

CAMILA STEVANELI FREITAS

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CISTOS E
TUMORES ODONTOGÊNICOS**

CAMPO GRANDE
2016

CAMILA STEVANELI FREITAS

**EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CISTOS E
TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Mara Giordano de Barros.

CAMPO GRANDE
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA STEVANELI FREITAS

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Aos meus **pais**, Luiz Sérgio Fraga Freitas e Lucilene Stelato Stevaneli Freitas, pelo amor, compreensão, ajuda e pelo exemplo que sempre foram para mim.

A minha **irmã**, Ana Carolina Stevaneli Freitas, que é minha melhor amiga.

Ao meu **noivo** e futuro marido Newton Salvador Grande Neto.

A todas as **pessoas que amo**.

A **todos** que participaram da minha formação.

AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, que sempre está comigo, me protegendo, me guiando e me ajudando.
- A minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Rosana Mara Giordano de Barros**, que doou seu conhecimento, seu tempo, sua paciência e esteve sempre presente.
- À **Prof.^a Dr.^a Márcia Rodrigues Gorisch**, pela colaboração na etapa das análises das lâminas.
- À **Prof.^a Dr.^a Elenir Rose Jardim Cury Pontes**, pelo trabalho estatístico realizado nesta pesquisa.
- À **Sílvia Roberta Cieslak Sanches**, pela ajuda, paciência e cooperação.
- À **Evelin** do Comitê de Ética da UFMS, que com paciência e dedicação auxiliou na submissão desta pesquisa.
- A **todos os funcionários** da FAODO/UFMS que colaboraram diretamente ou indiretamente para esta pesquisa.
- A minha **família**, que está sempre ao meu lado me apoiando.
- A todos meus **colegas de turma**.
- A **todos** que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.
- À **CAPES**, pela bolsa.

*“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho,
Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!”*

(Machado de Assis)

RESUMO

Freitas CS. Expressão das metaloproteínases -2 e -9 em cistos e tumores odontogênicos. Campo Grande; 2016. [Dissertação - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

As metaloproteínases da matriz (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação das membranas basais e dos componentes da matriz extracelular. Elas podem degradar as macromoléculas da matriz, proteoglicanas, fibronectina, colágeno intersticial, laminina, entre outros. Estas enzimas estão relacionadas à agressividade e proliferação em cistos e tumores odontogênicos. Estas patologias merecem maior atenção dos cirurgiões-dentistas por afetar em maiores números a maxila e mandíbula. O exame clínico e radiográfico pode viabilizar diagnósticos destas patologias em seus estágios iniciais, possibilitando uma melhor terapêutica. Os tumores odontogênicos compreendem um grupo de neoplasias, geralmente assintomáticos e benignos, porém com potencial para se tornarem malignos. Revestidos por epitélio, os cistos são cavidades patológicas que ocorrem nos tecidos, que em seu interior contém material semi-fluído ou fluído. Normalmente são benignos e assintomáticos, mas podem atingir grandes dimensões. Justifica-se o trabalho devido a expressão das MMPs estarem associadas à expansão de cistos e tumores, podendo alcançar grandes dimensões e causar: expansão óssea, dores, reabsorções radiculares, perda dental e em determinados casos, cirurgias radicais como a mandibulectomia. Células tumorais são capazes de produzir MMPs. A invasividade de uma neoplasia pode ser modulada pelas MMPs e estão envolvidas com metástases tumorais. O objetivo desta pesquisa é identificar a expressão de MMPs -2 e -9 pela técnica imuno-histoquímica em cistos e tumores odontogênicos encontrados no Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2000 e 2014, correlacioná-los e verificar quais se mostraram mais agressivos. As lâminas foram confeccionadas utilizando a técnica imuno-histoquímica. A análise histológica foi realizada por dois patologias, respeitando os escores: - (ausência de marcação), + (marcação focal, menos de 10% de células marcadas) e ++ (marcação difusa – mais de 10% das células marcadas). Esta marcação também foi classificada como fraca, moderada ou intensa. O ameloblastoma apresentou expressão significativa para MMP-2 em epitélio ($p < 0,001$) e para MMP-9 em tecido conjuntivo ($p < 0,001$). O ceratocisto e o cisto dentígero apenas para MMP-9 em tecido conjuntivo ($p < 0,001$ e $p = 0,005$ respectivamente). Entre as 3 lesões não houve diferenças significantes para a expressão das MMPs-2 e MMPs-9. Nenhuma das lesões demonstraram possuir maior agressividade.

