

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Estudo imunoistoquímico da expressão de α -actina de músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos

Michele Regina Nadalin

Orientador: *Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez*

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Michele Regina Nadalin

Estudo imunoistoquímico da expressão de α-actina de músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: *Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez*

Ribeirão Preto

2008

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da
Biblioteca Central da UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto -

N127e Nadalin, Michele Regina, 1979 -
Estudo imunoistoquímico da expressão de α -actina de
músculo liso, metaloproteinase de matriz-2, syndecan-1, ki-67 e
p53 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores
odontogênicos queratocísticos / Michele Regina Nadalin. --
Ribeirão Preto, 2008.
114 f.: il. color. + anexos.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez.

Tese (doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto,
Odontologia, área de concentração: Endodontia. Ribeirão Preto,
2008.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cistos odontogênicos.
4. Proteína p53 - Estudo imunoistoquímico. I. Título.

CDD: 617.634 2



**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em
Odontologia e no Serviço de Patologia da Universidade de
Ribeirão Preto, e no Departamento de Anatomia Patológica do
Hospital A. C. Camargo.**



Dedicatórias

Dedico esta etapa vitoriosa de minha vida a **Deus**, que, por meio da fé, me dá forças para lutar, ilumina meu caminho, mostra-me o verdadeiro sentido da vida e me faz acreditar que nada é impossível quando a causa é justa e a vontade verdadeira. Agradeço por confortar o meu coração nas horas mais difíceis, pela coragem e objetivos alcançados.

Ao meu querido pai, **José Luiz Nadalin (in memorian)**, pelo amor e carinho que sempre demonstrou, pela atenção e disposição em proporcionar o melhor durante a educação dos filhos. Sinto saudades da sua alegria, da sua companhia, do seu caráter e bondade inconfundíveis. Espero que estejas orgulhoso da luta de seus filhos. Paizinho, eu sempre vou te amar.

Agradeço à minha Mãe Querida, **Silmara do Rocio Günther Nadalin**,
pelo amor supremo, pela força e incentivo nos meus estudos.

Mãezinha, muito obrigada pelas palavras que acalmaram meu coração nas horas difíceis, pela disposição incondicional em me ajudar a conquistar os meus objetivos. Eu amo muito você.

Aos meus irmãos queridos, **Marlon Nadalin** e **Marina Nadalin**, pelo amor e carinho. Tenho muito orgulho de vocês e do nosso amor. Eu amo vocês.

Agradeço de todo o meu coração à minha avó **Anna Ganzert Günther**,
pela força, por todas as palavras de conforto, conselhos em horas de incerteza e de tristeza.

Eu amo muito você, minha avozinha, amiga e confidente preferida.

Ao meu querido **Matheus Coêlho Bandéca**, pela companhia carinhosa,
por tornar a minha vida mais feliz e por compreender os meus momentos difíceis.
Muito obrigada por ser tão companheiro e dedicado.

Desejo a você toda a felicidade do mundo e que continue sendo esta pessoa
maravilhosa e tão abençoada por Deus.

Matheus, eu te amo.



Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, que, além de professor e orientador, tornou-se amigo. Obrigada por ter confiado a mim um estudo tão especial, que, de extrema realidade, chega a instigar o abstrato, o virtual, como obra de arte. Muito obrigada pela força, principalmente nos momentos em que mais precisei. Admiro o seu profissionalismo, a sua disposição e a sua competência, mas é no seu caráter impecável que todas as suas qualidades são apoiadas. Muito obrigada.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, representado pela Magnífica Reitora, **Profa. Dra. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini Corauchi.**

À **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, área de concentração Endodontia, pela amizade e participação imprescindível na minha formação como mestre e pesquisadora. Muito obrigada pelo carinho e ensinamentos preciosos.

Ao **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, Ex-Coordenador do curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, pela amizade e colaboração sempre que precisei.

Ao **Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto**, exemplo de dedicação e competência, pelos ensinamentos durante a minha iniciação científica e principalmente pelas oportunidades concedidas. Muito obrigada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Endodontia, nível Doutorado, da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Neide Aparecida de Souza Lehfeld, Profa. Dra. Cristina Paschoalato, Prof. Dr. Lucélio Bernardes Couto, Prof. Dr. Lucas de Souza Lehfeld, Prof. Manoel Henrique Gabarra, Profa. Dra. Silvana Maria**

Paulino, Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva, Prof. Dr. Sílvio Rocha Corrêa Silva, Profa. Dra. Rosemary Cristina Linhares R. Pietro, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos queridos amigos, companheiros de turma de doutorado, **Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges, Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido, Prof. Dr. Bráulio Pasternak Júnior, Profa. Cláudia Kallas Gonçalves, Profa. Dra. Cleonice da Silveira Teixeira, Prof. Dr. Edson Alfredo, Prof. José Antônio Saadi Salomão, Prof. Marcos Pôrto Arruda e Profa. Dra. Melissa Andréia Marchesan**, pelo carinho, incentivo e cumplicidade. Foi um grande prazer fazer parte desta turma, e é com muito orgulho que agradeço cada momento que pude absorver um pouquinho da enorme experiência profissional que cada um de vocês possui.

Aos queridos e eternos mestres, **Prof. Dr. Luis Pascoal Vansan, Prof. José Antônio Brufato Ferraz e Prof. Dr. Raphael Carlos Comeli Lia**, pela amizade, ensinamentos valiosos e conselhos sinceros.

À minha querida amiga, **Rosemary Alexandre**, pela ajuda incondicional, pelo carinho e dedicação.

Aos pós-graduandos, **Profa. Patrícia Mara Nossa e Prof. Élcio Daleffe**, pela amizade e companheirismo.

À **Cecília Maria Zanferdini**, secretária da Pós-Graduação, pela colaboração e amizade.

À **Marilena Herédia**, técnica do Serviço de Patologia, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, **Sérgio Pereira de Mendonça, Fábio Juliano dos Santos, Valéria Rodrigues da Silva, Marina Janólio Ferreira, Fabíola Domenes de Sousa e Simone Andréa Baroni**, pela gentileza e atenção.

Ao meu querido irmão do coração, **Prof. Tabajara Sabbag Fonseca**, por simplesmente tornar real a existência de um anjo-da-guarda na terra. Muito obrigada.

Às queridas amigas, **Profa. Pâmela Carbone Mello, Flávia Gontijo Jorge, Cássia Fredianni Leiria, Profa. Gisele Aihara Haragushiku e Karliza Niehbur**, pelo carinho, força e incentivo. Obrigada por fazerem parte da minha vida e, assim, torná-la mais agradável.

Aos queridos amigos, **Márcia Sudo Enoki, Márcio Corrêa, Antônio Luiz de Oliveira, Aparecida Reis de Oliveira, Stella Maria Ganassim Palhares, Daniel Palhares, Ricardo Negrão Lutti, Flávia Reis de Oliveira Lutti**,

Joaquim Augusto de Paula, Marcela Moraes, Ana Paula Cortes de Oliveira, Brahim Drubi Filho, Rafael Andrade, Rodrigo Scandiuzzi, Laércio Noronha do Nascimento, Luiz Fernando Chaguri, pela convivência agradável e pelas oportunidades profissionais.

À **Lucia Helena Coêlho Bandéca, José Luiz Bandéca, Thiago Bandéca, Giovanna Bandéca, Evelyn Machado Bandéca e Filipe Bandéca**, por me acolherem como membro da família. Obrigada pelo carinho e confiança.

Aos colegas **Prof. José Estevam Vieira Ozório, Prof. Dr. Luiz Fernando Farinuik, Prof. Fabrício Scainni, Prof. Irdival Cristiano Figueiredo Júnior, Prof. Neilor Matheus Antunes Braga, Prof. André Franco Marques, Prof. Danilo Alessandro de Oliveira, Prof. Dr. Renato Cássio Roperto**, pela amizade e disposição em me ajudar sempre que precisei.

Aos meus queridos tios, **Edmilson Günther, Maria Luiza de Pauli, Silmirian Günther Vicilli e Rubens Vicilli**, pelo amor sempre demonstrado. Eu amo vocês.

Às minhas primas queridas **Caroline Vicilli e Camile Vicilli**, pelo amor sincero. Desejo a vocês muita sabedoria. Eu amo vocês.

Aos meus afilhados amados, **Gustavo de Pauli Güinther** e **Jéssica Freianni**, por tornarem a minha vida mais alegre e mais importante.

À minha bisavó, **Margarida Güinther (in memorian)**, que sempre me desejou sabedoria e saúde, pelas orações e palavras de conforto. Avozinha, eu amo muito você.

Aos **colegas das Clínicas Odontológicas Integral e COSE**, pela gentileza e amizade.

Aos meus **familiares e amigos**, pelo apoio e carinho.



Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar, em cistos radiculares (CRs), cistos dentígeros (CDs) e tumores odontogênicos queratocísticos (TOQs), a expressão imunoistoquímica de: 1) syndecan-1 (CD138), Ki-67 e p53 nas células epiteliais do revestimento cístico e 2) α-actina de músculo liso e MMP-2 nas células mesenquimais da cápsula cística. Foram selecionados 35 casos de CRs, 22 CDs e 17 TOQs. Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram obtidos de blocos de parafina, nos quais foram realizadas reações imunoistoquímicas, utilizando o método estreptavidina-biotina-peroxidase. Para determinar a porcentagem de células positivas, foram avaliados 3.700 campos microscópicos (400x) em 370 cortes histológicos, adotando os seguintes critérios: syndecan-1 e Ki-67 - negativo (<5% de células positivas), expressão fraca (5%-50% de células positivas) e expressão forte (>50% de células positivas); p53 - negativo (<5% de células positivas) e positivo (\geq 5% células positivas). Para α-actina de músculo liso, a presença de células positivas foi classificada como negativo (-), escasso (+) e abundante (++) e MMP-2 em negativo (-), fracamente positivo (+) e fortemente positivo (++), de acordo com a quantidade de MMP-2 positiva. No syndecan-1, avaliou-se também a intensidade da positividade das células epiteliais (+: fraca intensidade; ++: forte intensidade). Para análise estatística, foram utilizados o teste exato de Fisher e a correlação de coeficientes de Spearman, quando aplicáveis, adotando significância de 5%. A expressão de p53 e expressão e intensidade de CD138 não apresentaram diferença estatisticamente significante entre as lesões. Os TOQs apresentaram positividade estatisticamente superior para Ki-67 na camada suprabasal ($p<0,001$) em relação às outras lesões estudadas. Nos CRs, observou-se correlação positiva entre a expressão da proteína p53 e Ki-67 basal ($p=0,03$), expressão ($p=0,02$) e intensidade ($P=0,0001$) de syndecan-1, além de correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e intensidade de syndecan-1 ($p=0,01$) e entre a expressão e intensidade de syndecan-1 ($p<0,001$). Nos TOQs, correlação positiva foi observada entre a proteína p53 e expressão ($p=0,002$) e intensidade ($p=0,002$) de syndecan-1, e entre expressão e intensidade de syndecan-1 ($p<0,001$). Diferente do que ocorreu nos CRs, a positividade de Ki-67 na camada suprabasal dos TOQs correlacionou positivamente com expressão ($p=0,01$) e a intensidade ($p=0,01$) de syndecan-1. Nos CDs, não se observaram correlações entre os marcadores estudados. A expressão de α-actina de músculo liso foi observada em 34,2% dos CRs, 36,3% dos CDs e 46,9% dos TOQs, enquanto a expressão de MMP-2 foi positiva em 97% dos casos de CRs, 90,9% dos CDs e 94% dos TOQs. A expressão de MMP-2 foi significativamente mais forte nos CRs ($p=0,009$). Pôde-se concluir que nos CRs e TOQs, syndecan-1 parece ter papel importante na progressão destas lesões, e que a presença de miofibroblastos e MMP-2 na cápsula fibrosa de todas as lesões císticas estudadas foi correlacionada com a reabsorção do tecido ósseo adjacente e contribuir para o crescimento das lesões.



Summary

The aim of this study was to assess, in radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumors (KOT), the immunohistochemical expression of: 1) syndecan-1 (CD138), Ki-67 and p53 in the epithelial cells from the cystic lining and 2) α -smooth muscle actin (SMA) and MMP-2 in the mesenchimal cells from the cystic fibrous capsule. For the study, 35 cases of RC, 22 DC and 17 KOT were selected. Histological sections of 3 μm were obtained from paraffin-embedded tissue blocks, in which the immunohistochemical reactions were carried out, using the streptavidin-biotin-peroxidase method. In order to determine the percentage of positive cells, 3,700 microscopic fields ($\times 400$) were evaluated in 370 histological sections, adopting the following criteria: syndecan-1 and Ki-67 – negative (<5% of positive cells), weakly positive (5%-50% of positive cells) and strongly positive (>50% positive cells), while for p53 was considered negative (<5% of positive cells) or negative ($\geq 5\%$ of positive cells). For α -SMA, the presence of cells positive was classified as negative (-), scanty (+) or abundant (++) and MMP-2 in negative (-), weak positive (+) and strong positive (++), according to the quantity of MMP-2 imunoexpressed. In addition, for CD138, the intensity of the expression was also evaluated (+: weak intensity; ++: strong intensity). For statistical analysis, the data were evaluated by the Fisher exact test and Spearman correlation coefficients, adopting a significance of 5%. The p53 expression and the syndecan-1 expression and intensity did not show statistically significant differences among the lesions. KOT presented statistically higher positivity for Ki-67 in the suprabasal layer ($p < 0.001$) in comparison with the other studied lesions. In RCs, for p53 protein, positive correlation was observed between its expression and Ki-67 ($p = 0.03$), and expression ($p = 0.02$) and intensity ($P = 0.0001$) of syndecan-1. Additionally, positive correlation between the expression of Ki-67 and intensity of syndecan-1 ($p = 0.01$) and between the expression and intensity of syndecan-1 ($p < 0.001$) was also observed. In the KOTs, positive correlation was observed between the immunoexpression of p53 protein and expression ($p = 0.002$) and intensity ($p = 0.002$) of syndecan-1, and between the expression and intensity of syndecan-1 ($p < 0.001$). In contrast to RCs, Ki-67 expression in the suprabasal layer correlated positively with the expression ($p = 0.01$) and intensity ($p = 0.01$) of syndecan-1. No correlations were observed in the DCs. The α -SMA expression was observed in 34.2% of the RCs, 36.3% of DCs and 46.9% of the KOTs, while the MMP-2 expression was positive in 97% of the RCs, 90.9% of DCs and in 94% of the KOTs. The MMP-2 expression was significantly stronger in RCs ($p = 0.009$). No correlation between MMP-2 and α -SMA expressions was observed. In summary, syndecan-1 seems play an important role in the progression of these lesions. Additionally, the presence of myofibroblasts and MMP-2 in the fibrous capsule of all lesions can correlate with the bone tissue resorption and contribute to growth of the lesions.



Sumário

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO GERAL	1
PROPOSIÇÃO.....	16
CAPÍTULOS.....	18
Capítulo 1 - <i>SYNDECAN-1, Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS IN ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS</i>	19
Capítulo 2 - <i>MYOFIBROBLASTS AND MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) IN STROMA OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY</i>	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS	
1- Detalhamento da Metodologia	
2- Detalhamento da análise estatística	
3- Parecer do Comitê de Ética	
4- Confirmação de envio dos trabalhos para publicação	
5- Fotomicrografias	



Introdução Geral

Os cistos odontogênicos originam-se a partir de remanescentes embrionários de epitélio odontogênico e são representados principalmente pelos cistos radiculares, dentígeros e queratocistos (BROWNE, 1975; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Os cistos radiculares ou periapicais são classificados como cistos odontogênicos inflamatórios e têm seu epitélio originado dos restos epiteliais de Malassez, presentes no ligamento periodontal, provenientes da bainha de Hertwig, que se rompe após o início da rizogênese (BROWNE, 1975; LIAPATAS et al., 2003).

O desenvolvimento do cisto radicular ocorre devido à presença de um foco de inflamação instalada na região periradicular de um dente com necrose pulpar, em que抗ígenos bacterianos presentes no canal radicular induzem reações imunológicas que estimulam os restos epiteliais de Malassez a se proliferarem (BROWNE, 1975; MAIN, 1985; SHEAR; SPEIGHT, 2007). Atualmente, consideram-se três fases na patogênese do cisto radicular; a fase de iniciação, a fase de formação e a fase de crescimento. A fase de iniciação pode ser caracterizada pelo início da proliferação dos remanescentes epiteliais, causada pela inflamação resultante de debrís necróticos e抗ígenos bacterianos provenientes da polpa dental; a fase de formação, pelo revestimento da cavidade cística por epitélio odontogênico em proliferação e a fase de crescimento, pelo aumento da lesão cística, que, devido à diferença da pressão osmótica no interior da cavidade,

atraem fluidos para esta região e propiciam a expansão do cisto radicular (SHEAR; SPEIGHT, 2007).

No exame radiográfico, o cisto radicular se apresenta como lesão radiolúcida bem circunscrita, localizada no periápice ou lateralmente à raiz de um dente com necrose pulpar. Microscopicamente, o cisto radicular é caracterizado por uma cavidade revestida por epitélio escamoso estratificado e uma cápsula adjacente de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório de intensidade variável. Eventualmente, como resultado de metaplasia, as células epiteliais podem se tornar secretoras de muco, ciliadas ou formar queratina. Além destas substâncias secretadas, podem ser somadas ao conteúdo cístico células epiteliais descamadas, células inflamatórias, cristais de colesterol, ácido hialurônico e proteínas (BROWNE, 1975; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Os aspectos morfológicos do tecido epitelial podem ser considerados um reflexo da atividade funcional do cisto radicular. Lesões com epitélio escamoso estratificado atrófico, de espessura regular e contendo até 10 camadas celulares, geralmente exibem infiltrado inflamatório leve a moderado no tecido conjuntivo e são considerados cistos quiescentes. Entretanto, nos cistos com epitélio escamoso estratificado hiperplásico, com espessura irregular, geralmente são encontrados arcos proliferativos e infiltrado inflamatório intenso na cápsula, caracterizando lesões ativas (CURY et al., 1998).

Apesar da intensidade da inflamação ser variável na cápsula fibrosa do cisto radicular, a presença de algumas células inflamatórias está bem caracterizada na patogênese dessas lesões e da sua proliferação epitelial, por meio da imunidade celular e humorai (GAO et al., 1988; LIAPATAS et al., 2003). Há um predomínio de linfócitos, sendo a proporção de linfócitos T maior do que a de linfócitos B. Os linfócitos T estão relacionados ao estabelecimento da lesão e dispostos em infiltrados difusos, enquanto que os linfócitos B estão relacionados à progressão da lesão e em infiltrados inflamatórios focais. A mesma proporção de linfócitos T8 (supressores/citotóxicos) e T4 (auxiliares) são observadas nos cistos; entretanto, os linfócitos T4 estão dispostos no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio e os linfócitos T8 no lado oposto ao epitélio. Outras células como plasmócitos, importantes pela produção de imunoglobulinas, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, e raramente eosinófilos e mastócitos também podem ser observadas (GAO et al., 1988; CURY et al., 1998; SUZUKI et al., 2001; LIAPATAS et al., 2003; DE OLIVEIRA RODINI et al., 2004).

