nos TOQSGs que nos TOQEs.
11. A intensidade de marcação para CD138 foi maior no estrato suprabasal para os TOQEs;
12. A expressão estromal de CD138 foi similar entre os TOQs esporádicos e sindrômicos;
13. A maior agressividade dos TOQSGs pode ser explicada pela maior taxa de pleomorfismo celular, maior expressão de p53 e p63 e tendência à perda de expressão de sindecano-1 quando comparados aos TOQEs.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, Finkesltein S, Hunt JL. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128(3): 313-317.

Ahlfors E, Larsson A, Sjögren S. The odontogenic keratocyst: a benign cystic tumor? *J Oral Maxillofac Surg.* 1984; 42(1): 10-199.

Ahn SG, Lim YS, Kim DK, Kim SG, Lee SH, Yoon JH. Nevroid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33: 458-462.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula.* 5ª Edição. 2010 Editora Artmed.

Al-Otaibi O, Khounganian R, Anil S, Rajendran R. Syndecan-1 (CD 138) surface expression marks cell type and differentiation in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumor, and dentigerous cyst. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42: 186-193.

Altaf FJ, Mokhtar GA, Emam E, Bokhary RY, Mahfouz NB, Al Amoudi S, Al-Gaithy ZK. Metaplastic carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 2014; 16(9): 139.

Amezaga AOG, Arregui OG, Nuño SZ, Sagredo AA, Urizar JMA. Gorlin-Goltz Syndrome: Clinicopathologic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13(6): 338-343.

Amorim RFB, Godoy GP, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Immunohistochemical assessment of extracellular matrix components in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Oral diseases.* 2004; 10: 265-270.

Anttonen A, Kajanti M, Heikkila P, Jalkanen M, Joensuu H. Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 79: 558-564.

Ayoub MS, Baghdadi HM, El-Kholy M. Immunohistochemical detection of laminin-1 and Ki-67 in radicular cysts and keratocystic odontogenic tumors. *BMC Clin Pathol.* 2011; 11(4): 1-6.

Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. *World Health Organization Classification of Tumours.* IARC Press: Lyon 2005.

Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutation in odontogenic keratocysts. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1418-1422.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, Farfan-Morales JE, Irigoyen-Camacho ME, Damián-Matsumura P. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2008; 44: 805-811.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Farfan-Morales JE, Molina-Frechero N, Damián-Matsumura P. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. *Pathol Internat.* 2009; 59: 229-233.

Browne RM. The odontogenic keratocyst-histological features and their correlation with clinical behaviour. *British Dental Journal*; 131: 249–259, 1971a *apud* SHEAR, M.; SPEIGHT, P. *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions.* 4 Edição. 2007.

Cavalcante RB, Pereira KMA, Nonaka CFW, Nogueira RLM, Souza LB. Immunohistochemical expression of MMPs 1,7, and 26 in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2008; 106(1): 99-105.

Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Maia RC. p53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2002; 48(3): 419-427.

Chang ALS, Solomon JA, Hainsworth JD, Goldberg L, McKenna E, Day B, Chen DM, Weiss GJ. Expanded Access study of patients with advanced basal cell carcinoma treated with the Hedgehog pathway inhibitor, vismodegib. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 70: 60-69.

Chirapathomsakul D, Sastravaha P, Jansisyant P. A review of odontogenic keratocyst and the behavior of recurrences. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Ora Radiol Endod.* 2006; 101: 5-9.

Cirrone F, Harris CS. Vismodegib and the Hedgehog pathway: a new treatment for basal cell carcinoma. *Clin Ther.* 2012; 34: 2039-2050.

Conejo JR, Keeff J, Koliopanos A, Matsuda K, Zhu ZW, Goecke H, Bicheng N, Zimmermann A, Korc M, Friess H, Büchler MW. Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer.* 2000; 88(1): 12-20.