Palavras-chave: ameloblastoma, cisto dentígero, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Freitas CS. Expression of metalloproteinases -2 and -9 in odontogenic cysts and tumors. Campo Grande; 2016 [Dissertation - Faculty of Dentistry, Federal University of Mato Grosso do Sul].

Matrix's metalloproteinases are enzymes responsible for degradation of basement membranes and extracellular matrix components. They can degrade macromolecules of matrix, proteoglycans, fibronectin, interstitial collagen, laminin, and others. These enzymes are related with the aggressiveness and proliferation on cysts and odontogenic tumors. These pathologies demand more attention of dentist, because they affect in larger numbers maxilla and mandible. A clinical and radiographic examination can enable the diagnosis of these pathologies in early stages, making possible a better treatment. Odontogenic tumors include a group of neoplasias, usually asymptomatic and benign, but with potential to become malignant. Epithelium coated, cysts are pathological cavities occurring in tissues, that have fluid or semi fluid material inside. They are normally benign and asymptomatic, but can reach great dimensions. This work is justified because the MMPs expressions are associated with cysts and tumors expansion, reaching great dimension, and causing: bone expansion, pain, root resorption, tooth loss and, in some cases, radical surgery like mandibulectomy. Tumor cells are capable to produce MMPs. A neoplasia's invasiveness can be modulated by MMPs, and they are involved in tumor metastasis. The objective of this study is identify the expression of metalloproteinases -2 and -9 , using the immunohistochemical technique, in odontogenic cysts and tumors of the Anatomopathology Laboratory of Dentistry College of Federal University of Mato Grosso do Sul, between the years of 2000 and 2014, correlate them, and verify which of them showed more aggressiveness. The slides were made using the immunohistochemical technique. The histological analysis was made by two pathologists, respecting the scores: - (no markers), + (focal marks, less than 10% of cells marked), ++ (diffuse marks, more than 10% of cells marked). This marks were also classified as: weak, moderate and intense. Ameloblastoma showed significant expression of MMP-2 on epithelium and of MMP-9 on conjunctive tissue. Keratocyst and dentigerous cyst showed just of MMP-9 on conjunctive tissue. There was no significant difference among the three lesions for the expression of MMP-2 and MMP-9. None of them showed more aggressiveness.