Os cistos dentígeros e os queratocistos odontogênicos são cistos odontogênicos de desenvolvimento (BROWNE, 1975; MAIN, 1985). Apesar de pertencerem à mesma classificação, possuem características peculiares bem definidas e potencial proliferativo distinto.

Os cistos dentígeros estão associados à coroa de dentes não erupcionados, localizados na junção cemento-esmalte e são formados pela expansão dos folículos

dentários resultante do acúmulo de fluidos entre a coroa do dente e componentes epiteliais (MAIN, 1985). O epitélio do cisto dentígero origina-se do epitélio reduzido do órgão do esmalte, que recobre completamente a coroa de um dente não erupcionado (SHEAR, 1994; KO et al., 1999; PAVELIC et al., 2001; STOLL et al., 2005; EDAMATSU et al., 2005).

Histologicamente, o cisto dentígero é caracterizado por uma cavidade revestida por tecido epitelial, constituído por 2 a 4 camadas celulares, onde a camada basal é formada por células cubóides e a superficial, por células poliédricas. Apresenta também uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo, que pode apresentar vários ninhos de epitélio odontogênico. Entretanto, se houver uma reação inflamatória associada, o revestimento epitelial pode se apresentar hiperplásico e com metaplasia escamosa (BROWNE, 1975; STOLL et al., 2005).

Radiograficamente, nota-se uma lesão radiolúcida unilocular caracterizada por margens escleróticas bem definidas e associada à coroa de um dente não erupcionado. Enquanto o espaço de um folículo dentário normal tem de 3 a 4 milímetros de espessura, a hipótese de um cisto dentígero é aventada quando o espaço estiver maior do que 5 milímetros (KO et al., 1999). Entretanto, a espessura do espaço pericoronário não é um critério seguro para o diagnóstico de cisto dentígero, sendo necessária a correlação radiográfica e microscópica para estabelecer o diagnóstico definitivo.

Uma nova classificação para os tumores odontogênicos foi elaborada e aprovada, em julho de 2003, pela Conferência Editorial da Organização Mundial da Saúde, em Lyon na França (BARNES et al., 2005). Nesta mais recente classificação, o queratocisto odontogênico foi considerado como uma neoplasia benigna cística odontogênica, passando a ser denominado tumor odontogênico queratocístico.

Os tumores odontogênicos queratocísticos originam-se a partir dos resíduos da lâmina dental (BROWNE, 1975; SHEAR, 1994). Caracterizam-se por uma cavidade cística revestida por uma fina camada de tecido epitelial escamoso estratificado, de 5 a 10 camadas celulares, onde as células da camada basal são colunares com núcleos dispostos em paliçada, com freqüente desprendimento do revestimento epitelial da cápsula de tecido conjuntivo fibroso, que se apresenta delgada e raramente com infiltrado inflamatório. Além disso, o corrugamento da camada de paraqueratina superficial é comumente observado. O conteúdo cístico é geralmente semi-sólido, composto predominantemente por queratina e células epiteliais descamadas e, em menor quantidade, pode-se observar albuminas e globulinas (DE PAULA et al., 2000; TSUKAMOTO et al., 2002).

Radiograficamente, os tumores odontogênicos queratocísticos são lesões radiolúcidas, uni ou multiloculares, bem circunscritas e com delgada cortical radiopaca. Quando múltiplas não é raro a presença bilateral e o envolvimento com

a síndrome do carcinoma nevóide basocelular (Síndrome de Gorlin-Goltz) (TSUKAMOTO et al., 2002).

O estudo dos fatores de crescimento permitiu avanço nos conhecimentos a respeito da patogênese dos cistos odontogênicos. Como os diferentes tipos de cistos odontogênicos originam-se de resíduos epiteliais formados em diferentes estágios do desenvolvimento do órgão dental, presume-se que o desenvolvimento dos tumores odontogênicos queratocísticos e dos cistos dentígeros esteja associado aos eventos celulares e moleculares, os quais estão relacionados às características do seu tipo de resíduo epitelial durante a odontogênese normal (LI et al., 1997).

Vários fatores de crescimento estão envolvidos na regulação da odontogênese. O fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e o fator de crescimento epitelial (EGF) estão funcionalmente relacionados ao crescimento e diferenciação celular que, por meio da sua ligação com receptores, neste caso, o receptor para o fator de crescimento epitelial (EGF-R) presente na superfície da membrana celular de muitos tipos celulares, desencadeiam mudanças intracelulares com a finalidade de induzir a síntese de DNA e a divisão celular (LI et al., 1997).

A expressão dos TGF- α e EGF-R foi constatada em todos os tipos de cistos odontogênicos; entretanto, foi evidenciada maior intensidade nos tumores odontogênicos queratocísticos do que nos cistos dentígeros e radiculares. No caso

do EGF, foi evidenciada menor expressão e não houve variação significativa da intensidade nos diferentes cistos estudados (LI et al., 1997).

A expressão do fator de crescimento transformante (TGF)- β 1 está associada à produção de colágeno e à organização da matriz extracelular, estruturas que atuam sinergicamente com os fatores de crescimento na promoção da diferenciação celular. No epitélio dos cistos radiculares, a expressão de TGF- β 1 foi praticamente negativa, enquanto nos cistos dentígeros e nos tumores odontogênicos queratocísticos paraqueratinizados, a expressão foi evidenciada na camada mais superficial (PIATTELLI et al., 2004).

O TGF- β 1 é o principal fator envolvido na diferenciação dos miofibroblastos (MFs), células especializadas que apresentam tanto as actinas citoplasmáticas β e α presentes nos fibroblastos, como a α -actina de músculo liso, tipicamente expressa nas células musculares lisas (TOMASEK et al., 2002).

Entretanto, as células que originam os MFs, assim como os mecanismos pertinentes a esta diferenciação permanecem sem completo esclarecimento. Têm-se sugerido que os MFs derivam de células dendríticas positivas para CD34, células musculares lisas e pericitos dos vasos sanguíneos, fibroblastos, fibrócitos (leucócitos com propriedades fibroblásticas) e até mesmo células epiteliais. Imunoistoquimicamente, a pesquisa de miofibroblastos está relacionada à positividade de α -actina de músculo liso em células fusiformes (GABBIANI, 1996;

DE WEVER; MAREEL, 2003; BARTH et al., 2004; DESMOULIÈRE et al., 2004; KOJC et al., 2005).

Os MFs foram inicialmente encontrados no tecido de granulação de feridas abertas, e posteriormente identificados em tecidos normais que necessitam de força mecânica, como gengiva marginal, mucosa do palato, glândulas sudoríparas e bulbo dos folículos capilares. Nos tecidos patológicos, estão presentes nas cicatrizes hipertróficas, fibromatoses e lesões fibrocontráteis, assim como no estroma reacional de tumores epiteliais (LOMBARDI; MORGAN, 1995; DESMOULIÈRE et al., 2005).

No processo de cicatrização, a participação dos MFs é temporária. Devido ao seu aparato contrátil e capacidade de remodelar a matriz extracelular, o MF está envolvido na contração da ferida e reorganização da matriz extracelular até a completa regeneração tecidual, e desaparecem por apoptose ou regredem à sua forma indiferenciada. Caso isso não ocorra, haverá formação de cicatrizes hipertróficas ou fibroses (DESMOULIÈRE et al., 2004; DESMOULIÈRE et al., 2005).

No estroma reacional ou desmoplásico, os MFs representam importante componente celular, podem estar associados tanto ao mecanismo defensivo de isolar a lesão, como podem participar ativamente da sua progressão, seja por meio da modulação da angiogênese, facilitação da invasão das células tumorais ou pela promoção da metastatização, uma vez que além da capacidade em produzir colágeno também são responsáveis pela síntese de enzimas, como a

metaloproteinase de matriz -2 (MMP-2), capaz de degradar a matriz extracelular e favorecer o crescimento invasivo da lesão (DE WEVER; MAREEL, 2003; DESMOULIÈRE et al., 2004).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas envolvidas na degradação de macromoléculas da matriz extracelular (ECM), como os colágenos, gelatinas, fibronectinas, tenascinas e lamininas (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Sob condições fisiológicas, estas enzimas desempenham importante função na regulação da ECM durante o desenvolvimento embrionário ou remodelação dos tecidos, e sob condições patológicas, participam da destruição da ECM do tecido conjuntivo envolvido em processos inflamatórios, como na artrite reumatóide e na doença periodontal (REYNOLDS et al., 1994), e estão associadas à invasão tumoral e metástases (EGEBLAD; WERB, 2002; KUMAMOTO et al., 2003; O'GRADY et al., 2007).

De acordo com o tipo de substrato da ECM em que atuam, as MMPs são divididas principalmente em colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases/collágeno tipo IV (MMP-2 e -9) e estromelisinas (MMP-3 e -10), e são reguladas principalmente por inibidores endógenos como os inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (TIMPs) -1, -2, -3 e -4, que atuam de maneira reversível na proporção de 1:1 e, como as MMPs, são secretados por diversas células mesenquimais, células hematopoiéticas, como os monócitos e macrófagos, queratinócitos, osteoblastos e/ou osteoclastos e fibroblastos. A desproporção de

MMPs e TIMPs está associada ao crescimento de lesões e podem ser reguladas por citocinas, interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 6 (IL-6) e pelos fatores de necrose tumoral α e β (TNF- α e TNF- β) e fator de crescimento transformante 1 β (TGF- β 1) (REYNOLDS et al., 1994; KUSANO et al., 1998; KUBOTA et al., 2002; OKA et al., 2005).

A MMP-2 (72 KDa gelatinase A, collagenase tipo IV) e seu inibidor TIMP-2 exercem função principal durante o mecanismo de progressão de lesões, invasão vascular e metástases. Devido à capacidade da MMP-2 em degradar colágeno tipo IV, o principal componente estrutural da membrana basal, assim como as gelatinas, a sua expressão tem sido associada ao fenótipo invasivo e potencial metastático dos tumores (EGEBLAD; WERB, 2002; KUMAMOTO et al., 2003; O'GRADY et al., 2007).

Assim como nos tecidos dos germes dentais, durante a odontogênese, as MMPs têm sido identificadas na patogênese e progressão das lesões periapicais (LEONARDI et al., 2005), cistos odontogênicos (KUBOTA et al., 2000; KUBOTA et al., 2002; OKA et al., 2005), ameloblastomas (KUMAMOTO et al., 2003) e carcinomas epidermóides (O'GRADY et al., 2007). Entretanto, esses dados são escassos, sendo necessários mais estudos para tentar elucidar o papel das MMPs e MFs, sobretudo nas lesões císticas odontogênicas.

Algumas moléculas com efeito biológico, como os fatores de crescimento, receptores dos fatores de crescimento, citocinas, proteínas da matriz extracelular,

moléculas de adesão intercelular e enzimas proteolíticas interagem com as células por meio das cadeias de sulfato de heparan (ZIMMERMANN; DAVID, 1999; KATASE et al., 2007). Nas células epiteliais, o principal responsável pela síntese destas cadeias é o syndecan-1 (BELLIN et al., 2002).

Syndecan-1, também denominado de CD138, é um proteoglicano transmembrana de sulfato de heparan localizado na superfície basolateral da célula, que está envolvido em muitos processos biológicos intercelulares e da célula com a matriz extracelular. Além disso, participa do controle da proliferação, diferenciação, adesão e migração celular (SANDERSON et al., 1992; INKI et al., 1994; KATO et al., 1995; ZIMMERMANN; DAVID, 1999; SOUKKA et al., 2000; WIJDENES et al., 2002; MUKUNYADZI et al., 2002; MUKUNYADZI et al., 2003; BELLIN et al., 2002; GÖTTE, 2003; GÖTTE; ECHTERMEYER, 2003; TAYLOR; GALLO, 2006; LEOCATA et al., 2007; GÖTTE et al., 2007; BOLOGNA-MOLINA et al., 2008).

Estruturalmente, o syndecan-1 é um cordão protéico que apresenta três domínios bem definidos: o extracelular, o transmembranoso e o citoplasmático. No domínio extracelular, estão localizados os sítios de encaixe das glicosaminoglicanas (GAGs), como as cadeias de sulfato de heparan e as cadeias de sulfato de condroitina, e é onde ocorre a interação celular. Os domínios transmembranoso e citoplasmático são altamente conservados. No domínio citoplasmático ocorre a interação dos elementos do citoesqueleto e a formação de complexos

citoplasmáticos sinalizadores, relacionados à manutenção do fenótipo normal, uma vez que atuam na organização da actina e na expressão da E-caderina (BELLIN et al., 2002).

As mudanças mais dramáticas da expressão do syndecan-1 ocorrem durante a embriogênese, cicatrização e carcinogênese, refletindo paralelamente, em mudanças no comportamento celular, que têm sua forma, crescimento, migração e organização do citoesqueleto alterados (KATO et al., 1995; ZIMMERMANN; DAVID, 1999; SOUKKA et al., 2000; WIJDENES et al., 2002).

A expressão do syndecan-1 é altamente regulada e caracteriza individualmente o comportamento de diferentes tipos celulares, tecidos e estágios de desenvolvimento. Desta forma, a expressão diminuída pode estar relacionada ao aumento do crescimento invasivo, potencial metastático e pior prognóstico de lesões como carcinomas epidermídes de cabeça e pescoço, ou ao contrário, como nos carcinomas de mama e pâncreas e no mieloma múltiplo, onde a expressão do syndecan-1 apresenta-se aumentada (ZIMMERMANN; DAVID, 1999, SOUKKA et al., 2000; MUKUNYADZI et al., 2002; SANDERSON; BØRSET, 2002; MUKUNYADZI et al., 2003; MAEDA et al., 2004; BOLOGNA-MOLINA et al., 2008).

Nos ameloblastomas, a expressão do syndecan-1 foi menos intensa do que nas células normais dos germes dentais (LEOCATA et al., 2007). Da mesma forma, os ameloblastomas sólidos tiveram menor expressão do que os ameloblastomas unicísticos, quando comparados ao germe dental e à mucosa epitelial normal.

adjacente, que tiveram intensa expressão de syndecan-1 (BOLOGNA-MOLINA et al., 2008). Como as lesões císticas odontogênicas são patologias epiteliais, o syndecan-1 pode eventualmente desempenhar papel importante na progressão dessas lesões. Entretanto, não há estudos que avaliem a expressão de syndecan-1 em cistos odontogênicos.

O potencial proliferativo celular, representado pela mitose, pode ser evidenciado pelo antígeno nuclear Ki-67, que está presente em todas as partes ativas do ciclo celular (G1, S, G2, M) e ausente em G0. Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular e alcança picos durante as fases G2 e M (TOSIOS et al., 2000).

No epitélio dos tumores odontogênicos queratocísticos, a distribuição das células em proliferação, positivas para Ki-67, ocorre predominantemente na camada suprabasal, ao contrário do que é observado nos cistos dentígeros, cistos radiculares e na mucosa oral normal (LI et al., 1994; LI et al., 1995; SLOOTWEG et al., 1995; LI et al., 1996; PIATELLI et al., 2001; SUZUKI et al., 2005; KICHI et al., 2005; CLARK et al., 2006; MALCIC et al., 2008).

Apesar do Ki-67 representar um marcador verdadeiro da proliferação celular, o distúrbio funcional do gene p53 resulta na sua incapacidade de controlar a divisão celular e consequentemente está relacionada à proliferação celular descontrolada, justificando a semelhança de expressão da p53 e do Ki-67 (SLOOTWEG et al., 1995; PIATELLI et al., 2001).

O p53 é um gene supressor de tumor, localizado no braço curto do cromossomo 17, envolvido na resposta a um dano causado no DNA, regulando a divisão celular pela sua interrupção na fase G1 e induzindo a célula lesionada à apoptose (TOSIOS et al., 2000; NYLANDER et al., 2000; SUZUKI et al., 2005).

Os fatores distintos capazes de ativar o gene p53 e estabilizar a proteína p53 são: estímulos oncogênicos, irradiação ultravioleta e ionizante, hipóxia, citocinas e fatores de crescimento. Dependendo do tipo de estímulo, a proteína pode se apresentar mutante ou apenas estável, como no caso da hipóxia (BATTIFORA, 1994; NYLANDER et al., 2000; RENTON et al., 2003).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese e progressão das lesões císticas odontogênicas teve avanços importantes com os estudos dos fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, citocinas, genes supressores de tumor. O estudo da expressão de syndecan-1 e MMP-2, assim como da presença dos miofibroblastos em lesões císticas odontogênicas, pode acrescentar informações relevantes.



Proposição

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise imunoistoquímica, a expressão de syndecan-1, Ki-67 e p53 nas células epiteliais e a expressão de α -actina de músculo liso e de metaloproteinase de matriz-2 nas células mesenquimais de cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos.



Capítulos

CAPÍTULO 1

SYNDECAN-1, Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS IN ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS*

Artigo submetido à revista:

Journal of Endodontics

* Artigo formatado de acordo com as normas específicas da revista (acessada em: outubro de 2008), exceto quanto à disposição das figuras e tabelas no texto.

SYNDECAN-1, Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS IN ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS

Michele Regina Nadalin, DDS, MSc*, Eduardo Rodrigues Fregnani, DDS, PhD[†], Fábio de Abreu Alves, DDS, PhD[†], Yara Teresinha Correa Silva-Sousa, DDS, PhD*, Fernando Augusto Soares, MD, PhD[‡], Danyel Elias da Cruz Perez, DDS, PhD*,[†]

* – School of Dentistry, University of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Departments of Stomatology[†] and Pathology[‡], A. C. Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil

Address for correspondence:

Danyel Elias da Cruz Perez, DDS, PhD

Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)

Serviço de Patologia.

Av. Costábile Romano, 2201. Ribeirânia.

CEP: 14096-090.

Ribeirão Preto/SP, Brazil.

Telephone: +55-16-3603-6790.

Fax number: +55-16-3603-6783.

E-mail: perezdec2003@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the immunohistochemical expression of syndecan-1 (CD138), Ki-67 and p53 protein in radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumor (KOT). Thirty-five RCs, 22 DCs and 17 KOTs were used in the study and the immunohistochemical reactions were performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method. For the statistical analysis, Fisher exact test and Spearman correlation coefficients were used. In RC, there was positive correlation between the expression ($p=0.02$) and intensity ($P=0.0001$) of syndecan-1, and p53 and Ki-67 expressions ($p=0.03$); positive correlation between the intensity of syndecan-1 and Ki-67 expression and ($p=0.01$) was also observed. In the KOT, positive correlation was observed between syndecan-1 expression ($p=0.002$) and intensity ($p=0.002$) and p53 expression, as well as between syndecan-1 expression ($p=0.01$) and intensity ($p=0.01$) and Ki-67 suprabasal expression. In conclusion, these findings suggest that syndecan-1 plays an important role in the progression of RC and KOT.