Crowley TE, Kaugars GE, Gunsolley JC. Odontogenic keratocysts: a clinical and histologic comparison of the parakeratin and orthokeratin variants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50: 22-26.

Darnton SJ. Demystified p53. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1998; 51: 248–253.

Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5178-86.

De Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. *Aust J Dermatol*. 2010; 51: 81-92.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C. p63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues. *Clinical Cancer Res*. 2002; 8: 494-501.

El Murtadi A, Grehan D, Toner MB, 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.

Elenius K, Jalkanen M. Function of syndecans a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci*. 1994; 107: 2975-2982.

Enescu A, Enescu AS, Florou C, Petrescu F. E-cadherin and  $\alpha$ -SMA expression in the epithelial-mesenchymal transition of salivary glands pleomorphic adenomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2014; 55(4): 1383-1387.

Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 743-754.

Evangelista M, Tian H, De Sauvage FJ. The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(20): 5924-5928.

Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet*. 1997; 30: 460-464.

Figuroa A, Avila M, Andea A, De Villiers P, Rivera H. Keratocystic odontogenic tumor associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome: Similar behavior to sporadic type? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 142: 179-183.

Foschini MP, Cocchi R, Marucci G, Pennesi MG, Magrini E, Ligorio C, Lombardini F, Tosi AL, Marchetti C. High  $\Delta$ N p63 isoform expression favours recurrences in odontogenic keratocyst – odontogenic keratocystic tumor. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 35: 673-675.

Forssell K, Sainio P. Clinicopathological study of keratinized cysts of the jaws. *Proceedings of the Finnish Dental Soc*. 1979; 75: 36–45 *apud* Shear M Speight P. *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions*. 4 ed. 2007.

Friedrich RE, Scheuer HA, Zustin J. Expression of Podoplanin in Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome-Associated Keratocystic Odontogenic Tumours. *Anticancer Res*. 2012; 32: 2125-2128.

Gerdes J, Becker MHG, Key G. Immunohistological detection of tumor grown fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. *J Pathol.* 1992; 168(1): 85-87.

Goh AM, Coill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human câncer. *J Pathol.* 2011; 223(2): 116–126.

Goldberg LH, Landau JM, Moody MN, Kazakevich N, Holzer AM, Myer A. Resolution of odontogenic keratocysts of the jaw in basal cell nevus syndrome with GDC-0449. *Arch Dermatol.* 2011; 147: 839-841

Gonçalves CK, Fregnani ER, Leon JE, Silva-Sousa YTC, Perez DEC. Immunohistochemical expression of p63, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Notch-1 inn Radicular Cysts, Dentigerous Cysts and Keracotystic Odontogenic Tumors. *Braz Dent J.* 2012; 23(4): 337-343.

González-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Yoshizawa D, Itoh S, Sakashita H, Ide F, Tajima Y, Kusama K. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. *J Oral Sci.* 2008; 2: 205-212.

González-Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Delgado-Rodríguez M, Martínez-Mata G, Gil-Montoya JA, Díaz-Franco MA, Bravo-Pérez JJ, González NM. Analysis of p53 protein by PAb240, Ki-67 Expression and Human Papillomavirus DNA Detection in Different Types of Odontogenic Keratocyst. *Anticancer Res.* 2006; 26: 175-182.

Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple Nevoid Basal-Cell Epithelioma, Jaw Cysts and Bifid Rib – A Syndrome. *N Engl J Med.* 1960; 262: 908-912.

Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinona (Gorlin) syndrome: Unanswered issues. *J Lab Clin Med.* 1999; 134: 551-552.

Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin) syndrome. *Genetics in Med.* 2004; 6: 530-539.

Gu XM, Zhao HS, Sun LS, Li TJ. PTCH Mutations in sporadic and Gorlin-syndrome-related odontogenic keratocysts. *J Dent Res.* 2006; 85(9): 859-863.