Keywords: ameloblastoma, dentigerous cyst, immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média, desvio padrão (DP) e Mediana dos valores da expressão MMPs - 2 e MMPs -9 em lâminas, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).....	55
Tabela 2 – Média, desvio padrão (DP) e Mediana dos valores da expressão MMPs -2 e MMPs -9 em lâminas, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número e porcentagem de lâminas segundo o gênero e o tipo de tumor ou cisto, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).....	52
Gráfico 2 – Número e porcentagem de lâminas segundo o a faixa etária e o tipo de tumor ou cisto, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116). Em 4 (quatro) lâminas não havia informação em relação a idade do paciente.....	52
Gráfico 3 – Número e porcentagem de lâminas segundo o tipo de tumor ou cisto e o tecido afetado, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).....	53
Gráfico 4 – Porcentagem de lâminas segundo a imunomarcacão da expressão MMPs -2 e MMPs -9, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografias da região estromal das lesões.....	49
Figura 2 – Fotomicrografias da região estromal das lesões.....	49
Figura 3 – Fotomicrografia de tecido epitelial do ameloblastoma.....	50
Figura 4 – Fotomicrografia das células semelhantes ao retículo estrelado do ameloblastoma.....	50
Figura 5 - Fotomicrografia de tecido epitelial do ceratocisto.....	51
Figura 6 - Fotomicrografia de tecido epitelial do cisto dentífero.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECM	Matriz Extracelular
F	Fraco
FAODO	Faculdade de Odontologia
1G	Guanina Única
2G	Duas Guaninas
HE	Hematoxilina Eosina
I	Intenso
IHQ	Imuno-histoquímica
M	Moderado
MEC	Matriz Extracelular
MMP(s)	Metaloproteinase(s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
RECK	Proteínas Indutoras de Reversão Cisteína
RNA	Ácido Ribonucleico
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
T	Tumor
TC	Tomográfica Computadorizada
TGF β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TIMP(s)	Inibidore(s) Tecidual(is) de Metaloproteinase(s)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
=	Igual
L	Litro
>	Maior
®	Marca Registrada
<	Menor
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
mm	Milímetro
-	Negativo
%	Porcentagem
+	Positivo
x	Vezes
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Metaloproteinases	17
2.2 Lesões orofaciais	20
2.3 Tumores odontogênicos	21
2.3.1 Tumor odontogênico ameloblástico	22
2.3.2 Ameloblastomae MMPs	26
2.3.3 Diagnóstico e tratamento do ameloblastoma	28
2.4 Cistos odontogênicos	31
2.4.1 Cistos odontogênicos e MMPs	31
2.4.2 Ceratocistos odontogênicos – Características gerais	33
2.4.3 Diagnóstico e tratamento do ceratocisto odontogênico	35
2.4.4 Cisto Dentífero – Características gerais	37
2.4.5 Diagnóstico e tratamento do cisto dentífero	39
2.5 Técnica imuno-histoquímica – Aspectos gerais	40
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODO	44
4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética	44
4.2 Seleção dos blocos e dos materiais	44
4.3 Preparo das lâminas	44
4.4 Técnica imuno-histoquímica	45
4.5 Aplicação do cromógeno e contra-coloração com hematoxilina	46
4.6 Avaliação histológica	47
4.7 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Guimarães et al. (2010), cistos e tumores em geral podem sofrer ação de várias substâncias, entre elas, algumas proteinases como as metaloproteinases (MMPs).

Com influências importantes tanto na remodelação do tecido como durante o desenvolvimento patológico, as MMPs têm sido assunto de estudos recentes. Constituem uma família de 24 enzimas separadas por grupos: collagenases, gelatinases, estromelinas, tipo membrana e outras (SILVEIRA et al., 2007).

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular (MEC) quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas e são expressas em vários tipos celulares e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias e tumorais. A atividade das MMPs pode ser regulada por vários fatores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo. Dentre as várias metaloproteinases, destacam-se as MMPs -2 e -9 por estarem diretamente ligadas com metástases cancerosas (GUIMARÃES et al., 2010).

A fim de viabilizar diagnósticos de doenças bucais em seus estágios iniciais para uma melhor terapêutica, o exame visual clínico e de imagem da boca tem sido uma estratégia de prevenção. Tumores e cistos bucais diagnosticados em estágio inicial proporcionam ao paciente um melhor prognóstico. A odontogênese explica a maior ocorrência de cistos e tumores nos ossos gnáticos, já que todos estes se desenvolvem a partir da proliferação e multiplicação de restos epiteliais (ANTUNES et al., 2007; VAROLI et al., 2010).