Key-words: **CD138, immunohistochemistry, odontogenic cystic lesions, radicular cysts, syndecan-1.**

INTRODUCTION

Odontogenic cysts are common lesions of the jaw, mainly the radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC) and odontogenic keratocyst, recently classified by the World Health Organization as a benign cystic neoplasia, being renamed as keratocystic odontogenic tumor (KOT) (1).

Although the odontogenic cysts lesions are derived from remnants of the odontogenic epithelium, they present distinct histopathology and biological behavior. RCs originate from an inflammatory focus in the apical periodontium of a tooth with pulp necrosis, in which bacterial antigens from the root canal induce immunological reactions that stimulate the epithelial rests of Malassez to proliferate (2). The action of prostaglandins, interleukins, epithelial (EGFs) and transforming growth factors (TGFs), matrix metalloproteinases, tumoral necrosis factor-alpha (TNF- α), appear to play an important role in the pathogenesis and progression of RCs (3-5). Studies have demonstrated that KOTs show higher proliferation rates when compared with other odontogenic cysts, and also some genetic alterations in the cells of the epithelial lining, which may contribute to a greater invasive capacity and higher recurrence rates (6-14).

Syndecan-1, also denominated CD138, is a transmembrane heparan sulfate proteoglycan expressed in endothelial cells, stromal fibroblasts and in inflammatory cells (15-18). However, its maximum expression is evidenced in normal epithelium, particularly in stratified squamous epithelium of the skin (19). Syndecan-1 is

essential for the maintenance of epithelial morphology and control of the cytoskeletal organization. In addition, it is important for the expression of adhesion molecules, cellular growth dependent on anchorage (20, 21) and to the epithelial-mesenchymal interactions (17, 22, 23).

The most dramatic changes in the expression of syndecan-1 occur during embryogenesis, cicatrization and carcinogenesis, reflecting changes in the behavior, shape, growth, migration and cytoskeletal organization of the cells (18, 20, 21, 24). Recently, a study demonstrated that the absence of syndecan-1 expression in solid ameloblastomas was correlated with a more aggressive biological behavior (25).

As odontogenic cystic lesions are essentially epithelial pathologies, and considering the clinical-pathological differences existent between them, syndecan-1 could eventually play a role in the progression and biological behavior of these lesions. Nevertheless, no study has evaluated the expression of this protein in odontogenic cystic lesions. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of syndecan-1 in radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. Moreover, in order to assess the proliferative activity and possible correlations with syndecan-1, the expression of Ki-67 and p53 was also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Between 1996 and 2006, the cases of RCs that showed a well formed cystic cavity with stratified and squamous epithelial lining, and all DCs and KOTs from the Oral Pathology Laboratory, University of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, were selected for this study. Thus, according to criteria of case selection, 35 RCs, 22 DCs and 17 KOTs were used. In the KOTs, there were no cases associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome, since that behavioral differences exist between multiple KOTs associated with this syndrome and non-associated solitary KOTs. Clinical and epidemiological data, such as age, gender and site of the lesion, were collected from the patients' charts archived in the Oral Pathology Laboratory. This study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Ribeirao Preto.

All cases were histologically reviewed by an oral pathologist (DECP) to confirm the diagnosis. In the RCs, the inflammatory reaction present in the cystic capsule was classified as slight (foci of inflammatory cells) or intense (diffuse inflammatory reaction).

Immunohistochemical reactions against syndecan-1 protein (clone MI15, dilution 1:200), p53 protein (clone DO-7, dilution 1:200) and Ki-67 antigen (clone MIB-1, dilution 1:200) (all DakoCytomation, Glostrup, Denmark) were performed in 3 µm histological sections. Antigen retrieval was performed in a pressure cooker for 4 minutes using a 10 mM citrate buffer (pH 6.0), incubation with the primary

antibodies for 18 h at 4°C, and secondary antibodies conjugated to a streptavidin–biotin–peroxidase system (strept ABComplex/HRP duet, mouse/rabbit; DakoCytomation Norden A/S), followed by application of diaminobenzidine as the chromogen. Slides were counterstained with Harris hematoxylin, mounted, and analyzed by two of us (MRN, DECP). Syndecan-1 expression was considered positive when immunoexpression was observed in cell membrane and/or cytoplasm of the epithelial cells. Positive (tonsil for syndecan-1 and breast carcinoma for p53 and Ki-67) and negative (omission of primary antibodies) controls were included in all reactions.

The percentage of positive cells in 10 high-power fields was used to classify each cystic lesion, using the following criteria: syndecan-1 and Ki-67 (negative: <5% of cells positive; weak expression: 5%-50% of cells positive; strong expression: >50% of cells positive); p53 (negative: <5% of cells positive or positive: ≥5% of cells positive). In addition to this, for syndecan-1, the intensity of positive epithelial cells was also analyzed (+, weak intensity; ++, strong intensity) and for Ki-67 the basal and suprabasal layers of the epithelial cystic lining was analyzed separately.

For statistical analysis, the immunoexpression of the studied proteins was compared among the lesions; in each lesion separately the correlations between the antibodies studied were establishment. The correlations were evaluated by the

Fisher exact test and Spearman correlation coefficients, adopting a significance of 5%.

RESULTS

Radicular cyst

Of the 35 cases of RCs, 21 (60%) occurred in men. The patients' mean age was 42.2 years (ranging from 19 to 78 years) and the maxilla was more affected (57.1%) than the mandible (42.9%). Microscopically, stratified, pavementous, non keratinized epithelial tissue of variable thickness was observed. Twenty-three cases (65.7%) presented a fibrous capsule with diffuse inflammatory reaction and in 12 (34.3%) there was focal inflammation.

Syndecan-1 (CD138) was expressed in 30 cases (85.7%); in 21 cases (70%), there was strong expression of syndecan-1 and in 19 (90.5%) of them, strong intensity was also observed (Fig. 1A). In regions where there was intense inflammatory reaction, its expression was absent or diminished (Figs. 1B and C). The inflammatory cells of 23 lesions (65.7%) were positive for syndecan-1 (Fig. 1B). The expression of p53 was evidenced in both basal and suprabasal layers in 24 cases (68.5%). Twenty-one cases (60%) were positive for Ki-67, 16 (76.2%) being weakly positive and 5 (23.8%) strongly positive. The expression of Ki-67 was restricted to the basal layer cells of the epithelial lining, except for one case that presented positive suprabasal cells.

Dentigerous cyst

In the 22 cases of DCs, the patients presented a mean age of 29 years (ranging from 7 to 68 years), in which 13 cases (59.1%) occurred in men. The maxilla was affected in 17 cases (77.3%). Microscopically the epithelium was arranged in two to five cellular layers, frequently formed by cubic epithelial cells.

Syndecan-1 was positive in 21 cases (95.5%), in which in 14 cases (66.7%) there was strong expression, with 13 of these (92.8%) also presenting intense marking (Fig. 1D). The expression of p53 was evidenced in the basal and suprabasal layers in 16 cases (72.7%). Twelve cases (54.5%) were positive for Ki-67 and all presented weak expression, in which 10 (83.3%) showed positivity restricted to the basal layer and in 2 cases (16.7%) there was expression in both basal and suprabasal cells.

Keratocystic odontogenic tumor

Most cases occurred in men (58.8%), with a mean age of 45.8 years (ranging from 13 to 78 years) and the mandible (70.6%) was the most affected site. Microscopically, epithelial lining composed of 6 to 8 cellular layers with corrugated superficial parakeratin and basal layer composed of cells disposed in palisade were observed. All the KOTs presented a parakeratin surface. Inflammatory infiltrate in the fibrous capsule was observed in 7 cases (41.2%). In regions that presented a more intense inflammatory reaction, frequently the

epithelium presented thickening and with rete processes, with loss of the keratinized surface and consequently of its conventional architecture.

Syndecan-1 was positive in all cases, 16 (94.1%) being of strong expression and intensity (Fig. 1E) and one (5.9%) of weak expression and intensity. In regions where there was an epithelial morphology alteration due to an inflammatory infiltrate, the expression of syndecan-1 was absent or weak (Fig. 1F); however, if the epithelial morphology was preserved, even in the presence of inflammation, the expression was not altered.

The expression of p53 was observed in 15 cases (88.2%). Sixteen cases (94.1%) were positive for Ki-67, in which 15 (93.7%) presented weak expression. The suprabasal layer showed positivity in all the cases, while basal layer cells were positive in 8 cases (50%).

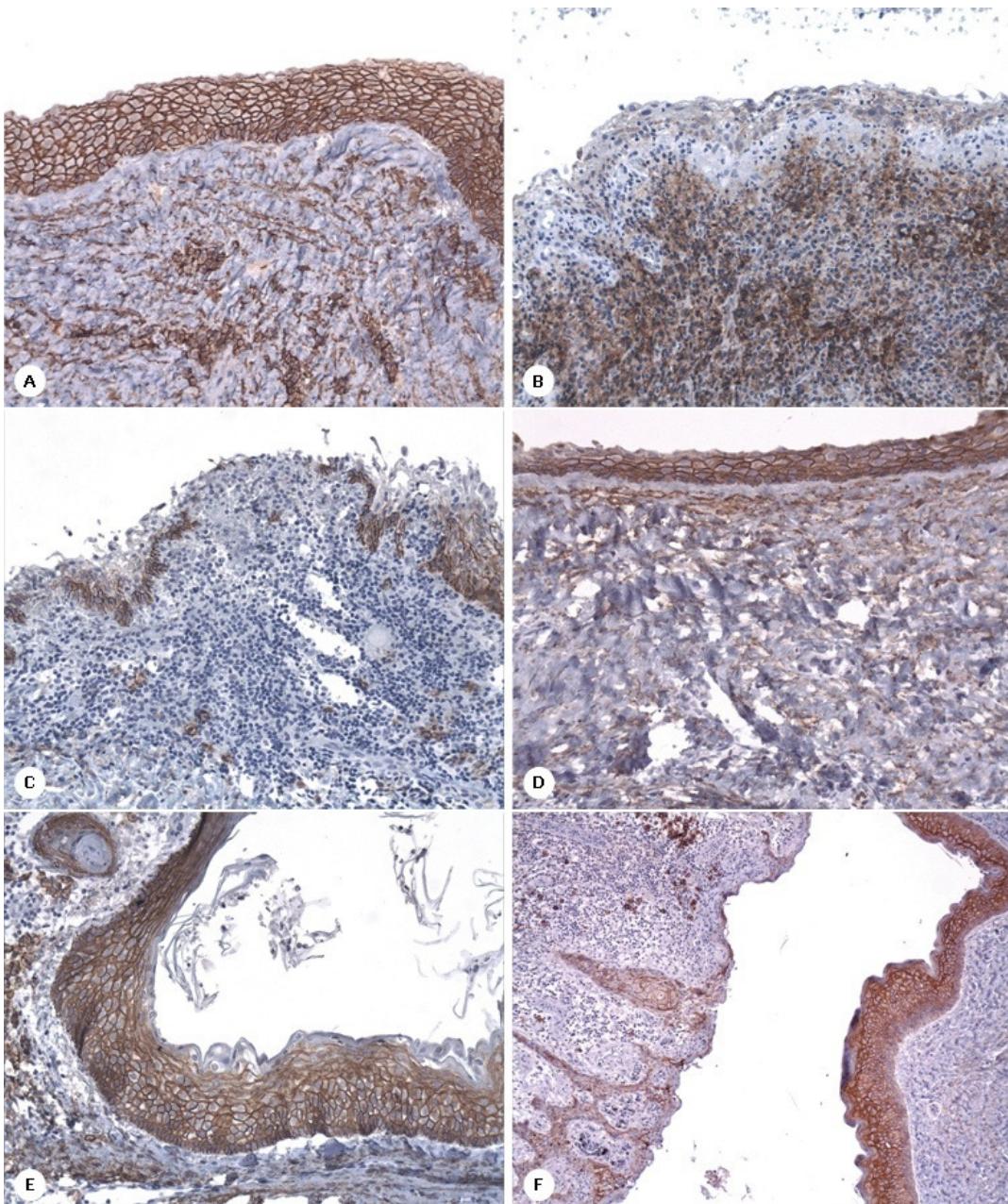


Figure 1. Immunohistochemical expression of syndecan-1 in odontogenic cystic lesions. (A) Strong expression and intensity of syndecan-1 in the epithelial lining from radicular cyst (x200). (B) and (C) Decrease of syndecan-1 expression in regions with inflammatory infiltrate in radicular cyst. In B, note that inflammatory cells present strong expression of syndecan-1 (x200). (D) Epithelial cells from dentigerous cyst presenting strong expression and intensity for syndecan-1 (x200). (E) Strong syndecan-1 expression in the epithelial lining from keratocystic odontogenic tumor (x200). (F) In the right, typical epithelial lining of keratocystic odontogenic tumor presenting strong syndecan-1 expression; in the left, decrease of syndecan-1 expression in epithelium with loss of keratinized surface and formation of rete processes, with adjacent inflammation (x200).

Statistical analysis

Although differences had been observed in the number of cases positive for p53, basal and suprabasal Ki-67, and the expression and intensity of syndecan-1, these differences were not statistically significant. Nevertheless, KOT presented statistically higher positivity for Ki-67 in the suprabasal layer ($p<0.001$) in comparison with the other studied lesions (Table 1).

Table 1. Comparative analysis of the p53, Ki-67 and syndecan-1 expression in radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumors (KOT)

Variables	Lesions			p value
	RC	DC	KOT	
	n=35 (%)	n=22 (%)	n=17 (%)	
p53 expression				
Negative	11 (31.4)	6 (27.3)	2 (11.8)	0.3
Positive	24 (68.6)	16 (72.7)	15 (88.2)	
Ki-67 expression (basal layer)				
Negative	15 (42.9)	10 (45.5)	9 (52.9)	0.4
Weak	15 (42.9)	12 (54.5)	7 (41.2)	
Strong	5 (14.2)	0 (0.0)	1 (5.9)	
Ki-67 expression (suprabasal layer)				
Negative	34 (97.1)	20 (90.9)	2 (11.8)	<0.0001*
Weak	1 (2.9)	2 (9.1)	14 (82.3)	
Strong	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)	
Syndecan-1 expression				
Negative	5 (14.3)	1 (4.6)	0 (0.0)	0.09
Weak	9 (25.7)	7 (31.8)	1 (5.9)	
Strong	21 (60.0)	14 (63.6)	16 (94.1)	
Syndecan-1 intensity				
Negative	5 (14.3)	1 (4.6)	0 (0.0)	0.3
Weak	6 (17.1)	3 (13.6)	1 (5.9)	
Strong	24 (68.6)	18 (81.8)	16 (94.1)	

*Statistically significant

In the RCs, for p53 protein, positive correlation was observed between its expression and Ki-67 ($p=0.03$), and expression ($p=0.02$) and intensity ($P=0.0001$) of syndecan-1. Additionally, positive correlation between the expression of Ki-67 and intensity of syndecan-1 ($p=0.01$) and between the expression and intensity of syndecan-1 ($p<0.001$) was also observed.

In the KOTs, positive correlation was observed between the immunoexpression of p53 protein and expression ($p=0.002$) and intensity ($p=0.002$) of syndecan-1, and between the expression and intensity of syndecan-1 ($p<0.001$). In contrast to RCs, Ki-67 expression in the suprabasal layer correlated positively with the expression ($p=0.01$) and intensity ($p=0.01$) of syndecan-1. No correlations were observed in the DCs.

DISCUSSION

Syndecan-1 presents greater expression in well-differentiated epithelial tissues, mainly the stratified and pavimentous that compose the skin. On the other hand, diminishment of its expression alters the cellular morphology and organization, arrangement and expression of adhesion molecules and the growth control dependent on anchorage, which results in an indicator of malignant transformation, invasive growth and cellular atypia (20, 25, 26). Diminishment of syndecan-1 expression in head and neck squamous cell carcinomas correlated with poor prognosis (17, 24, 26-28). Nevertheless, the greater expression of syndecan-

1 correlated with worse prognosis in breast and pancreas carcinomas, and in multiple myeloma (15, 29, 30).

As syndecan-1 is typically expressed in epithelial cells, its expression can be important not only in malignant neoplasias, but also in benign tumors and lesions from epithelial tissue, as are the majority of the odontogenic lesions. Recently, some authors evidenced that the expression of syndecan-1 in the extracellular matrix of ameloblastomas and the diminishment of expression in the tumor cells can determine a more aggressive local behavior of these lesions (16, 25). Nevertheless, there are no studies evaluating the expression of syndecan-1 in odontogenic cystic lesions.

In the present study, the expression of syndecan-1 was accentuated in the epithelial lining of all the cystic lesions, being positive in 85.5% of the RCs, 95.5% of the DCs and in all the KOTs; however, this difference was not statistically significant. Interestingly, in RCs, the epithelium located in regions with intense inflammatory reaction presented diminished or absence of syndecan-1 expression. Probably, the aggressiveness caused by the inflammatory cells in the epithelial lining contributed to diminish the expression of the protein. On the other hand, in KOTs, in areas of typical epithelial lining, strong expression was maintained even in the presence of inflammatory cells. However, in areas in which there was epithelial hyperplasia secondary to inflammatory reaction, expression was also diminished or absent.

Ki-67 is significantly more expressed in the suprabasal layer of KOTs, when compared with the other odontogenic cystic lesions (8, 10, 11, 31), as occurred in the present study. In our study there were also a greater expression, but not significant, of p53 in the KOTs in comparison with RCs and DCs, which was also observed in other studies (12-14). Positive correlation was found between the expression of p53, Ki-67 and syndecan-1 in the RCs and KOTs in this study. This correlation between cellular proliferation markers and syndecan-1 suggests that this proteoglycan can be important in the progression and maintenance of RCs and KOTs. Moreover, syndecan-1 participates in various processes involved in the modulation of inflammation, particularly in interactions between leukocytes and endothelial cells (22), which explains its expression in the inflammatory cells of 65.7% of the cases of RCs. Therefore, particularly in RC, the expression of syndecan-1 in inflammatory cells in various cases could indicate another important pathway of action of this proteoglycan for the progression of this lesion.

In summary, the expression of syndecan-1 does not seem to be a determinant factor of the distinct histopathological features and biological behavior of the studied lesions. Nevertheless, its positive correlation with markers of cell proliferation suggests that it plays an important role in the progression of these odontogenic cystic lesions.

REFERENCES

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours - World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
2. Browne RM. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. *J Oral Pathol* 1975;4:31-46.
3. Cury VC, Sette PS, da Silva JV, de Araujo VC, Gomez RS. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod* 1998;24:36-7.
4. Formigli L, Orlandini SZ, Tonelli P, Giannelli M, Martini M, Brandi ML, et al. Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. *J Oral Pathol Med* 1995;24:216-20.
5. Muglali M, Komerik N, Bulut E, Yarim GF, Celebi N, Sumer M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *J Oral Pathol Med* 2008;37:185-9.
6. Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:313-7.
7. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;79:1418-22.