Götte M, Kersting C, Ruggiero M, Tio J, Tulusan AH; Kiesel L, Wülfing P. Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26: 621-627.

Gurgel CAS, Ramos EAG, Azevedo RA, Sarmiento VA, Carvalho AMS, Santos JN. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocystic odontogenic tumors: an immunohistochemical study. *J Mol Hist.* 2008; 39: 311-316.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996; 85: 841-851.

Hasengaowa, Kodama J, Kusumoto T, Shinyo Y, Seki N, Hiramatsu Y. Prognostic significance of syndecan-1 expression in human endometrial cancer. *Ann Oncol*. 2005; 16(7): 1109-15.

Hong YY, Yu FY, Qu JF, Chen F, Li TJ. Fibroblasts regulate variable aggressiveness of syndromic keratocystic and Non-syndromic Odontogenic Tumors. *J Dent Res*. 2014; 20(10): 1-7.

Ibrahim SA, Hassan H, Vilardo L, Kumar SK, Kumar AV, Kelsch R, Schneider C, Kiesel L, Eich HT, Zucchi I, Reinbold R, Greve B, Götte M. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6- mediated STAT3 signaling. *PloS One*. 2013; 8: e85737.

Inki P, Larjava H, Haapassalmi K, Miettinen HM, Grenman R, Jalkanen M. Expression of syndecan-1 is induced by differentiation and suppressed by malignant transformation of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol*. 1994; 63: 43-51.

Jiang R, Kato M, Bernfield M, Grabel LB. Expression of syndecan-1 changes during the differentiation of visceral and parietal endoderm from murine F9 teratocarcinoma cells. *Differentiat*. 1995; 59: 225-233.

Jones AV, Craig GT, Franklin CD. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(8): 500-507.

Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C. Syndecan-1 expression – a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol*. 2005; 68: 97-106.

Kadlub N, Coudert A, Gatibelza ME, El Houmami N, Soufir N, Ruhin-Poncet B, L'hermine AC, Berdal A, Vazquez MP, Descoix V, Picard A. *PTCH1* mutation and local aggressiveness of odontogenic keratocystic tumors in children: is there a relationship? *Human Pathol*. 2013; 44: 1071-1078.

Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into Anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol Biol Cell*. 1995; 6: 559-576.

Key G, Pettersen JL, Becker MHG, Duchrow M, Schlüter C, Askaa J, Gerdes J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin sections. *J Clin Pathol*. 1993; 46(12): 1080-1084.

Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular – Uma introdução à Patologia*. 2ª Ed. 2008; Editora Elsevier.

Kimi K, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30: 434-442.

Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, Digiovanna JJ, Bale AE, Bale SJ. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*. 1997; 69: 299-308.

Kolář Z, Geierová M, Bouchat J, Pazdera J, Zbořil V, Tvrđý P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35: 75-80.

Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Takamori K, Igawa K, Yoshida M, Fufuyama H, Takahashi T, Sakoda S. Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35: 301-306.

Kusumoto T, Kodama J, Seki N, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Clinical significance of syndecan-1 and versican expression in human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2010; 23(4): 917-925.

Lambrecht A, Van Troys M, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 1890-1909.

Leivonen M, Lundin J, Nordling S, Von Boguslawski K, Haglund C. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncol*. 2004; 67: 11-18.

Lemos J A R. Efeitos das mutações do gene supressor de tumor *p53* na leucemogênese. Sociedade Brasileira de Genética, Revisão (Monografia da Faculdade de Medicina) – USP. 1995; Ribeirão Preto.

Leocata P, Villari D, Fazzari C, Lentini M, Fortunato C, Nicòtina PA. Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36: 394-399.

Leonardi R, Sorge G, Caltabino M. Bilateral hyperplasia of the mandibular coronoid processes associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a italian boy. *Br Dent J*. 2001; 190: 349-350.