A percepção em saúde bucal de cada indivíduo, além de se relacionar com os aspectos físicos e sugestivos da boca, também sofre grande influência dos fatores econômicos, sociais, idade e sexo. As patologias em geral, para serem percebidas pelos pacientes, dependem de uma série de questões, como: crenças, critérios de valor atribuídos a saúde perdida e conhecimento da pessoa afetada. Desta forma, a avaliação feita por profissionais e especialistas se difere das realizadas por pacientes, pois estes possuem conceitos de má saúde e doença determinados por fatores culturais (REIS & MARCELO, 2006).

Assunto de grande interesse para os patologistas bucais, os tumores odontogênicos formam um grupo heterogêneo de lesões com diversas

manifestações clínicas e características histológicas, que surgem durante o processo da odontogênese ou depois desta finalizada. Considerado benigno, alguns com potencial de malignidade, e bastante invasivo. Sua agressividade está associada a fatores relacionados às próprias células tumorais e a fatores externos. Essas patologias não se encontram apenas em determinadas regiões do mundo, mas sim em diversas áreas geográficas. Porém, alguns estudos mostram a prevalência em determinadas áreas, e há poucos estudos publicados sobre frequência dessas patologias no Brasil e na América Latina. A complexidade dos tumores odontogênicos decorre da origem de diversos folhetos embrionários. Alguns têm origem ectodérmica, e outros mesodérmica (AVELAR et al., 2008; HENRIQUES et al., 2009).

Segundo Silva et al. (2004) o ameloblastoma, é um tumor odontogênico neoplásico caracterizado basicamente pela proliferação de epitélio odontogênico, originado da lâmina dentária, com capacidade infiltrativa e destrutiva nos tecidos adjacentes. A classificação do ameloblastoma ocorre de acordo com as suas características clínicas e radiográficas. É considerado bastante agressivo e de grande invasividade local, com tratamento radical-mutilante. Sua agressividade está ligada a diversos fatores, entre eles a capacidade das células tumorais expressarem enzimas que auxiliam no seu crescimento.

Entre as lesões osteodestrutivas mais comuns do esqueleto humano estão os cistos odontogênicos. Com histogênese comum, apresentam manifestações de comportamentos clínicos diferentes. Ainda existem alguns questionamentos a respeito do mecanismo de crescimento dessas lesões. Alguns estudos mostraram que o seu crescimento e expansão podem envolver a destruição e invasão da matriz extracelular osteóide. Esta invasão e destruição pode ter relação com a proliferação do epitélio cístico e também pela sua velocidade de destruição óssea (SILVEIRA et al., 2007).

Pereira et al. (2010) afirmaram que os cistos são cavidades patológicas que ocorrem no interior dos tecidos, revestidos por epitélio, contendo em seu interior material semifluído ou fluído. São consideradas lesões benignas e geralmente assintomáticas, mas podem atingir grandes dimensões, provocando afastamento, perda de dentes e expansão óssea. Os cistos odontogênicos podem ser divididos em inflamatórios e de desenvolvimento. Apenas o último é interessante para esta pesquisa.

Os cistos odontogênicos de desenvolvimento originam-se dos remanescentes epiteliais presentes na maxila e mandíbula que revestem os processos embrionários odontogênicos e formadores da boca e da face. Um exemplo de cisto do desenvolvimento é o ceratocisto odontogênico. O termo ceratocisto serve para descrever que a queratina é formada em abundância. Seu crescimento está relacionado a fatores inerentes do próprio epitélio ou com atividade enzimática na cápsula fibrosa. Muitos pesquisadores sugeriram que os ceratocistos odontogênicos devam ser considerados neoplasmas císticos e classificados como tumor odontogênico ceratocístico, devido seu comportamento agressivo e alto índice de recidiva (OLIVEIRA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007, VAZ et al., 2010). O cisto dentígero, também considerado um cisto de desenvolvimento, possui origem específica do epitélio reduzido do órgão do esmalte e está associado à coroa de um dente permanente não irrompido. Seu crescimento também está envolvido com fatores associados ao microambiente da lesão (VAZ et al., 2010).