8. Clark P, Marker P, Bastian HL, Krogdahl A. Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression. *J Oral Pathol Med* 2006;35:568-72.
9. Katase N, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Gunduz M, Tamamura R, Pwint HP, et al. Analysis of the neoplastic nature and biological potential of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated keratocystic odontogenic tumor. *J Oral Pathol Med* 2007;36:550-4.
10. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, et al. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34:280-6.
11. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med* 1995;24:221-6.
12. Li TJ, Browne RM, Prime SS, Paterson IC, Matthews JB. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. *J Oral Pathol Med* 1996;25:249-55.
13. Malcic A, Jukic S, Anic I, Pavelic B, Kapitanovic S, Kruslin B, et al. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. *J Oral Pathol Med* 2008;37:294-301.

14. Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. P53 protein expression in odontogenic cysts. *J Endod* 2001;27:459-61.
15. Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfing P. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma *in situ*. *Breast Cancer Res* 2007;9:R8.
16. Leocata P, Villari D, Fazzari C, Lentini M, Fortunato C, Nicotina PA. Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2007;36:394-9.
17. Mukunyadzi P, Liu K, Hanna EY, Suen JY, Fan CY. Induced expression of syndecan-1 in the stroma of head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2003;16:796-801.
18. Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. Cd138. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002;16:152-5.
19. Sanderson RD, Hinkes MT, Bernfield M. Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *J Invest Dermatol* 1992;99:390-6.

20. 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;6:559-76.
21. Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J* 1999;13 Suppl:S91-S100.
22. Gotte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J* 2003;17:575-91.
23. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006;20:9-22.
24. Soukka T, Pohjola J, Inki P, Happonen RP. Reduction of syndecan-1 expression is associated with dysplastic oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 2000;29:308-13.
25. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella E, Almeida OP, Carrasco-Daza D, Garcia-Vazquez F, et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncol* 2008;44:805-11.
26. Mukunyadzi P, Sanderson RD, Fan CY, Smoller BR. The level of syndecan-1 expression is a distinguishing feature in behavior between keratoacanthoma and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:45-9.

27. Inki P, Joensuu H, Grenman R, Klemi P, Jalkanen M. Association between syndecan-1 expression and clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1994;70:319-23.
28. Inki P, Stenback F, Talve L, Jalkanen M. Immunohistochemical localization of syndecan in mouse skin tumors induced by UV irradiation. Loss of expression associated with malignant transformation. *Am J Pathol* 1991;139:1333-40.
29. Maeda T, Alexander CM, Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:612-21.
30. Sanderson RD, Borset M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol* 2002;81:125-35.
31. Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34:46-52.

CAPÍTULO 2

MYOFIBROBLASTS AND MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) IN STROMA OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY*

Artigo submetido à revista:

International Endodontic Journal

*Artigo formatado de acordo com as normas específicas da revista (acessada em: outubro de 2008) exceto quanto à disposição das figuras e tabelas.

**MYOFIBROBLASTS AND MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) IN
STROMA OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS: AN
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY**

Running title: α -SMA and MMP-2 in jaw lesions

Michele Regina Nadalin, DDS, MSc¹, Eduardo Rodrigues Fregnani, DDS, PhD², Yara Teresinha Correa Silva-Sousa, DDS, PhD¹, Fernando Augusto Soares, MD, PhD³, Danyel Elias da Cruz Perez, DDS, PhD^{1,2}

1 – School of Dentistry, University of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Departments of Stomatology² and Pathology³, A. C. Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil

Key-words: dentigerous cyst; keratocystic odontogenic tumor; matrix metalloproteinase-2; myofibroblasts; odontogenic keratocyst; radicular cyst.

Address for correspondence:

Danyel Elias da Cruz Perez, DDS, PhD

Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Serviço de Patologia.

Av. Costábile Romano, 2201. Ribeirânia.

CEP: 14096-090.

Ribeirão Preto/SP, Brazil.

Telephone: +55-16-3603-6790; Fax number: +55-16-3603-6783.

E-mail: perezdec2003@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aim. The aim of this study was to analyze the presence of myofibroblasts and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in stroma from radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumor (KOT).

Methodology. For the study, 35 RCs, 22 DCs and 17 KOTs were selected. Immunohistochemical reactions were performed using the anti-MMP-2 and anti- α -smooth muscle actin (SMA) antibodies. For the analysis, 10 high-power fields were observed in each case, in order to determine the percentage of positive cells, which was classified as negative, scanty and abundant.

Results. The presence of myofibroblasts (α -SMA positive cells) was most common in KOT (46.9%), followed by DC (36.4%) and RC (34.3%); however it was not statistically significant ($p=0.7$). The MMP-2 expression was positive in 97% of the RC, 90.9% of DC and in 94% of the KOT, being significantly higher in RC ($p=0.009$). No correlation between MMP-2 and α -SMA expressions was observed.

Conclusions. Myofibroblasts and MMP-2 are frequent in RC, DC and KOT and eventually can contribute to growth of these lesions.

INTRODUCTION

Myofibroblasts (MF) are specialized cells that present both cytoplasmatic β - and γ - actins present in fibroblasts, as well as the isoform α of smooth muscle actin (α -SMA), typically expressed in the smooth muscle cells (Tomasek *et al.* 2002). They were initially found in the granulation tissue of open wounds and afterwards identified in normal tissues that require mechanical force, in hypertrophic scars, fibromatosis and fibro-contractile lesions, as well as in the reactional stroma of epithelial tumors (Desmouliere *et al.* 2005). Several molecules could be involved in the differentiation of MF, however, the most important is the transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) (Desmouliere *et al.* 2005, De Wever & Mareel 2003, Kojc *et al.* 2005, Sobral *et al.* 2007, Tomasek *et al.* 2002). In hereditary gingival fibromatosis it was evidenced that interferon γ (INF- γ), released by the inflammatory cells, is capable of inhibiting this differentiation (Bitu *et al.* 2006, Sobral *et al.* 2005).

In the reactive or desmoplastic stroma from neoplasias, the MF represent the main cellular component and may be associated with both the defensive mechanism of isolating the lesion, and actively participating in its progression, either by means of modulating angiogenesis, facilitating the invasion of tumor cells, or by promoting metastases, since in addition to the capacity to produce collagen, they are also responsible for the synthesis of enzymes, such as the matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), capable of degrading the extracellular matrix

and favoring the invasive growth of the lesion (De Wever & Mareel 2003, Desmouliere *et al.* 2004).

For this reason, the expression of MF in desmoplastic stroma have been correlated with the aggressiveness and unfavorable clinical prognosis of different lesions, as in carcinomas from the oral cavity, larynx, pharynx and hypopharynx (Barth *et al.* 2004, Kellermann *et al.* 2007, Kojc *et al.* 2005, Vered *et al.* 2007a). However, in other non-neoplastic lesions, such as in central giant cell lesion, the expression of MF has been evidenced, but there is not correlation with the more aggressive clinical behavior of some subtypes of this lesion (Vered *et al.* 2007b).¹¹

Few studies have evaluated the expression of MF in odontogenic lesions (Lombardi & Morgan 1995, Vered *et al.* 2005). In odontogenic cysts, MF are present in different degrees of expression, in practically all the cases of radicular (RC) and dentigerous cysts (DC) (Lombardi & Morgan 1995, Vered *et al.* 2005). Nevertheless, in odontogenic keratocysts, recently classified by the World Health Organization as a benign cystic neoplasia, being renamed as a keratocystic odontogenic tumor (KOT) (Barnes *et al.* 2005), the presence of MF was related to lesions with the more aggressive phenotype (Lombardi & Morgan 1995, Vered *et al.* 2005). Due to the few data available on the presence of MF in odontogenic cystic lesions, the aim of this study was to analyze the presence of MF by immunohistochemical evaluation of α-SMA and the immunohistochemical

expression of MMP-2 in radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-five RCs, 22 DCs and 17 KOTs, from the archives of the Oral Pathology Laboratory, University of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, were used in this study. RCs that presented a well formed cystic cavity, with stratified, squamous epithelial lining were selected. In the KOTs there was no case associated with the Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Clinical and epidemiological data were collected from the patients' clinical charts. This study was approved by the Research Ethics Committee of the University of Ribeirao Preto.

All cases were histologically reviewed to confirm the diagnosis. In the RCs, the inflammatory reaction present in the cystic capsule was evaluated as slight (foci of inflammatory cells) or intense (diffuse inflammatory reaction).

For immunohistochemical reactions, 3 µm histological sections were obtained from the paraffin-embedded tissue blocks and mounted on silane-coated glass slides. Pressure cooker antigen retrieval was performed for 4 minutes in 10 mM citric acid solution (pH 6.0), followed by a washing step with phosphate-buffered solution (PBS). The incubation with the anti-MMP-2 (polyclonal, dilution 1:200, NeoMarkers, Labvision Corporation, Fremont, USA) and anti- α -SMA (clone

1A4, dilution 1:200, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) primary antibodies was carried out for 18 h at 4°C. Secondary antibodies conjugated to a streptavidin–biotin–peroxidase system (strept ABC complex/HRP duet, mouse/rabbit; DakoCytomation Norden A/S) were incubated for 30 minutes, followed by application of diaminobenzidine as the chromogen. Slides were counterstained with Harris hematoxylin, mounted, and blinded analyzed by two of the authors. The expression of α-SMA and MMP-2 was evaluated in the stroma (fibrous capsule) of the studied lesions. Positive and negative controls were included in all reactions.

The percentage of positive cells in 10 high-power fields was used to classify each lesion. The presence of cells positive for α-SMA was classified as negative (-), scanty (+) or abundant (++)¹, according to Kellermann *et al.* (2007). In the same way, positivity for MMP-2 was evaluated semi-quantitatively into negative (-), scanty (+) and abundant (++)¹, according to the quantity of MMP-2 expression observed.

For statistical analysis, the lesions were compared with regard to the expression of the studied antibodies, and it was verified whether there was correlation between α-SMA and MMP-2 in each cystic lesion. The correlations were evaluated by the Fisher exact test and Spearman correlation coefficients, adopting a significance of 5%.

RESULTS

The clinical and epidemiological data of the lesions are listed in Table 1. The immunohistochemical findings are in the sections regarding to each lesion.

Table 1 – Clinical and epidemiological data of the studied cystic lesions

Clinical features	Lesions*		
	RC n=35	DC n=22	KOT n=17
Gender			
Male	21 (60.0%)	13 (59.1%)	10 (58.8%)
Female	14 (40.0%)	9 (40.9%)	7 (41.2%)
Mean age	42.2 (19-78 years)	29 (7-68 years)	45.8 (13-78 years)
Site			
Maxilla	20 (57.1%)	17 (77.3%)	5 (29.4%)
Mandible	15 (42.9%)	5 (22.7%)	12 (70.6%)

*RC- radicular cyst; DC – dentigerous cyst; KOT – keratocystic odontogenic tumor

Radicular Cyst

Of the 35 cases of RC, 23 (65.7%) presented a fibrous capsule with diffuse inflammatory reaction and in 12 (34.3%) there was focal inflammation. Twenty-three cases (65.7%) did not express α -SMA, 11 (31.4%) presented few positive cells for α -SMA and one case (2.8%) presented abundant positive cells (Fig. 1).

MMP-2 had weak positivity in 24 cases (68.5%) (Fig. 2), strong positivity in 10 (28.5%) and one case (2.8%) was negative.

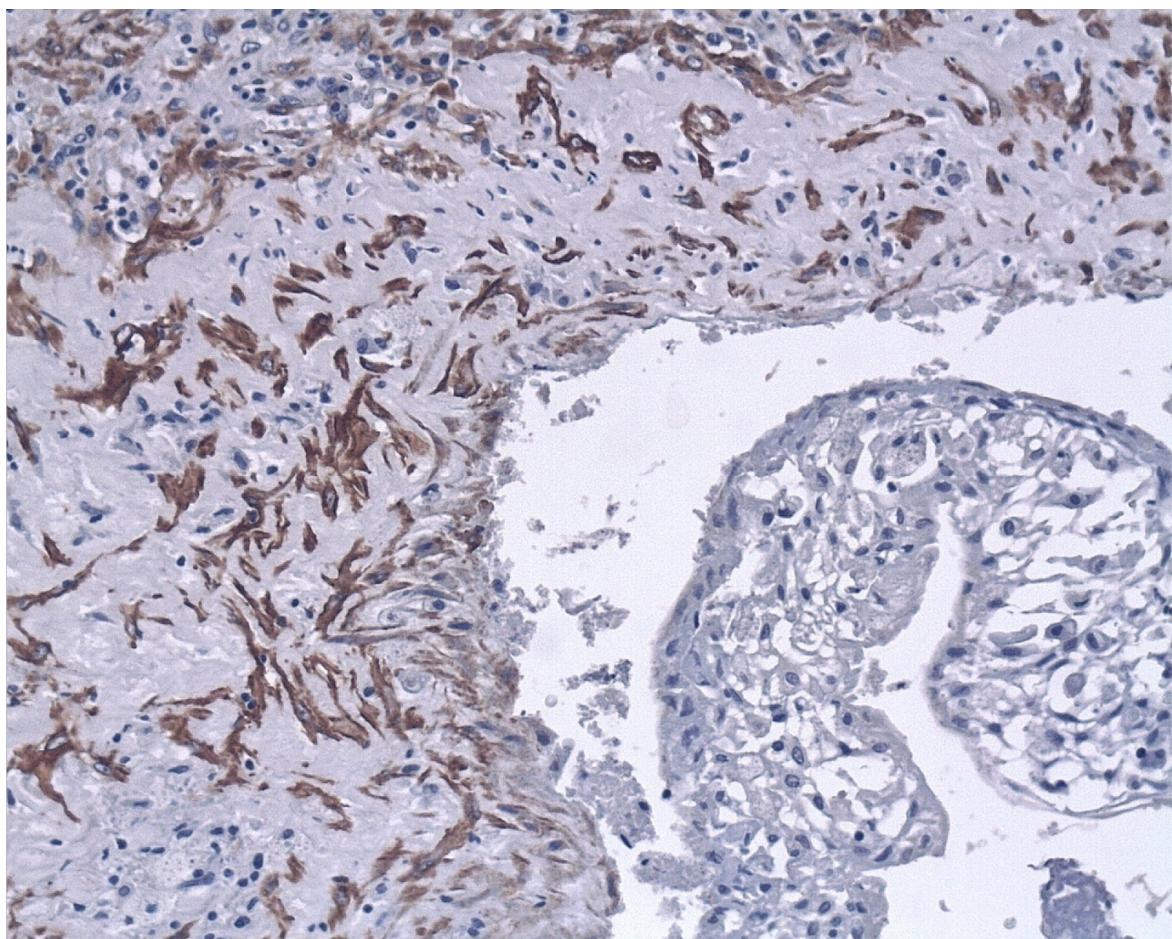


Figure 1 –Abundant positive cells for α -SMA in the fibrous capsule of radicular cyst (streptavidin-biotin-peroxidase method, original magnification, x200).

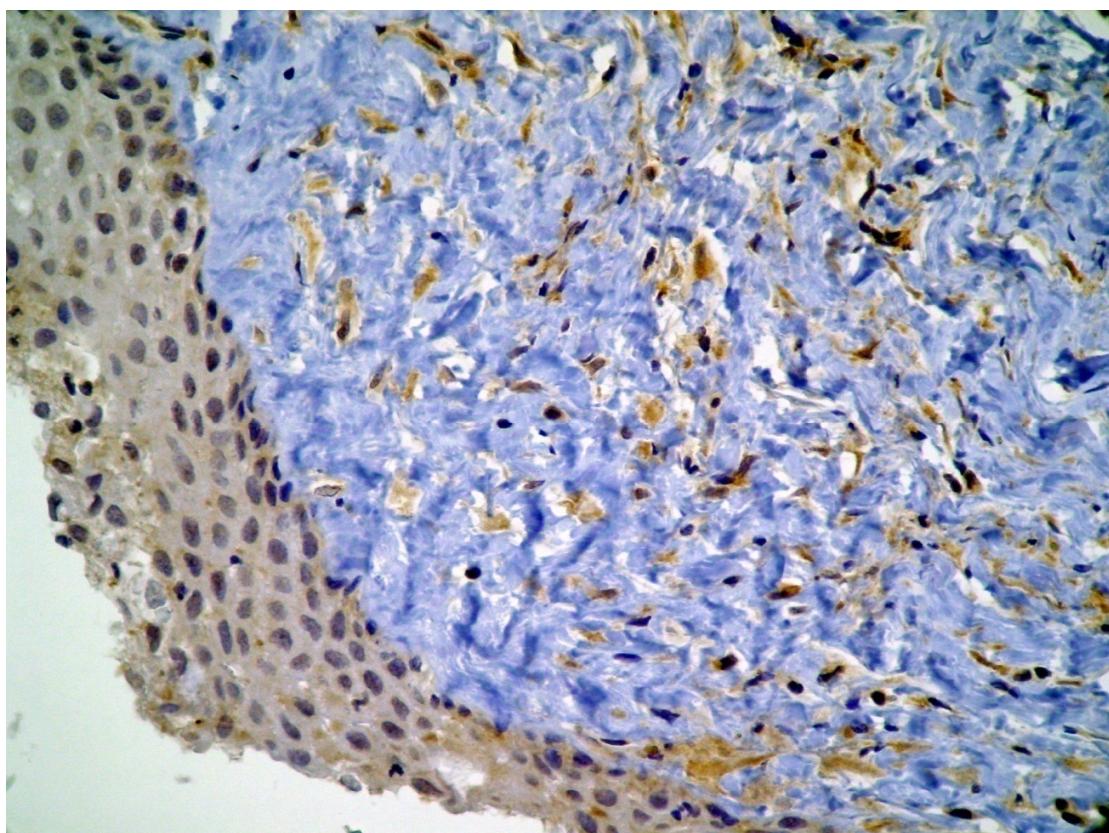


Figure 2 – Immunolocalization of MMP-2 in stroma of radicular cyst (streptavidin-biotin-peroxidase method, original magnification, x200).

Dentigerous Cyst

The expression of α -SMA was negative in 14 cases (63.6%), 7 (31.8%) presented scanty positive cells for α -SMA and one case (4.5%) had abundant positive cells. The expression of MMP-2 was weak in 20 cases (90.9%) and in 2 cases was negative (9.1%).

Keratocystic Odontogenic Tumor

Of the 17 cases of KOTs, 9 (52.9%) did not express α -SMA, 6 (35.2%) showed scanty positive cells (Fig. 3) and two (11.7%) had abundant positive cells. MMP-2 had weak positivity in 13 cases (76.4%), strong positivity in 3 (17.6%) and one case (5.8%) was negative.