Leonardi R, Caltabino M, Lo Muzio L, Gorlin RJ, Bucci P, Pannone G, Canfora M, Sorge G. Bilateral hyperplasia of the mandibular coronoid processes in patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome: an undescribed sign. *Am J Med Genet*. 2002; 110: 400-403.

Leong ASY, Cooper K, Leong FJWM. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. Greenwich Medical Media Ltd. 1999; 3-4.

Li TJ, Browne RM, Prime SS, Paterson IC, Matthews JB. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25: 245-255.

Li T, Browne RM, Matthews JB. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1997; 50: 21-27.

Lo Muzio L, Nocini PF, Savoia A, Consolo U, Procaccini M, Zelante L, Pannone G, Bucci P, Dolci M, Bambini F, Solda P, Favia G. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Clinical findings in 37 italian affected individuals. *Clin Genet*. 1999; 55: 34-40.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Bucci P, Nocini PF, Bucci E, De Rosa G. Expression of cell cycle and apoptosis – related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res*. 1999; 78 (7): 1345-1353.

Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, Runini C, Pieramici T, Fior A, Trevisiol L, Carinci F, Leonardi R, Bufo P, Lanzafame S, Piatelli A. p63 expression in odontogenic cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34: 668-673.

Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*. 2008; 3: 32-48.

Lombardi T, Odell EW, Morgan PR. p53 Immunohistochemistry of Odontogenic Keratocysts in Relation to Recurrence, Basal-Cell Budding and Basal-Cell Naevus Syndrome. *Archs Oral Biol*. 1995; 40(12): 1081-1084.

Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33(2): 117-124.

Marsh A, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. Dhplc analysis of patients with Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome reveals novel PTCH missense mutations in the sterol-sensing domain. *Hum Mutat*. 2005; 26(3): 283.

Mateus GCP, Lanza GHSP, Moura PHR, Marigo HA, Horta MCR. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(11): 697-702.

Mendes RA, Carvalho JFC, 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 and Endodontol*. 2011; 111(3): 333-339.

Mennerich D, Vogerl A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz HD, Thierauch KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumors. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 1373-1382.

Mills AA, Zheng B, Wang XK, Voger H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999; 398 (6729): 708-713.

Moghadam SA, Moghadam FA, Mokhtari S, Eini E. Immunohistochemical Analysis of P63 Expression in Odontogenic Lesions. *BioMed Res Int*. 2013; 1-4.

Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biol*. 2013; 15(1): 2-8.

Nadalin MR, Fregnani ER, Silva-Souza YTC, Perez DEC. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 Expression in Odontogenic Cystic Lesions. *Braz Dent J*. 2012; 22(3): 223-229.

Nguyen TL, Grizzle WE, Zhang K, Hameed O, Siegal GP, Wei S. Syndecan-1 overexpression is associated with nonluminal subtypes and poor prognosis in advanced breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013; 140: 468-474.

Nonaka CFW, Cavalcante RB, Nogueira RLM, 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*. 2012; 57: 230-237.

Oda D, Rivera V, Ghaneé E, Kenny EA, Dawson KH. Odontogenic keratocyst: the northwestern USA experience. *J Contem Dent Pract*. 1999; 1(2): 60-74.

Ogden GR, Chisholm DM, Kiddie RA, Lane DP. p53 protein in odontogenic cysts: Increased expression in some odontogenic keratocysts. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 1007-1010.

Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, Takahashi N, Ooya K. *PTC* gene mutations and expressions of SHH, PTC, SMO and GLI-1 in odontogenic keratocyst. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33: 584-592.

Payne TF. An analysis of the clinical and histopathologic parameters of the odontogenic keratocyst. *Oral Surg*. 1972; 3(4): 358-546.

Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1999; 113(6): 1099-1105.

Pasca Di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(12): 903-911.

Philipsen HP. Om Keratocysted (Kolesteratomer) and kaeberne. *Tandlaegebladet*. 1956; 60: 963-971.