Justifica-se esta pesquisa devido ao fato das metaloproteinases da matriz serem capaz de degradar a matriz extracelular e a membrana basal das células, principalmente o colágeno tipo IV. Quanto maior for a quantidade de expressão desta enzima pelas células, sejam elas tumorais ou estromais, maiores as chances de crescimento, progressão e, em casos de tumores, metástases das lesões.

O objetivo desse estudo foi identificar, usando a técnica imunohistoquímica (IHQ), a expressão das MMPs -2 e -9 em cistos e tumores odontogênicos encontrados no laboratório de anatomopatologia da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) verificando a relação com gênero e idade, correlacionando as lesões entre si e quais delas se mostram mais agressivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metaloproteinases

Responsáveis pela degradação das membranas basais e dos componentes da matriz extracelular, e constituintes de um grupo de enzimas chamado endopeptidases, estão as Metaloproteinases da Matriz (MMPs). Sua descoberta se deu através de um experimento na pele de ratos, realizado por Gross e Lapierre, onde, uma enzima ativa na cultura degradou a tripla hélice do colágeno maduro tipo I. São identificados mais de 24 tipos diferentes de MMPs, e foram divididas em 5 grupos: gelatinases, estromelinas, colagenases, matrilisina e tipo membrana. De acordo com sua estrutura, os membros da família das MMPs são organizados em três domínios distintos: aminoterminais propeptídeos, um domínio catalítico e domínio tipo hemopexina no terminal carboxílico. As MMPs são capazes coletivamente de degradar todas as proteínas das membranas basais e matriz extracelular. Elas podem degradar as macromoléculas da matriz, proteoglicanas, fibronectina, colágeno intersticial, laminina, entre outros. As células mesenquimais, leucócitos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos estão entre as principais células que produzem MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 e MMP-9). Estas células respondem a citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Quando estimuladas por estes fatores, estas células liberam MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular. Quando secretadas, as MMPs são pró-enzimas inativas chamadas de Zimógenos. Estes zimógenos são clivados no ambiente pericelular, através da quebra de uma ligação de cisteína Zn^{++} . Após esta clivagem, os zimógenos (antes inativos), passam a se tornar MMPs (ativas) (SOUZA & LINE 2002; NAVARRO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010).

Respostas a estímulos específicos, em sua maioria estimuladas por células inflamatórias que invadem o tecido, são responsáveis por desencadear a ação das metaloproteinases da matriz. As evidências sugerem que o papel das colagenases é degradar principalmente o colágeno tipo I e IV presente na matriz extracelular, que mais tarde, é também degradado por outras proteinases. Algumas importantes doenças possuem relação com a atividade das MMPs, como: aneurisma da aorta

abdominal, infarto agudo do miocárdio, artrite reumatoide e câncer. Nos casos de câncer, as MMPs estão associadas a metástase tumoral. Através de suas atividades, facilitam o caminho das células tumorais até o estroma circundante. As células tumorais penetram a membrana basal até o encontro com um vaso sanguíneo. As MMPs também participam da remodelação óssea, desenvolvimento embrionário e a involução pós-parto, sendo estes considerados processos normais do organismo. Foram encontrados em alguns estudos em regiões promotoras de MMPs, polimorfismo do ácido desoxirribonucléico (DNA). O Polimorfismo denomina-se uma variação na sequência do DNA que afeta somente uma base, e, quando ocorre em uma população com índice maior que 1%, é chamado de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP). Se a frequência for menor que 1%, o polimorfismo é considerado apenas uma mutação. A deleção ou inserção de uma guanina cria uma mutação com dois diferentes alelos, que pode conter uma guanina única (1G) e outro possuindo duas guaninas (2G). As MMPs são secretadas por tumores que carregam o alelo 2G, e a presença deste polimorfismo está associada ao desenvolvimento do câncer (SOUZA & LINE 2002).