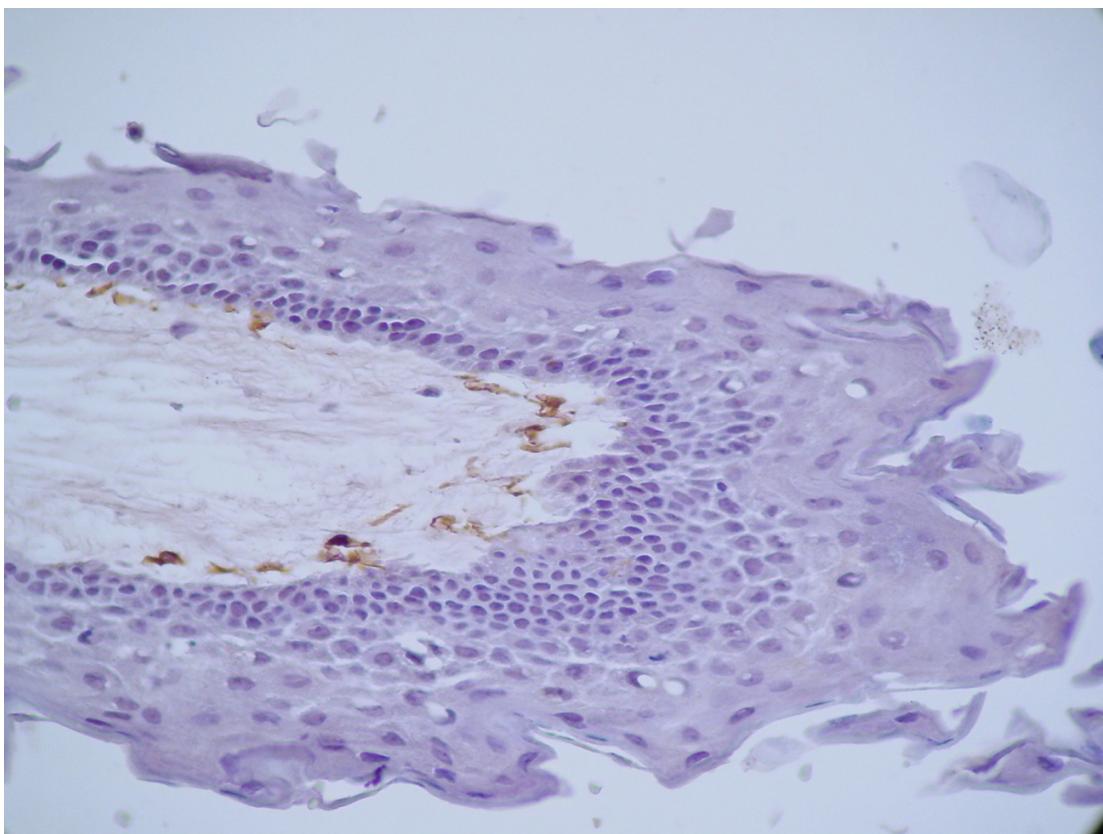


Figure 3 – Few α -SMA positive cells in the connective tissue adjacent to epithelial lining in keratocystic odontogenic tumor (streptavidin-biotin-peroxidase method, original magnification, x200)

Statistical Analysis

Although KOT had presented more MF than RC and DC, the statistical analysis evidenced no significant difference in the number of MF among the studied lesions ($p=0.7$). Regarding to the expression of MMP-2, significantly stronger expression was evidenced ($p=0.009$) in the RCs in comparison with the KOTs and DCs. No positive correlation between α -SMA and MMP-2 in RC, DC and KOT was observed. The data regarding to the immunohistochemical expression of α -SMA and MMP-2 are listed in Table 2.

Table 2 – Immunohistochemical expression of α -SMA and MMP-2 in radicular cysts (RC), dentigerous cysts (DC) and keratocystic odontogenic tumors (KOT)

Variables	Lesions			P-value
	RC	DC	KOT	
			n=17 (%)	
α-SMA expression				
Negative	23 (65.7)	14 (63.6)	9 (52.9)	0.7
Scanty	11 (31.4)	7 (31.8)	6 (35.3)	
Abundant	1 (2.9)	1 (4.6)	2 (11.8)	
MMP-2 expression				
Negative	0 (0.0)	2 (9.1)	1 (5.9)	0.009*
Weak	24 (70.6)	20 (90.9)	13 (76.5)	
Strong	10 (29.4)	0 (0.0)	3 (17.6)	

*Statistically significant

DISCUSSION

Cystic odontogenic lesions, such as RCs, DCs and KOTs, are originated from embryologic remnants of odontogenic epithelium; however, they exhibit different degrees of aggressiveness and biological behavior. Several factors related to the epithelium are associated with the distinct biological behavior of odontogenic lesions, such as cell proliferation markers, tumor suppressor genes and other proteins related to the pathways of cell cycle activity, such as HSP70 (Agaram *et al.* 2004, Kichi *et al.* 2005, Li *et al.* 1994, Malcic *et al.* 2008, Piattelli *et al.* 2001, Shear 2002). On the other hand, studies on mesenchymal factors that could be associated with the pathogenesis and development of odontogenic lesion are scarce.

Under normal and pathological conditions, the stroma is essential for the maintenance of the epithelial tissue. In pathological conditions, particularly in carcinomas, the epithelial cells induce the formation of a desmoplastic or reactional stroma, composed of inflammatory cells, small vessels, extracellular matrix components, fibroblasts and myofibroblasts. The differentiation of MF in the stroma plays an important function due to their capacity to produce collagen and synthesize enzymes, such as matrix metalloproteinase 2, which could be associated with tumor growth and progression (Desmouliere *et al.* 2004).

Studies have demonstrated that the increase of MF in the stroma of several malignant neoplasms, including those from oral cavity, is related to a worse

prognosis (Kellermann *et al.* 2007, Mukaratirwa *et al.* 2005, Offersen *et al.* 2003, Orimo & Weinberg 2006). In oral squamous cell carcinomas, the increase of MF was significantly correlated with lymph node metastases, vascular and perineural invasion, in addition to shorter overall survival. Furthermore, MF were not observed in the stroma of normal oral mucosa and leukoplakias with epithelial dysplasia, but approximately 60% of the squamous cell carcinomas contained a significant quantity of MF (Kellermann *et al.* 2007).

The presence of MF in odontogenic lesions has been few investigated, with scarce previously published reports in the English-language literature (Lombardi & Morgan 1995, Rothouse *et al.* 1980, Smith & Bartov 1986, Vered *et al.* 2005). The number of MF is significantly higher in KOT than in DC, correlating with a more aggressive clinical behavior (Vered *et al.* 2005). In the present study, although no statistically significant difference in the presence of MF was evidenced, KOT presented the highest number of cases positive for α -SMA, when compared to RC and DC. This finding suggests that the MF can be involved in the progression and maintenance of these lesions.

In malignant neoplasms, MMP-2 (72 KDa gelatinase A, collagenase type IV) and its inhibitor TIMP-2 play important function during the tumor progression, vascular invasion and metastases. Due to the capacity of MMP-2 to degrade type IV collagen, the main structural component of basal membrane, as well as the gelatins, its expression has been associated with the invasive phenotype and

metastatic potential of tumors (Egeblad & Werb 2002, Kumamoto *et al.* 2003, O’Grady *et al.* 2007).

In our study, all studied lesions were positive for MMP-2, with significantly stronger positivity being observed in the RCs. As the RCs presented inflammatory infiltrate of varied intensity in the conjunctive capsule, perhaps the higher expression of MMP-2 is related to the presence of inflammatory cells and IL-1 α , which stimulate MMP-2 production (Kubota *et al.* 2002, Oka *et al.* 2005).

MMP-2 positive stromal cells were observed in stroma from ameloblastoma, in close contact with bone tissue, suggesting that this gelatinase is capable of digesting bone matrix and contributing to tumor invasion (Pinheiro *et al.* 2004). Growth factors, including TGF- β 1 and tumoral necrosis factor-alpha (TNF α), which are produced in high quantities by the MFs, induce the secretion of MMP by MF, contributing to bone reabsorption (Porter *et al.* 2004). Thus, our findings indicate that the synthesis of MMP-2 and the presence of MF in the stroma can eventually contribute to adjacent bone tissue reabsorption and be important in the progression of the studied cystic lesions, although no positive correlation between α -SMA and MMP-2 had been observed.

In summary, MF and MMP-2 are frequent in RCs, KOTs and DCs, with greater expression of MF in KOTs and of MMP-2 in RCs. The presence of these components in the conjunctive capsule seems to contribute to bone reabsorption, favoring the development of these lesions.

REFERENCES

- Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, Finkelstein S, Hunt JL (2004) Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **128**, 313-317.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (2005) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours - World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press.
- Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R (2004) CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Virchows Archiv* **444**, 231-234.
- Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, Coletta RD (2006) Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 393-400.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration* **13**, 7-12.
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 509-517.
- De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *The Journal of Pathology* **200**, 429-447.

- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer* **2**, 161-174.
- Kellermann MG, Sobral LM, Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Nishimoto IN, Kowalski LP, Coletta RD (2007) Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology* **51**, 849-853.
- Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M (2005) Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **34**, 280-286.
- Kojc N, Zidar N, Vodopivec B, Gale N (2005) Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin, and transforming growth factor beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Human Pathology* **36**, 16-21.
- Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K (2002) Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. *Journal of Dental Research* **81**, 23-27.
- Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K (2003) Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **32**, 114-120.

- Li TJ, Browne RM, Matthews JB (1994) Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **23**, 184-189.
- Lombardi T, Morgan PR (1995) Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **24**, 170-176.
- Malcic A, Jukic S, Anic I, Pavelic B, Kapitanovic S, Kruslin B, Pavelic K (2008) Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **37**, 294-301.
- Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H (2005) Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. *International Journal of Experimental Pathology* **86**, 219-229.
- Offersen BV, Nielsen BS, Høyer-Hansen G, Rank F, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J, Andreasen PA (2003) The myofibroblast is the predominant plasminogen activator inhibitor-1-expressing cell type in human breast carcinomas. *The American Journal of Pathology* **163**, 1887-1899.
- O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E (2007) Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of

- metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology* **51**, 793-804.
- Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K (2005) Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *Journal of Dental Research* **84**, 913-918.
- Orimo A, Weinberg RA (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* **5**, 1597-1601.
- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C (2001) P53 protein expression in odontogenic cysts. *Journal of Endodontics* **27**, 459-461.
- Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG (2004) Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology* **45**, 65-72.
- Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Ball SG (2004) Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovascular Research* **64**, 507-515.
- Rothouse LS, Majack RA, Fay JT (1980) An ameloblastoma with myofibroblasts and intracellular septate junctions. *Cancer* **45**, 2858-2863.
- Shear M (2002) The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part I. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. *Oral Oncology* **38**, 219-226.

- Smith SM, Bartov SA (1986) Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. *Journal of Oral Pathology* **15**, 284-286.
- Sobral CS, Gragnani A, Cao X, Morgan JR, Ferreira LM (2007) Human keratinocytes cultured on collagen matrix used as an experimental burn model. *Journal of Burns and Wounds* **7**, e6.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **3**, 349-363.
- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D (2007a) Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncology* **43**, 999-1006.
- Vered M, Nasrallah W, Buchner A, Dayan D (2007b) Stromal myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws cannot distinguish between non-aggressive and aggressive lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **36**, 495-500.
- Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D (2005) Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncology* **41**, 1028-1033.



Considerações finais

Lesões císticas odontogênicas são formadas a partir de remanescentes embrionários de epitélio odontogênico. Entretanto, exibem características clínicas, histológicas, radiográficas e comportamento biológico distintos. Essas diferenças podem ser atribuídas às características específicas que o tecido epitelial adquire nas diferentes lesões císticas odontogênicas, provavelmente devido à proliferação celular e à diferenciação próprias de cada lesão. Vários fatores relacionados ao epitélio cístico estão associados ao comportamento biológico distinto dos cistos odontogênicos, como índices de proliferação celular, genes supressores de tumor e outras proteínas relacionadas a vias de atividade do ciclo celular. Entre as lesões císticas odontogênicas, destacam-se o cisto radicular, de origem inflamatória, o cisto dentígero e o tumor odontogênico queratocístico (BROWNE, 1975; LI et al., 1994; PIATTELLI et al., 2001; SHEAR, 2002; AGARAM et al., 2004; KICHI et al., 2005; MALCIC et al., 2008).

Embora os cistos sejam lesões epiteliais, a cápsula de tecido conjuntivo fibroso pode exercer funções importantes no desenvolvimento dessas lesões. Assim, além do estudo de proteínas envolvidas ou expressas em células epiteliais do revestimento, é importante identificar proteínas e células presentes na cápsula de tecido conjuntivo, que eventualmente podem participar da progressão das lesões císticas odontogênicas. Dessa forma, avaliou-se a expressão imunoistoquímica da proteína p53, do antígeno Ki-67 e da proteína syndecan-1 (CD138) nas células do revestimento epitelial e a expressão imunoistoquímica de

α -actina de músculo liso, para pesquisa de miofibroblastos e MMP-2 na cápsula de tecido conjuntivo.

Para analisar a expressão imunoistoquímica da proteína p53, Ki-67, syndecan-1 (CD138), α -actina de músculo liso e MMP-2 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos, realizou-se um estudo retrospectivo utilizando casos originados do arquivo do Serviço de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto, os quais estavam incluídos em parafina. Esse tipo de estudo é importante, pois pode revelar informações referentes a fatores prognósticos microscópicos e imunoistoquímicos associados às neoplasias malignas, assim como características histopatológicas e imunoistoquímicas que podem contribuir para melhor compreensão do início, desenvolvimento e comportamento biológico de várias patologias.

O syndecan-1 tem sua maior expressão em tecidos epiteliais bem diferenciados, sobretudo aqueles estratificados e pavimentosos que compõem a pele. Além disso, sua expressão tem sido correlacionada ao prognóstico de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (INKI et al., 1994) e ao potencial de malignização de lesões cancerizáveis (SOUKKA et al., 2000). Como as lesões císticas odontogênicas são essencialmente epiteliais, o syndecan-1 pode desempenhar papel importante no desenvolvimento e progressão dessas lesões. Entretanto, não há estudos que avaliem a expressão dessa proteína em cistos odontogênicos.

A diminuição da expressão de syndecan-1 nas células epiteliais altera a morfologia e organização celular, o arranjo e a expressão das moléculas de adesão e o controle do crescimento dependente da ancoragem, o que resulta num indicador de transformação celular maligna, crescimento invasivo e atipia celular, devido à diminuição da aderência intercelular e da célula com a matriz extracelular (KATO et al., 1995; MUKUNYADZI et al., 2002; BOLOGNA-MOLINA et al., 2008). Entretanto, a expressão de syndecan-1 também pode estar associada à diferenciação dos tumores de cabeça e pescoço. Os tumores pequenos e bem diferenciados expressam fortemente o syndecan-1, enquanto que os tumores indiferenciados sinalizam baixos níveis de syndecan-1 (INKI et al., 1994).

A expressão de syndecan-1 foi observada nos diferentes subtipos de ameloblastomas, em alterações displásicas do epitélio oral, além de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, onde a expressão diminuída correlacionou com aumento da capacidade invasiva da lesão, potencial de malignização, potencial metastático e pior prognóstico (INKI et al., 1994; SOUKKA et al., 2000; MUKUNYADZI et al., 2002; MUKUNYADZI et al., 2003; LEOCATA et al., 2007; BOLOGNA-MOLINA et al., 2008). Por outro lado, a maior expressão de syndecan-1 correlacionou com pior prognóstico em carcinomas de mama, pâncreas e no mieloma múltiplo (SANDERSON, 2001; SANDERSON; BØRSET, 2002; MAEDA et al., 2004; GÖTTE et al., 2007).

Nas lesões odontogênicas estudadas, a expressão do syndecan-1 no epitélio foi acentuada em todas as lesões, sendo positiva em 85,5% dos casos de cistos radiculares, 95,5% dos cistos dentígeros e presente em todos os casos de tumores odontogênicos queratocísticos. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significante. Interessantemente, nos cistos radiculares houve expressão diminuída ou ausente em regiões do epitélio localizadas em áreas com reação inflamatória intensa. Provavelmente, a agressividade causada pelas células inflamatórias no epitélio de revestimento, tenha contribuído para diminuir a expressão da proteína. Da mesma forma, nos tumores odontogênicos queratocísticos, em áreas de revestimento epitelial típico da lesão, a expressão se manteve forte mesmo na presença de células inflamatórias. Na presença de alteração morfológica do revestimento epitelial em áreas inflamadas, com hiperplasia epitelial e formação de projeções epiteliais em direção à cápsula, a expressão também era diminuída ou ausente. Outro achado interessante foi observado em um caso de tumor odontogênico queratocístico com displasia epitelial, que apresentava diminuição da expressão de syndecan-1.

O syndecan-1 participa praticamente de todos os processos envolvidos na modulação da inflamação, principalmente nas interações entre leucócitos e células endoteliais (GÖTTE, 2003), o que explica a sua expressão em células inflamatórias de 65,7% dos casos de cistos radiculares.

O Ki-67 foi significativamente mais expresso na camada suprabasal dos tumores odontogênicos queratocísticos, quando comparado às outras lesões estudadas. Estes resultados são consistentes com outros estudos (LI et al., 1994; LI et al., 1995; SUZUKI et al., 2005, KICH et al., 2005; CLARK et al., 2006). A expressão da p53 foi observada tanto na camada basal quanto na suprabasal em 68,5% dos cistos radiculares, 72,7% dos cistos dentígeros e 82,3% dos tumores odontogênicos queratocísticos. O aumento da expressão de p53 nos tumores odontogênicos queratocísticos em relação aos cistos radiculares e cistos dentígeros, embora não significativa, também foi observado de forma semelhante em outros estudos (LI et al., 1996; PIATTELLI et al., 2001; SHEAR, 2002; MALCIC et al., 2008).

Nos cistos radiculares e tumores odontogênicos queratocísticos, correlação positiva foi observada entre p53 e Ki-67, p53 e expressão e intensidade de syndecan-1, Ki-67 e expressão e intensidade de syndecan-1, e entre a expressão e intensidade de syndecan-1. A correlação entre a expressão de syndecan-1 e marcadores de proliferação celular sugere que syndecan-1 tenha importante papel na progressão e desenvolvimento dos cistos radiculares e tumores odontogênicos queratocísticos. Assim, o desenvolvimento e uso de medicações intracanais com inibidores de syndecan-1 nas suas composições em dentes portadores de cisto radicular poderiam contribuir para acelerar a regressão da lesão e, consequentemente, o processo de reparo ósseo periapical.

A ativação de miofibroblastos no estroma parece ser uma etapa importante no crescimento e progressão tumoral (DESMOULIÈRE et al., 2005). Recentes estudos demonstraram que o aumento da expressão de miofibroblastos no estroma de várias neoplasias malignas, incluindo aquelas de cavidade bucal, está relacionado a um pior prognóstico para os pacientes (OFFERSEN et al., 2003; DESMOULIÈRE et al., 2004; MUKARATIRWA et al., 2005; ORIMO et al., 2006; KELLERMANN et al., 2007). Em carcinomas espinocelulares da cavidade bucal, o aumento de miofibroblastos foi significativamente correlacionado à metástases linfonodais, invasão vascular e perineural, além de curta sobrevida global (KELLERMANN et al., 2007).