Ramos GO, Costa A, Meurer MI, Vieira DSC, Rivero ERC. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1,2 and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. *J Oral Pathol Med.* 2014; 43: 282-288.

Regezi JA. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol.* 2002; 15:331–341.

Rumayor A, Carlos-Bregni R, Kirsch HM, Andrade BAB, Romañach MJ, Almeida OP. Ghost cells in pilomatrixoma, craniopharyngioma, and calcifying odontogenic tumor: histological, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Oral Pathol Med.* 2014.

R Yang X, Pfeiffer RM, Goldstein AM. Influence of glutathione – S- transferase (GSTM1, GSTP1, GSTT1) and cytochrome p450 (CYP1A1, CYP2D6) polymorphisms on numbers of basal cell carcinomas (BCCs) in families with the naevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Med Genet.* 2006; 43(4): e16.

Ruprecht A, Austerlitz KH, Umstadt H. Cleft lip and palate, seldom seen features of the Gorlin-Goltz syndrome. *Dentomaxillofac Radiol.* 1987; 16: 99-103.

Satinoff MI, Wells C. Multiple basal cell naevus syndrome in ancient Egypt. *Med Hist.* 1969; 13: 294-297.

Shimada K, Santoshi A, Fujii T, Tanaka N, Fujimoto K, Konishi N. Syndecan-1 (CD138) contributes to prostate cancer progression by stabilizing tumor initiating cells. *J Pathol.* 2013; 231: 495-504.

Scholzen T, Gerdens J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-322.

Scully C, Langdon J, Evans J. Marathon of eponyms: 7. Gorlin-Goltz Syndrome (Naevoid basal-cell carcinoma syndrome). *Oral Diseases.* 2010; 16: 117-118.

Seyedmajidi M, Shafaei S, Shafiq E, Bijani A, Hamidi H. p63 expression in randomized odontogenic cysts. *Saudi Med J.* 2011; 32(5): 463-466.

Shah L, Walter K, Borczuk A, Kawut S, Sonett J, Gorestein L. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer.* 2004; 101: 1632-1638.

Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign neoplasm? A review. Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol.* 2002; 38: 323-331.

Shear M, Speight P. *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions.* 4 ed. 2007.

Soekarman D, Fryns JP, Casaer P, Van Den BH. Increase head circumference and facial cleft as presenting signs of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Genet Couns.* 1991; 2: 157-162.

Soufir N, Gerard B, Portela M, Brice A, Liboutet M, Saiag P, Descamps V, Kerob D, Wolken Stein P, Gorin I, Lebbe C, Dupin N, Crickx B, Basset-Seguिन N, Grandchamp B. *PTCH* mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. *Br J Cancer.* 2006; 95: 548-553.

Soukka, T.; Pohjola, J.; Inki, P.; Happonen, R.P. Reduction of syndecan-1 expression is associated with dysplastic oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 308-313.

Stanley MJ, Stanley MW, Sanderson RD, Zera R. Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1999; 112 (3): 377-383.

Sun LS, Li XF. *PTCH1* and *SMO* gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *J Dent Res.* 2008; 87(6): 575-579.

Surowiak P, Suchocki S, Györffy B, Gansukh T, Wojnar A, Maciejczyk A, Pudelko M, Zabel M. Stromal myofibroblasts in breast cancer : relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumors markers. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(2): 111-116.

Titinchi F, Nortje CJ. Keratocystic odontogenic tumor: a recurrence analysis of clinical and radiographic parameters. *Oral and Maxillofac Radiol.* 2012; 14: 136-142.

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 Oncol.* 2005; 41: 1028-1033.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408: 307-310.

Vorechovsky I, Benediktsson KP, Toftgard R. The patched/hedgehog/smoothed signalling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y, SHH, PTCH and SMO mutations. *European Journal of Cancer.* 1999; 35(5): 711-713.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev Cancer.* 2002; 2(8): 594-604.