As MMPs são denominadas metaldependentes por conter Zn^{++} no sítio de ação catalítica e necessitar de Ca^{++} para sua atividade e estabilidade. Quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos, o processo patológico da matriz extracelular pode se instalar. Para o controle dessa atividade, existem 4 vias possíveis: por diferença de especificidade do substrato, por ativação dos precursores, por regulação na transcrição nos genes das MMPs, e por inibidores de MMPs (TIMPs). Os TIMPs são proteínas pequenas que regulam a habilidade de hidrolisar um substrato e o nível de ativação das MMPs. Existem descritos na literatura quatro membros da família TIMP. A homeostase da matriz extracelular é dependente de um equilíbrio entre TIMPs e MMPs. Componentes como zinco e cádmio inibem as MMPs da matriz do esmalte dentário. Estanho, mercúrio, zinco, cobre, tetraciclina (inibe a collagenase dos tecidos e fluido gengival, independente da sua atividade antibacteriana) podem inibir a baixas concentrações as MMP-2 e MMP-9. Acredita-se que o zinco ou outros íons metálicos interagem com resíduos de aminoácidos causando alterações conformacionais na função catalíticas das enzimas e as tornem inativas, porém este mecanismo ainda não foi totalmente compreendido (SOUZA & LINE 2002; NAVARRO et al., 2006; MIYAGI et al., 2008).

Segundo Costa et al. (2008), no grupo das gelatinases estão as MMPs -2 e -9, que têm a capacidade de degradar colágeno IV, V, VII, X e XI, elastina, componentes menores da matriz e são secretadas pelos osteoblastos. Também envolvidas no processo de diferenciação celular, apoptose e angiogênese, essas MMPs atuam diretamente na degradação da membrana basal, favorecendo a invasão de células tumorais.

Pacientes portadores de periodontite apresentam índices elevados de MMP-9 e MMP-2 e, após tratamento periodontal, a quantidade de gelatinases diminui. Metaloproteinases também estão associadas à perda de implantes, por estarem presentes no fluido sulcular peri-implantar. O uso de tetraciclina nos tratamentos periodontais evita a destruição do periodonto e da superfície radicular. Foi demonstrado em pesquisas também, que a ativação das MMP-2 e MMP-9 tem papel na destruição da dentina pela ação da cárie. Existem evidências indicando que durante a atividade da cárie radicular, as MMPs são responsáveis por degradar a matriz orgânica da superfície, porém este papel ainda não é totalmente compreendido. As diferentes formulações do amálgama demonstram que ele pode se comportar de várias formas em relação a inibição das MMPs, sendo uma das formas a presença de mercúrio, inibidor da colagenase. O óxido de zinco tem a capacidade de reduzir a atividade inflamatória e aumentar a epitelização das feridas. Estudos têm mostrado que esta substância pode estimular a cura de feridas agudas e crônicas. A inibição das MMP-2 e MMP-9 pelo óxido de zinco pode ser um dos mecanismos de cicatrização que ele tem sob feridas, porém esta questão ainda é controversa (SOUZA & LINE 2002).

A invasividade de uma neoplasia pode ser modulada pelas MMPs. Células tumorais são capazes de produzir MMPs. Estas, durante as metástases sintetizam as MMPs para degradar os tecidos vizinhos, estromas e conseguir ultrapassar a membrana basal do vaso sanguíneo. Estudos através da técnica imuno-histoquímica mostraram estar presentes as MMP-2 e MMP-9 nas formas ativas e inativas em cortes de ameloblastomas. Elas podem estar envolvidas desde a formação inicial do tumor, quanto na modulação, proliferação, angiogênese e apoptose, desempenhando um papel fundamental no processo de invasão local da patologia (NAVARRO et al., 2006; MIYAGI et al., 2008).