Embora o estroma seja essencial para a manutenção do tecido epitelial (TOMASEK et al., 2002), poucos estudos têm investigado fatores não relacionados ao epitélio, que poderiam estar associados à progressão e desenvolvimento de lesões císticas, como a presença de miofibroblastos (ROTHOUSE et al., 1980; SMITH et al., 1986; LOMBARDI et al., 1995; VERED et al., 2005). No presente estudo, avaliou-se a presença de miofibroblastos e MMP-2 em três lesões císticas odontogênicas distintas. O tumor odontogênico queratocístico apresentou maior número de casos positivos para α -actina de músculo liso, quando comparado aos cistos radicular e dentígero. Como reconhecidamente o tumor odontogênico queratocístico apresenta comportamento biológico mais agressivo que as outras

lesões estudadas, eventualmente a presença de miofibroblastos na cápsula de tecido conjuntivo pode desempenhar papel importante na progressão da doença.

Em relação à MMP-2, todas as lesões estudadas foram positivas, com positividade mais forte nos cistos radiculares. Como os cistos radiculares apresentam infiltrado inflamatório de intensidade variada na cápsula conjuntiva, talvez a maior expressão de MMP-2 esteja relacionada à presença de células inflamatórias.

Em resumo, miofibroblastos e MMP-2 apresentam freqüente positividade em cistos radiculares, tumores odontogênicos queratocísticos e cistos dentígeros, com maior expressão de miofibroblastos em tumores odontogênicos queratocísticos e de MMP-2 em cistos radiculares. A partir disso, esses componentes do estroma cístico podem ser importantes na progressão das lesões císticas estudadas. Adicionalmente, a expressão de syndecan-1 não parece ser um fator determinante para as características histopatológicas e progressão distintas das lesões císticas estudadas. Entretanto, devido à sua correlação positiva com p53 e Ki-67, o syndecan-1 parece estar envolvido na progressão de cistos radiculares e tumores odontogênicos queratocísticos.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão dessas lesões, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de se avaliar outras proteínas expressas no epitélio de revestimento e cápsula conjuntiva, utilizando além da imunoistoquímica, técnicas de biologia molecular.



Referências Bibliográficas

- AGARAM, N. P.; COLLINS, B. M.; BARNES, L.; LOMAGO, D.; ALDEEB, D.; SWALSKY, P.; FINKELSTEIN, S.; HUNT, J. L. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 128, n. 3, p. 313-317, 2004.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours - World Health Organization Classification of Tumours**, Lyon: IARC Press, 2005, 430 p.
- BARRETO, D. C.; GOMEZ, R. S.; BALE, A. E.; BOSON, W. L.; DE MARCO, L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 6, p. 1418-1422, 2000.
- BARTH, P. J.; SCHWEINSBERG, T. S.; RAMASWAMY, A.; MOLL, R. CD34+ fibrocytes, α -smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. **Virchows Arch.**, v. 444, n. 3, p. 231-234, 2004.
- BATTIFORA, H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. **Hum. Pathol.**, v. 25, n. 5, p. 435-437, 1994.
- BELLIN, R.; CAPILA, I.; LINCECUM, J.; PARK, P. W.; REIZES, O.; BERNFIELD, M. R. Unlocking the secrets of syndecans: transgenic organisms as a potential key. **Glycoconj. J.**, v. 19, n. 4-5, p. 295-304, 2002.

- BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.
- BITU, C. C.; SOBRAL, L. M.; KELLERMANN, M. G.; MARTELLI-JUNIOR, H.; GRANER, E.; COLETTA, R. D. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatoses. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n. 6, p. 393-400, 2006.
- BOLOGNA-MOLINA, R.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; LOPEZ-CORELLA, E.; ALMEIDA, O. P.; CARRASCO-DAZA, D.; GARCIA-VAZQUEZ, F.; FARFAN-MORALES, J. E.; IRIGOYEN-CAMACHO, M. E.; DAMIÁN-MATSUMURA, P. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 8, p. 805-811, 2008.
- BROWNE, R. M. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. **J. Oral Pathol.**, v. 4, n. 1, p. 31-46, 1975.
- CLARK, P.; MARKER, P.; BASTIAN, H. L.; KROGDAHL, A. Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 35, n. 9, p. 568-572, 2006.
- CURY, V. C.; SETTE, P. S.; SILVA, J. V.; ARAÚJO, V. C.; GOMEZ, R. S. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. **J. Endod.**, v. 24, n. 1, p. 36-37, 1998.

- DE OLIVEIRA RODINI, C.; BATISTA, A. C.; LARA, V. S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n. 1, p. 59-63, 2004.
- DE PAULA, A. M.; CARVALHAIS, J. N.; DOMINGUES, M. G.; BARRETO, D. C.; MESQUITA, R. A. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocysts: effect of inflammation. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, n. 10, p. 477-482, 2000.
- DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair Regen.**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 2005.
- DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, n. 5-6, p. 509-517, 2004.
- DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 429-447, 2003.
- EDAMATSU, M.; KUMAMOTO, H.; OYAMA, K.; ECHIGO, S. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005.

- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.
- FORMIGLI, L.; ORLANDINI, S. Z.; TONELLI, P.; GIANNELLI, M.; MARTINI, M.; BRANDI, M. L. Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 216-220, 1995.
- GABBIANI, G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. **Pathol. Res. Pract.**, v. 192, n. 7, p. 708-711, 1996.
- GAO, Z.; MACKENZIE, I. C.; RITTMAN, B. R.; KORSZUN, A. K.; WILLIAMS, D. M.; CRUCHLEY, A. T. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. **J. Oral Pathol.**, v. 17, n. 2, p. 84-90, 1988.
- GÖTTE, M. Syndecans in inflammation. **FASEB J.**, v. 17, n. 6, p. 575-591, 2003.
- GÖTTE, M.; ECHTERMEYER, F. Syndecan-1 as a regulator of chemokine function. **Scientific World Journal**, v. 11, n. 3, p. 1327-1331, 2003.
- GÖTTE, M.; KERSTING, C.; RADKE, I.; KIESEL, L.; WÜLFING, P. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma *in situ*. **Breast Cancer Res.**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2007.
- INKI, P.; JOENSUU, H.; GRENNMAN, R.; KLEMI, P.; JALKANEN, M. Association between syndecan-1 expression and clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br. J. Cancer**, v. 70, n. 2, p. 319-323, 1994.

- INKI, P.; STENBACK, F.; TALVE, L.; JALKANEN, M. Immunohistochemical localization of syndecan in mouse skin tumors induced by UV irradiation. Loss of expression associated with malignant transformation. **Am. J. Pathol.**, v. 139, n. 6, p. 1333-1340, 1991.
- KATASE, N.; NAGATSUKA, H.; TSUJIGIWA, H.; GUNDUZ, M.; TAMAMURA, R.; PWINT, H. P.; RIVERA, R. S.; NAKAJIMA, M.; NAOMOTO, Y.; NAGAI, N. Analysis of the neoplastic nature and biological potential of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated keratocystic odontogenic tumor. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 9, p. 550-554, 2007.
- 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**, v. 6, n. 5, p. 559-576, 1995.
- KELLERMANN, M. G.; SOBRAL, L. M.; DA SILVA, S. D.; ZECCHIN, K. G.; GRANER, E.; LOPES, M. A. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-853, 2007.
- KICHI, E.; ENOKIYA, Y.; MURAMATSU, T.; HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; ABIKO, Y.; SHIMONO, M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 5, p. 280-286, 2005.

KO, K. S.; DOVER, D. G.; JORDAN, R. C. Bilateral dentigerous cysts-report of an unusual case and review of the literature. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 65, n. 1, p. 49-51, 1999.

KOJC, N.; ZIDAR, N.; VODOPIVEC, B.; GALE, N. Expression of CD34, α -smooth muscle actin, and transforming growth factor β 1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. **Hum. Pathol.**, v. 36, n. 1, p. 16-21, 2005.

KUBOTA, Y.; NINOMIYA, T.; OKA, Y.; TAKENOSHITA, Y.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1 α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 6, p. 1423-1430, 2000.

KUBOTA, Y.; OKA, S.; NAKAGAWA, S.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1 α enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 1, p. 23-27, 2002.

KUMAMOTO, H.; YAMAUCHI, K.; YOSHIDA, M.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 2, p. 114-120, 2003.

KUSANO, K.; MIYaura, C.; INADA, M.; TAMURA, T.; ITO, A.; NAGASE, H.; KAMOI, K.; SUDA, T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by

- interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1338-1345, 1998.
- KUROKAWA, H.; MATSUMOTO, S.; MURATA, T.; YAMASHITA, Y.; TOMOYOSE, T.; ZHANG, M. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 9, p. 513-521, 2003.
- LEOCATA, P.; VILLARI, D.; FAZZARI, C.; LENTINI, M.; FORTUNATO, C.; NICÒTINA, P. A. Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 7, p. 394-399, 2007.
- LEONARDI, R.; CALTABIANO, R.; LORETO, C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. **Int. Endod. J.**, v. 38, n. 5, p. 297-301, 2005.
- LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 23, n. 4, p. 184-189, 1994.
- LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS) associated lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 221-226, 1995.

LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. **Mol. Pathol.**, v. 50, n. 1, p. 21-27, 1997.

LI, T. J.; BROWNE, R. M.; PRIME, S. S.; PATERSON, I. C.; MATTHEWS, J. B. p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 25, n. 5, p. 249-255, 1996.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 7, p. 464-471, 2003.

LOMBARDI, T.; MORGAN, P. R. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 4, p. 170-176, 1995.

MADRAS, J.; LAPOINTE, H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 74, n. 2, p. 165-165h, 2008.

MAEDA, T.; ALEXANDER, C. M.; FRIEDL, A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 64, n. 2, p. 612-621, 2004.

MAIN, D. M. Epithelial jaw cysts: 10 years of the WHO classification. **J. Oral Pathol.**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 1985.

- MALCIĆ, A.; JUKIĆ, S.; ANIĆ, I.; PAVELIĆ, B.; KAPITANOVIĆ, S.; KRUSLIN, B.; PAVELIĆ, K. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 5, p. 294-301, 2008.
- MUGLALI, M.; KOMERIK, N.; BULUT, E.; YARIM, G. F.; CELEBI, N.; SUMER, M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cysts fluids. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 185-189, 2008.
- MUKARATIRWA, S.; KONINKX, J. F.; GRUYS, E.; NEDERBRAGT, H. Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 86, n. 4, p. 219-229, 2005.
- MUKUNYADZI, P.; SANDERSON, R. D.; FAN, C. Y. The level of syndecan-1 expression is a distinguishing feature in behavior between keratoacanthoma and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. **Mod. Pathol.**, v. 15, n. 1, p. 45-49, 2002.
- MUKUNYADZI, P.; LIU, K.; HANNA, E. Y.; SUEN, J. Y.; FAN, C. Y. Induced expression of syndecan-1 in the stroma of head and neck squamous cell carcinoma. **Mod. Pathol.**, v. 16, n. 8, p. 796-801, 2003.

- NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, n. 9, p. 413-425, 2000.
- OFFERSEN, B. V.; NIELSEN, B. S.; HØYER-HANSEN, G.; RANK, F.; HAMILTON-DUTOIT, S.; OVERGAARD, J.; ANDREASEN, P. A. The myofibroblast is the predominant plasminogen activator inhibitor-1-expressing cell type in human breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 5, p. 1887-1899, 2003.
- O'GRADY, A.; DUNNE, C.; O'KELLY, P.; MURPHY, G. M.; LEADER, M.; KAY, E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumor progression. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 793-804, 2007.
- OKA, S.; KUBOTA, Y.; YAMASHIRO, T.; OGATA, S.; NINOMIYA, T.; ITO, S.; SHIRASUNA, K. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 10, p. 913-918, 2005.
- ORIMO, A.; WEINBERG, R. A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. **Cell Cycle**, v. 5, n. 15, p. 1597-1601, 2006.
- PAVELIĆ, B.; LEVANAT, S.; CRNIĆ, I.; KOBLER, P.; ANIĆ, I.; MANOJLOVIĆ, S.; SUTALO, J. PTCH gene altered in dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 30, n. 9, p. 569-576, 2001.

- PIATTELLI, A.; FIORONI, M.; SANTINELLI, A.; RUBINI, C. p53 protein expression in odontogenic cysts. **J. Endod.**, v. 27, n. 7, p. 459-461, 2001.
- PIATTELLI, A.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; FAVERO, L.; STROCCHI, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in odontogenic cysts. **Int. Endod. J.**, v. 37, n. 1, p 7-11, 2004.
- PILONI, M. J.; KESZLER, A.; ITOIZ, M. E. Agnor as a marker of malignant transformation in odontogenic keratocysts. **Acta. Odontol. Latinoam.**,v. 18, n. 1, p. 37-42, 2005.
- PINHEIRO, J. J.; FREITAS, V. M.; MORETTI, A. I.; JORGE, A. G.; JAEGER, R. G. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. **Histopathology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, 2004.
- PORTER, K. E.; TURNER, N. A.; O'REGAN, D. J.; BALL, S. G. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. **Cardiovasc. Res.**, v. 64, n. 1, p. 507-515, 2004.
- RENTON, A.; LLANOS, S.; LU, X. Hypoxia induces p53 through a pathway distinct from most DNA-damaging and stress-inducing agents. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 7, p. 1177-1182, 2003.
- REYNOLDS, J. J.; HEMBRY, R. M.; MEIKLE, M. C. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. **Adv. Dent. Res.**, v. 8, n. 2, p. 312-319, 1994.

ROTHOUSE, L. S.; MAJACK, R. A.; FAY, J. T. An ameloblastoma with myofibroblasts and intracellular septate junctions. **Cancer**, v. 45, n. 11, p. 2858-2863, 1980.

SANDERSON, R. D.; BØRSET, M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. **Ann. Hematol.**, v. 81, n. 3, p. 125-135, 2002.

SANDERSON, R. D.; HINKES, M. T.; BERNFIELD, M. Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. **J. Invest. Dermatol.**, v. 99, n. 4, p. 390-396, 1992.

SHEAR, M. Developmental odontogenic cysts. An update. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 1994.

SHEAR, M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part I. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. **Oral Oncol.**, v. 38, n. 3, p. 219-226, 2002.

SHEAR, M.; SPEIGHT, P. M. **Cysts of Oral and Maxillofacial Regions**, 4^a ed., Oxford: Blackwell Munksgaard, 2007. 223p.

SLOOTWEG, P. J. p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 393-397, 1995.

SMITH, S. M.; BARTOV, S. A. Ameloblastoma with myofibroblasts: first report. **J. Oral Pathol.**, v. 15, n. 5, p. 284-286, 1986.

- SOBRAL, L. M.; MONTAN, P. F.; MARTELLI-JUNIOR, H.; GRANER, E.; COLETTA, R. D. Opposite effects of TGF- β 1 and IFN- \square on transdifferentiation of myofibroblast in human gingival cell cultures. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 5, p. 397-406, 2007.
- SOUKKA, T.; POHJOLA, J.; INKI, P.; HAPONEN, R. Reduction of syndecan-1 expression is associated with dysplastic oral epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, n. 7, p. 308-313, 2000.
- STOLL, C.; STOLLENWERK, C.; RIEDIGER, D.; MITTERMAYER, C.; ALFER, J. Cytokeratin expression patterns for distinction of odontogenic keratocysts from dentigerous and radicular cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 9, p. 558-564, 2005.
- SUZUKI, T.; KUMAMOTO, H.; OOYA, K.; MOTEGI, K. Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions - correlation with inflammatory cells and epithelial cells. **Oral Dis.**, v. 7, n. 6, p. 336-343, 2001.
- SUZUKI, T.; KUMAMOTO, H.; KUNIMORI, K.; OOYA, K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 1, p. 46-52, 2005.
- TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **FASEB J.**, v. 20, n. 1, p. 9-22, 2006.

- TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.
- TOSIOS, K. I.; KAKARANTZA-ANGELOPONLON, E.; KAPRANOS, H. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 and p53 in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, n. 3, p. 139-144, 2000.
- TSUKAMOTO, G.; SASAKI, A.; AKIYAMA, T.; ISHIKAWA, T.; KISHIMOTO, K.; NISHIYAMA, A.; MATSUMURA, T. A radiologic analysis of dentigerous cysts and odontogenic keratocysts associated with a mandibular third molar. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 91, n. 6, p. 743-747, 2002.
- VERED, M.; ALLON, I.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 10, p. 999-1006, 2007.
- 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.**, v. 41, n. 10, p. 1028-1033, 2005.
- VERED, M.; NASRALLAH, W.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Stromal myofibroblasts in central giant cell granulomas of the jaws cannot distinguish between non-

aggressive and aggressive lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 8, p. 495-500, 2007.

WIJDENES, J.; DORE, J. M.; CLEMENT, C.; VERMOT-DESROCHES, C. CD 138. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 16, n. 2, p. 152-155, 2002.

ZIMMERMANN, P.; DAVID, G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. **FASEB J.**, v. 13, suppl., p. S91-S100, 1999.



Anexos

DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Para o estudo, foram selecionados 35 casos de cisto radicular, 17 de tumor odontogênico queratocístico e 22 de cisto dentígero, todos do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, diagnosticados entre 1994 e 2006. Consideraram-se como critérios de inclusão os casos de cisto radicular que apresentaram cavidade cística bem formada, com tecido epitelial de revestimento se mostrando bem diferenciado, pavimentoso e estratificado, além de disponibilidade de material arquivado em parafina suficiente para confirmação histopatológica e para novos cortes, que foram utilizados nas reações de imunoistoquímica. A disponibilidade de material também foi critério de inclusão para os cistos dentígeros e para os tumores odontogênicos queratocísticos.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo retrospectivo, cujos dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos das fichas clínicas dos pacientes. O estudo foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (Anexo).

A partir das amostras existentes nos blocos de parafina arquivados, realizaram-se novos cortes com 5 µm de espessura para a realização de coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análise morfológica e confirmação do diagnóstico. Após a revisão histopatológica e confirmação do diagnóstico, os blocos de parafina das lesões selecionadas foram seccionados para obtenção de cortes histológicos de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica descrita a seguir, pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Os cortes foram desparafinados, deixando-os por 24 horas em estufa a 60°C, xanol a 60°C por 20 minutos, xanol à temperatura ambiente por 20 minutos e, em seguida, hidratados em etanol 100%, 95%, 70% e água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi realizada fervendo-se a solução tampão de citrato 10 mM pH 6,0, em panela de pressão (Eterna®, Nigro Alumínio Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) destampada. Após isso, mergulharam-se as lâminas e lacrou-se a panela com a válvula de segurança aberta. Ocorrendo a saída do vapor saturado, abaixou-se a válvula de segurança e aguardou-se a pressurização total. Transcorridos 04 minutos, a panela ainda fechada ficou sob água corrente até a sua despressurização total, seguida por sua abertura e lavagem das lâminas em água corrente e destilada.