Vuahula E, Nikai H, Ijuhin N, Ogawa I, Takata T, Koseki T, Tanimoto K. Jaw cysts with orthokeratinization: analysis of 12 cases. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 35-40.

Zhao YF, Wei JX, Wang SP. Treatment of odontogenic keratocysts: A follow-up of 255 Chinese patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 151-156.

Zedan W, Robinson PA, Markham AF, High AS. Expression of the Sonic Hedgehog receptor 'PATCHED' in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts. *J Pathol.* 2001; 194: 473-477.

Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Anefeld M, Glass AG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Gelmann EP, Bubendorf L. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate.* 2003; 55: 20-29.

Zhang H, Ping XL, Lee PK, Wu XL, Yao YJ, Silvers DN, Ratner D, Tsou HC. Role of *PTCH* and *p53* Genes in Early-Onset Basal Cell Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2001; 158(2): 381-385.

Waldron CA. Some observations on the jaw cysts in the basal cell nevoid carcinoma syndrome. Fourth Proceedings of the International Academy of Oral Pathol. 1969; 220 *apud* SHEAR M, SPEIGHT P. *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions.* 4 ed. 2007.

Wicking C, Bale AE. Molecular basis of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Curr. Opin Pediatr.* 1997; 9: 630-635.

Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signaling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene.* 1999; 18(55): 7844-7851.

Wiksten JP, Nordling S, Kokkola A, Haglund C. A prognostic value of syndecan-1 in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 4905-4907.

Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, Von Boguslawski K, Haglund C. Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer.* 2000; 95: 1-6.

Woolgar, JA, Rippin JW, Browne RM. A comparative histological study of odontogenic keratocysts in basal cell naevus syndrome and control patients. *Journal of Oral Pathol.* 1987; 16: 75-80.

Wright JM. The odontogenic keratocyst: orthokeratinized variant. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.* 1981; 51(6): 609-618.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe AP, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999; 398 (6729): 714-748.

Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*. 2012; 19(2): 170-176.

Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R. p53 stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nature Cell Biol*. 2002; 4: 462 – 467.

Yoshizumi J, Vaughan RS, Jasani B. Pregnancy associated with Gorlin's syndrome. *Anaesthesia*. 1990; 45: 1046-1048.

## 10 ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ/ 

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

**Título da Pesquisa:** Análise das características clinicopatológicas da Síndrome de Gorlin - Estudo colaborativo internacional

**Pesquisador:** ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 36882614.4.0000.0107

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 898.505

**Data da Relatoria:** 26/11/2014

**Apresentação do Projeto:**

O texto introdutório apresenta de modo claro e suficiente, as ideias principais que irão nortear a investigação em questão.

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar as características clinicopatológicas de uma grande casuística multicêntrica da Síndrome de Gorlin.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos aparentes. Os benefícios estão claros.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo proposto apresenta pertinência e valor científico Não há restrições quanto ao objeto ou metodologia do estudo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos necessários foram apresentados.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Endereço:** UNIVERSITARIA

**Bairro:** UNIVERSITARIO

**UF:** PR **Município:** CASCAVEL

**Telefone:** (45)3220-3272

**CEP:** 85.819-110

**E-mail:** cep.prppg@unioeste.br



Continuação do Parecer: 898.505

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

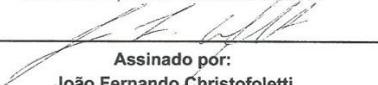
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As solicitações feitas foram atendidas pela pesquisadora.

CASCADEL, 04 de Dezembro de 2014



Assinado por:  
João Fernando Christofoletti  
(Coordenador)

Prof. Dr. João Fernando Christofoletti  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa com Seres Humanos  
Portaria nº 5387/2012 - GRE

Endereço: UNIVERSITARIA  
Bairro: UNIVERSITARIO  
UF: PR Município: CASCADEL  
Telefone: (45)3220-3272

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br