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada e por lavagens em água corrente e destilada e com

solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM, pH 7,4, por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se incubação com anticorpos primários diluídos em títulos previamente estabelecidos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma-Aldrich, cat # A9647, St. Louis, MO, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Foram realizadas três lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Os anticorpos primários utilizados, os clones, diluições e seus respectivos fabricantes, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
Anti-proteína p53	DO-7	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca
Anti-Ki67	MIB-1	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca
Anti-syndecan-1 (CD138)	MI15	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca
Anti-MMP-2	Policlonal	1:200	NeoMarkers
Anti- α -actina de músculo liso	1A4	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca

Seguiu-se a técnica com o sistema de amplificação, em que as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37° C com IgG biotinilada associada ao complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StrepABC Complex/HRP Duet, kit, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) seguida por três lavagens com tampão PBS, com 3 trocas de 3 minutos cada.

As lâminas foram então reveladas em solução substrato contendo 60 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma-Aldrich, cat # D-5637, St.

Louis, MO, EUA), 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol) em 100 mL de PBS incubadas por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas foram lavadas em água corrente e, posteriormente, em água destilada, sendo contra-coradas com Hematoxilina de Harris por um minuto. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e destilada e imersas duas vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Os cortes foram então desidratados em banhos de etanol 80%, 95% e 100% por duas vezes com duração de 30 segundos cada, seguidos de dois banhos de xilol durante 5 minutos cada um deles. Logo após, procedeu-se a montagem das lâminas com Entellan neu (Merck, cat #1.07961, Alemanha) e lamínulas. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações.

ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Para a avaliação da reação imunoistoquímica, foi utilizado microscópio óptico Nikon (Eclipse E600, Tóquio, Japão), analisando 10 campos com as objetivas de 40x em cada lâmina, totalizando 3.700 campos microscópicos analisados. A leitura das reações foi realizada por dois observadores que fizeram avaliações em separado da positividade ou negatividade da reação. Nos casos em que a marcação imunoistoquímica falhou ou não foi possível avaliar fragmento representativo da lesão, o caso foi considerado não avaliável, sendo descartado da

amostra. Considerou-se célula positiva aquela que apresentava coloração acastanhada, conferida pelo cromógeno DAB.

Para o syndecan-1 (CD138), foram consideradas células positivas aquelas que tiveram a membrana e/ou citoplasma marcados; para a MMP-2 e a α -actina de músculo liso, considerou-se a positividade citoplasmática; e para p53 e Ki-67, positividade nuclear. A porcentagem de células positivas em 10 campos de maior aumento (400x) foi utilizada para classificar cada lesão cística, utilizando os seguintes valores: CD138 (negativo: <5% de células positivas, expressão fraca: 5%-50% de células positivas, expressão forte: >50% de células positivas), Ki-67 (negativo: <5% de células positivas, expressão fraca: 5%-50% de células positivas, expressão forte: >50% de células positivas) e p53 (negativo: <5% de células positivas, positivo: $\geq 5\%$ de células positivas). A positividade das expressões de α -actina de músculo liso e de MMP-2 foi avaliada somente na cápsula fibrosa das lesões. Para α -actina de músculo liso, considerou-se a lesão negativa (-), escassa (+) ou abundante (++), seguindo os critérios de Kellerman et al. (2007), enquanto a imunoexpressão de MMP-2 foi classificada como negativa (-), positividade fraca (+) ou positividade forte (++), de acordo com a quantidade de MMP-2 imunoexpressa. Além disso, para o CD138, analisou-se a intensidade da positividade das células epiteliais (+: fraca intensidade; ++: forte intensidade).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi feita análise descritiva dos marcadores, identificando a freqüência absoluta e relativa das respostas obtidas. Depois, utilizando o programa estatístico SAS, foram comparadas a expressão dos marcadores entre as lesões pelo teste exato de Fisher e a correlação entre as proteínas estudadas em cada uma das lesões císticas, por meio da correlação de coeficiente de Spearman, adotando significância de 5%.

DETALHAMENTO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

H0) NÃO EXISTE DIFERENÇA ENTRE LESÃO E ESCORES;

H1) EXISTE DIFERENÇA ENTRE LESÃO E ESCORES;

REGRA DE DECISÃO (NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%):

SE O P-VALOR (MARCADO EM VERMELHO) FOR >0.05 ENTÃO NÃO REJEITA H0;

SE O P-VALOR (MARCADO EM VERMELHO) FOR <0.05 ENTÃO REJEITA H0

The FREQ Procedure

Table of lesao by p53

	<i>Lesão</i>		<i>p53</i>	
	<i>Frequency</i>			
	<i>Percent</i>			
	<i>Row Pct</i>			
	<i>Col Pct</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>Total</i>
<i>L1</i>	11	24	35	
	14.86	32.43	47.30	
	31.43	68.57		
	57.89	43.64		
<i>L2</i>	2	15	17	
	2.70	20.27	22.97	
	11.76	88.24		
	10.53	27.27		
<i>L3</i>	6	16	22	
	8.11	21.62	29.73	
	27.27	72.73		
	31.58	29.09		
<i>Total</i>	19	55	74	
	25.68	74.32	100.00	

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by p53

Fisher's Exact Test	
Table Probability (P)	0.0198
Pr <= P	0.3539

Sample Size = 74

The FREQ Procedure

Table of lesao by ki67BASAL

	lesao	ki67		
	Frequency			
	Percent			
	Row Pct			
	Col Pct	0	1	2
		Total		
L1	15	15	5	35
	20.27	20.27	6.76	47.30
	42.86	42.86	14.29	
	44.12	44.12	83.33	
L2	9	7	1	17
	12.16	9.46	1.35	22.97
	52.94	41.18	5.88	
	26.47	20.59	16.67	
L3	10	12	0	22
	13.51	16.22	0.00	29.73
	45.45	54.55	0.00	
	29.41	35.29	0.00	
Total	34	34	6	74
	45.95	45.95	8.11	100.00

Statistics for Table of lesao by ki67

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by ki67

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 0.0012

Pr <= P 0.4217

Sample Size = 74

The FREQ Procedure

Table of lesao by ki67 PARABASAL

lesao		ki67			
	Frequency				
	Percent				
	Row Pct				
Col Pct		0	1	2	Total
<i>L1</i>	34	1	0	35	35
	45.95	1.35	0.00	47.30	
	97.14	2.86	0.00		
	60.71	5.88	0.00		
<i>L2</i>	2	14	1	17	17
	2.70	18.92	1.35	22.97	
	11.76	82.35	5.88		
	3.57	82.35	100.00		
<i>L3</i>	20	2	0	22	22
	27.03	2.70	0.00	29.73	
	90.91	9.09	0.00		
	35.71	11.76	0.00		
<i>Total</i>		56	17	1	74
		75.68	22.97	1.35	100.00

Statistics for Table of lesao by ki67

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by ki67

Fisher's Exact Test	
Table Probability (P)	1.261E-11
Pr <= P	<0.0001

Sample Size = 74

The FREQ Procedure

Table of lesao by cd138 INTENSID

	lesao	cd138		
Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	0	1	2	Total
<i>L1</i>	5	6	24	35
	6.76	8.11	32.43	47.30
	14.29	17.14	68.57	
	83.33	60.00	41.38	
<i>L2</i>	0	1	16	17
	0.00	1.35	21.62	22.97
	0.00	5.88	94.12	
	0.00	10.00	27.59	
<i>L3</i>	1	3	18	22
	1.35	4.05	24.32	29.73
	4.55	13.64	81.82	
	16.67	30.00	31.03	
<i>Total</i>	6	10	58	74
	8.11	13.51	78.38	100.00

Statistics for Table of lesao by cd138

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by cd138

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 0.0018

Pr <= P 0.3224

Sample Size = 74

The FREQ Procedure

Table of lesao by cd138 ESPRESS

	lesao	cd138		
Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	0	1	2	Total
L1	5	9	0	14
	6.76	12.16	0.00	18.92
	35.71	64.29	0.00	
	83.33	52.94	0.00	
L2	0	1	37	38
	0.00	1.35	50.00	51.35
	0.00	2.63	97.37	
	0.00	5.88	72.55	
L3	1	7	14	22
	1.35	9.46	18.92	29.73
	4.55	31.82	63.64	
	16.67	41.18	27.45	
Total	6	17	51	74
	8.11	22.97	68.92	100.00

Statistics for Table of lesao by cd138

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by cd138

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 2.337E-13

Pr <= P **<0.0001**

Sample Size = 74

The FREQ Procedure

Iesao=L1

Table of tipo by ki67

	<i>tipo</i>		<i>ki67</i>	
	<i>Frequency</i>			
	<i>Percent</i>			
	<i>Row Pct</i>			
	<i>Col Pct</i>	0	1	2
				<i>Total</i>
<i>Basal</i>	15	15	5	35
	21.43	21.43	7.14	50.00
	42.86	42.86	14.29	
	30.61	93.75	100.00	
<i>parabasal</i>	34	1	0	35
	48.57	1.43	0.00	50.00
	97.14	2.86	0.00	
	69.39	6.25	0.00	
<i>Total</i>	49	16	5	70
	70.00	22.86	7.14	100.00

Statistics for Table of tipo by ki67

The FREQ Procedure

Statistics for Table of tipo by ki67

Iesao=L1

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 2.247E-07

Pr <= P **<0.0001**

Sample Size = 70

The FREQ Procedure

Iesao=L2

Table of tipo by ki67

	tipo	ki67		
	Frequency			
	Percent			
	Row Pct			
	Col Pct	0	1	2
		Total		
<i>Basal</i>	9	7	1	17
	26.47	20.59	2.94	50.00
	52.94	41.18	5.88	
	81.82	33.33	50.00	
<i>parabasal</i>	2	14	1	17
	5.88	41.18	2.94	50.00
	11.76	82.35	5.88	
	18.18	66.67	50.00	
<i>Total</i>	11	21	2	34
	32.35	61.76	5.88	100.00

Statistics for Table of tipo by ki67

The FREQ Procedure

Statistics for Table of tipo by ki67

Iesao=L2

Fisher's Exact Test

Table Probability (P)	0.0055
<i>Pr <= P</i>	0.0255

Sample Size = 34

The FREQ Procedure

lesao=L3

Table of tipo by ki67

	<i>tipo</i>		<i>ki67</i>	
		<i>Frequency</i>		
		<i>Percent</i>		
		<i>Row Pct</i>		
		<i>Col Pct</i>	0	1
				<i>Total</i>
	<i>basal</i>	10	12	22
		22.73	27.27	50.00
		45.45	54.55	
		33.33	85.71	
	<i>parabasal</i>	20	2	22
		45.45	4.55	50.00
		90.91	9.09	
		66.67	14.29	
	<i>Total</i>	30	14	44
		68.18	31.82	100.00

Statistics for Table of tipo by ki67

The FREQ Procedure

Statistics for Table of tipo by ki67

lesao=L3

Fisher's Exact Test

<i>Table Probability (P)</i>	0.0013
<i>Two-sided Pr <= P</i>	0.0028

Sample Size = 44

Table of lesao by actina

	<i>lesao</i>		<i>actina</i>	
	<i>Frequency</i>			
	<i>Percent</i>			
	<i>Row Pct</i>			
	<i>Col Pct</i>	0	1	2
				<i>Total</i>
<i>L1</i>	23	11	1	35
	31.08	14.86	1.35	47.30
	65.71	31.43	2.86	
	50.00	45.83	25.00	
<i>L2</i>	9	6	2	17
	12.16	8.11	2.70	22.97
	52.94	35.29	11.76	
	19.57	25.00	50.00	
<i>L3</i>	14	7	1	22
	18.92	9.46	1.35	29.73
	63.64	31.82	4.55	
	30.43	29.17	25.00	
<i>Total</i>	46	24	4	74
	62.16	32.43	5.41	100.00

Statistics for Table of lesao by actina

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by actina

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 0.0043

Pr <= P 0.7345

Sample Size = 74

Table of lesao by mmp

	<i>lesao</i>	<i>mmp</i>			
	<i>Frequency</i>				
	<i>Percent</i>				
	<i>Row Pct</i>				
	<i>Col Pct</i>	0	1	2	Total
<i>L1</i>	0	24	10	34	
	0.00	32.88	13.70	46.58	
	0.00	70.59	29.41		
	0.00	42.11	76.92		
<i>L2</i>	1	13	3	17	
	1.37	17.81	4.11	23.29	
	5.88	76.47	17.65		
	33.33	22.81	23.08		
<i>L3</i>	2	20	0	22	
	2.74	27.40	0.00	30.14	
	9.09	90.91	0.00		
	66.67	35.09	0.00		
<i>Total</i>	3	57	13	73	
	4.11	78.08	17.81	100.00	

Statistics for Table of lesao by mmp

The FREQ Procedure

Statistics for Table of lesao by mmp

Fisher's Exact Test

Table Probability (P) 9.768E-05

Pr <= P 0.0094

Sample Size = 73

The CORR Procedure – LESAO 1

Spearman Correlation Coefficients, N = 35					
Prob > r under H0: Rho=0					
	p53	ki67BASAL	ki67PARABASAL	cd138INTENSID	cd138ESPRESS
p53	1.00000	0.36562 0.0308	0.11611 0.5066	0.60669 0.0001	0.39025 0.0205
ki67BASAL	0.36562 0.0308	1.00000	-0.18524 0.2867	0.40499 0.0158	0.23237 0.1792
ki67PARABASAL	0.11611 0.5066	-0.18524 0.2867	1.00000	0.11409 0.5140	0.13593 0.4362
cd138INTENSID	0.60669 0.0001	0.40499 0.0158	0.11409 0.5140	1.00000	0.70725 <.0001
cd138ESPRESS	0.39025 0.0205	0.23237 0.1792	0.13593 0.4362	0.70725 0.0001	1.00000

The CORR Procedure– LESAO 2

Spearman Correlation Coefficients, N = 17					
	Prob > r under H0: Rho=0				
	p53	ki67BASAL	ki67PARABASAL	cd138INTENSID	cd138ESPRESS
p53	1.00000	0.33665 0.1864	0.39276 0.1189	0.68465 0.0024	0.68465 0.0024
ki67BASAL	0.33665 0.1864	1.00000	0.25000 0.3332	0.23049 0.3735	0.23049 0.3735
ki67PARABASAL	0.39276 0.1189	0.25000 0.3332	1.00000	0.57622 0.0155	0.57622 0.0155
cd138INTENSID	0.68465 0.0024	0.23049 0.3735	0.57622 0.0155	1.00000	1.00000 <.0001
cd138ESPRESS	0.68465 0.0024	0.23049 0.3735	0.57622 0.0155	1.00000 <.0001	1.00000

The CORR Procedure—LESAO 3

Spearman Correlation Coefficients, N = 22					
	Prob > r under H0: Rho=0				
	p53	ki67BASAL	ki67PARABASAL	cd138INTENSID	cd138ESPRESS
p53	1.00000	0.26087 0.2409	-0.16137 0.4731	0.21569 0.3350	0.34330 0.1178
ki67BASAL	0.26087 0.2409	1.00000	0.28868 0.1926	0.28938 0.1915	0.10235 0.6504
ki67PARABASAL	-0.16137 0.4731	0.28868 0.1926	1.00000	0.14851 0.5095	-0.07387 0.7439
cd138INTENSID	0.21569 0.3350	0.28938 0.1915	0.14851 0.5095	1.00000	0.45027 0.0355
cd138ESPRESS	0.34330 0.1178	0.10235 0.6504	-0.07387 0.7439	0.45027 0.0355	1.00000



Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2006

Prezado Senhor,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“ESTUDO IMUNOISTOQUIO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE CITOQUERATINAS PTHRP, KI-67 E CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM CISTOS PERIAPICIAIS, CISTOS DENTIGEROS E TUMORES ODONTOGÊNICOS QUERATOCÍSTICOS”**, tendo como pesquisador Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez, registrado sobre o ComEt: 085/06.

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

Solicitamos que a senhora encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,


Profª Drª Luciana Rezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da UNAERP
Universidade de Ribeirão Preto

CARTAS DE CONFIRMAÇÃO DE ENVIO DOS ARTIGOS

ARTIGO 1: SYNDECAN-1, Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS IN ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS

Em **seg, 6/10/08, The Journal of Endodontics <JEndodontics@uthscsa.edu>** escreveu:

De: The Journal of Endodontics <JEndodontics@uthscsa.edu>

Assunto: Submission Confirmation for SYNDECAN-1, Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS IN ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS

Para: perezdec2003@yahoo.com.br

Data: Segunda-feira, 6 de Outubro de 2008, 19:36

Dear Dr. Perez,

Your submission entitled "SYNDECAN-1 PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN THE DEVELOPMENT OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS" has been received by the Journal of Endodontics

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the JOE web site as an author.

The URL is <http://joe.edmgr.com/>.

your username:

your password:

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the JOE.

Kind regards,

Journal of Endodontics

ARTIGO 2: MYOFIBROBLASTS AND MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) IN STROMA OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

International Endodontic Journal - Account Created in Manuscript Central

Segunda-feira, 26 de Janeiro de 2009 18:10

De: "iejeditor@cardiff.ac.uk" <iejeditor@cardiff.ac.uk>Adicionar remetente à lista de contatos
Para: nadalinmr@yahoo.com.br26-Jan-2009

Dear Dr. Nadalin

A manuscript titled MYOFIBROBLASTS AND MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) IN STROMA OF ODONTOGENIC CYSTIC LESIONS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY (IEJ-09-00029) has been submitted by to the International Endodontic Journal.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

USER ID: nadalinmr@yahoo.com.br

PASSWORD: XXXXXX

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/iej> to update your account information and change your password.

Thank you for your choosing to submit your article to the International Endodontic Journal

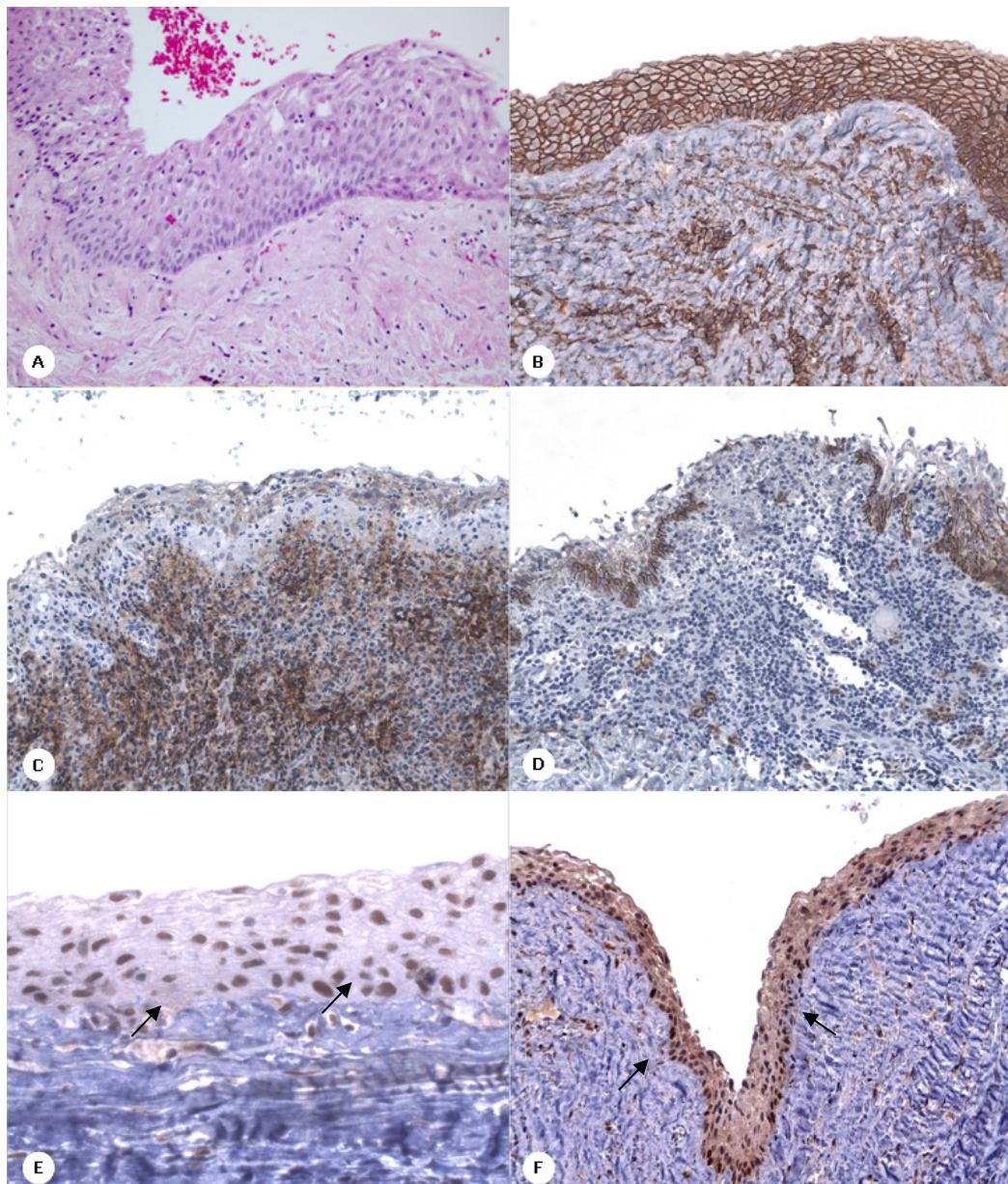
Kind regards

Sue Bryant

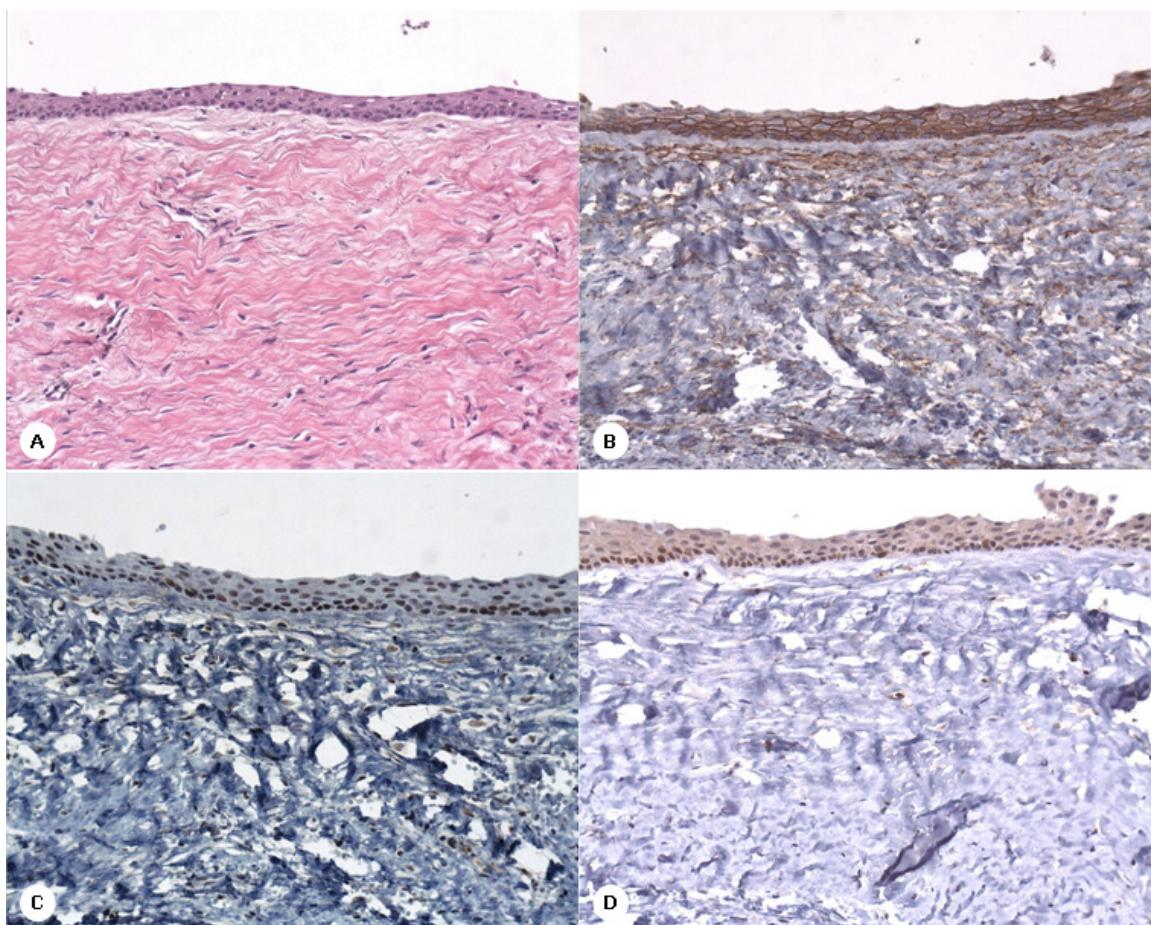
International Endodontic Journal Editorial Office

iejeditor@cardiff.ac.uk

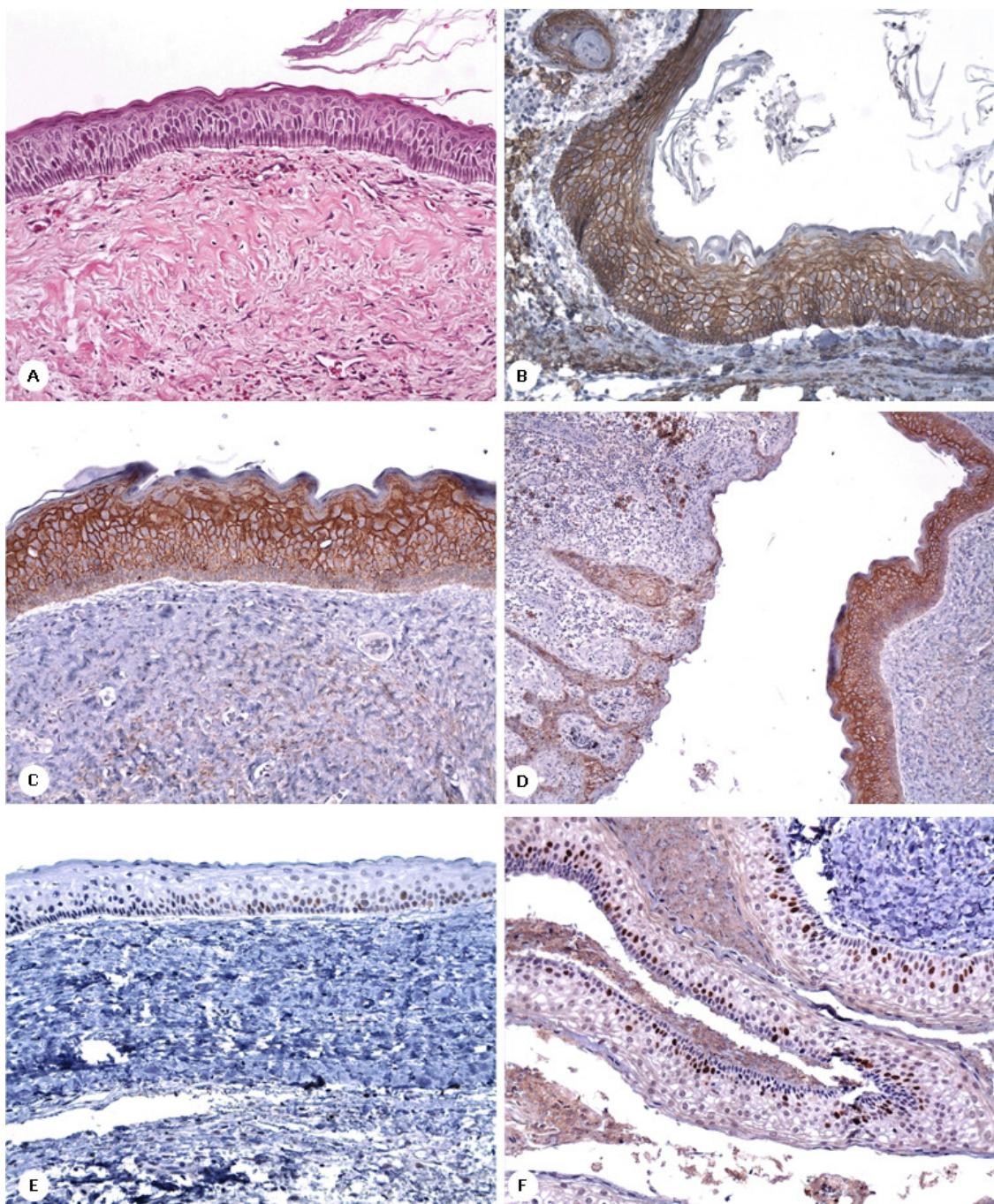
FOTOMICROGRAFIAS



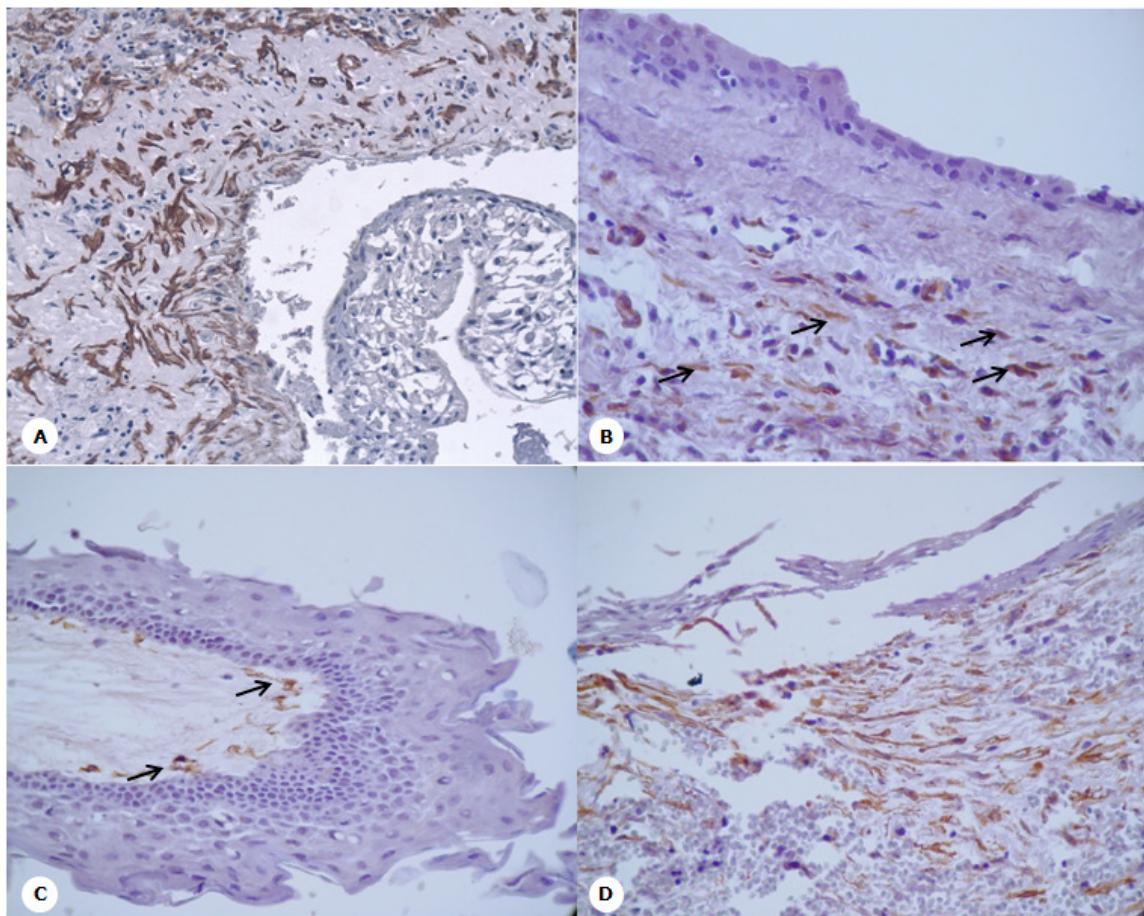
Cisto Radicular. **A.** Aspecto microscópico clássico, com cavidade cística revestida por epitélio estratificado, pavimentoso e não queratinizado (hematoxilina-eosina) (200x). **B.** Expressão forte de syndecan-1 no epitélio cístico (200x). **C.** Diminuição da expressão de syndecan-1 no epitélio cístico em regiões com infiltrado inflamatório. Presença de expressão forte de syndecan-1 nas células inflamatórias da cápsula (200x). **D.** Apenas as células da camada basal apresentam-se positivas para o syndecan-1 em áreas com intenso infiltrado inflamatório (200x). **E.** Expressão de p53 nas células da camada basal e suprabasal do epitélio (setas) (200x). **F.** Expressão de Ki-67 na camada epitelial (setas) (400x) (estreptavidina-biotina-peroxidase).



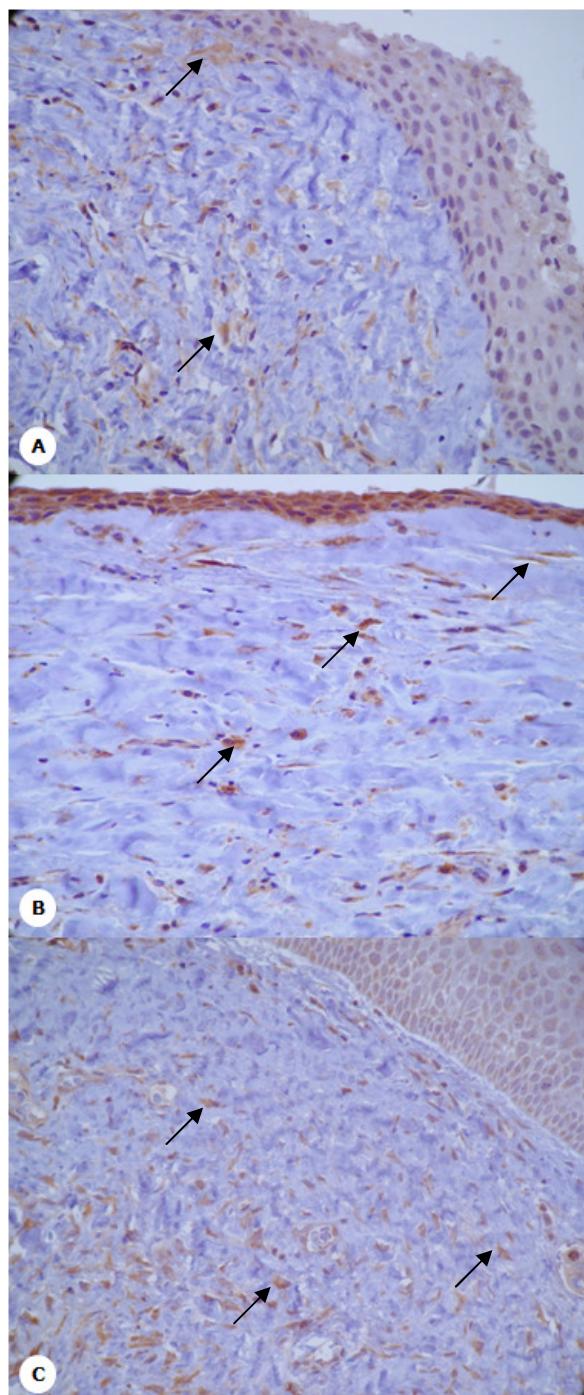
Cisto Dentígero. **A.** Aspecto microscópico clássico, com epitélio arranjado em quatro camadas celulares (hematoxilina-eosina) (200x). **B.** Expressão forte de syndecan-1 nas células epiteliais da camada cística (200x). **C.** Expressão do p53 na camada epitelial (200x) **D.** Expressão de Ki-67 nas células epiteliais (200x) (estreptavidina-biotina-peroxidase).



Tumor odontogênico queratocístico. **A.** Aspecto microscópico clássico, com camada de paraqueratina corrugada e células da camada basal dispostas em paliçada (hematoxilina-eosina, 200x). **B, C** – Forte e intensa expressão de syndecan-1 no revestimento epitelial (200x). **D**. Expressão forte e intensa de syndecan-1 onde a morfologia típica da lesão foi mantida (à direita) e ausência da expressão de syndecan-1 na região epitelial intimamente relacionada à reação inflamatória (à esquerda) (200x). **E**. Expressão imunoistoquímica de p53 nas camadas basal e suprabasal (200x). **F**. Expressão imunoistoquímica de Ki-67 predominantemente nas células da camada suprabasal (200x) (estreptavidina-biotina-peroxidase).



Expressão imunoistoquímica da α -SMA nas lesões císticas odontogênicas. **A.** Presença abundante de células positivas na cápsula fibrosa do cisto radicular. **B.** Presença escassa de células positivas na cápsula fibrosa do cisto dentígero (setas). **C.** Poucos miofibroblastos no tecido conjuntivo adjacente ao tecido epitelial de um tumor odontogênico queratocístico (setas). **D.** Presença abundante de células positivas no tumor odontogênico queratocístico. (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).



Expressão imunoistoquímica de MMP-2 na cápsula fibrosa de lesões císticas odontogênicas. **A.** Positividade fraca de MMP-2 no cisto radicular (setas). **B.** Positividade fraca na cápsula de tecido conjuntivo do cisto dentígero (setas). **C.** Positividade escassa na cápsula do tumor odontogênico queratocístico (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)