2.2 Lesões orofaciais

Constituindo duas das mais importantes estruturas anatômicas do corpo humano, estão a cabeça e o rosto. Responsáveis por acomodar órgãos vitais como o cérebro e outros não menos importantes como nariz, lábios, olhos e músculos das expressões faciais, estes são fundamentais para suas devidas funções e também para a estética. Defeitos ou problemas em quaisquer dessas estruturas podem afetar significativamente o bem-estar, a vida social e o estilo de vida do ser humano. Problemas de fonação, alimentação e deglutição, infecções recorrentes, dificuldade de limpeza levando ao mau cheiro, são alguns dos problemas que costumam ocorrer com pacientes que possuem defeitos faciais. Esses defeitos faciais podem resultar de várias razões que incluem traumas, infecções e tumores (REIS & MARCELO, 2006; ANTUNES et al., 2007; RASHID & BASHIR, 2015). Ressecção de tumores malignos ou benignos na mandíbula podem causar complicações funcionais, emocionais e estéticas, caso não sejam diagnosticados e tratados devidamente (SOUZA et al., 2014).

O local mais acometido por cistos e tumores odontogênicos é a mandíbula. Alguns são originados de uma inflamação ou a partir dos restos epiteliais do dente. Em geral, algumas destas lesões apresentam comportamento agressivo e alterações neoplásicas, por isso é de grande importância a realização da biópsia, o exame histopatológico mais detalhado e escolha do melhor tratamento. As patologias odontogênicas apresentam prevalências diferentes de região para região do planeta. Essa diferença na prevalência em diversas partes do mundo pode estar relacionada a fatores ambientais e à raça. Conjunto de critérios como idade, gênero e localização da lesão são importantes para estabelecer com melhor precisão a ocorrência dessas patologias nas diferentes populações, como também auxiliam no diagnóstico, tratamento e reabilitação dos pacientes (BAGHAEI et al., 2014; SEKERCI et al., 2015).

De todas as amostras bucais, os cistos representam 10,4%. Dentre os cistos, o mais prevalente é o cisto periapical, seguido pelo dentígero e ceratocisto. Atingem mais homens do que mulheres (1,86:1), e mais a mandíbula do que a maxila (3:1). Para os tumores, o índice de representatividade das lesões na cavidade bucal é de 1,78%, sendo que o mais prevalente é o odontoma, seguido pelo ameloblastoma (80,1%). Em crianças, pesquisas mostraram que 16,4% das patologias bucais são

tumores benignos. Contudo, o correto é que os pacientes sejam incentivados a consultas periódicas. Cirurgiões-dentistas devem realizar exames clínicos e radiográficos de rotina por serem responsáveis pela decisão inicial das biópsias em pacientes com patologias suspeitas. Quanto mais cedo diagnosticada a lesão, melhor o prognóstico e tratamento, minimizando problemas mentais, físicos e dificuldades sociais. Isto é válido não apenas para cistos e tumores, mas para todas as patologias intra-bucais (BAGHAEI et al., 2014).

2.3 Tumores odontogênicos

Os tumores odontogênicos são alvo de muitas pesquisas e publicações científicas em todo o mundo. Derivam do ectomesênquima ou mesênquima dos tecidos epiteliais que originam o dente. São considerados um grupo heterogêneo de lesões neoplásicas de difícil diagnóstico, raros e com chances de recidiva. Estes tumores possuem um possível comportamento agressivo e variações histológicas consideráveis, que podem ser classificadas em malignas e benignas (AVELAR et al., 2008; HENRIQUES et al., 2009; SEKERCI et al., 2015;).

Até o ano de 2005 existia muita controvérsia que necessitava de esclarecimento a respeito da etiopatogenia dessas doenças, para que pudessem classificá-las e diagnosticá-las devidamente. Com a ajuda da genética, provas imuno-histoquímicas e observações no comportamento biológico dessas lesões, mudanças na classificação destes tumores foram realizadas. Em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reclassificou algumas destas patologias, trazendo como novidade: a mudança do ceratocisto odontogênico, que passou a ser considerado um tumor benigno chamado tumor odontogênico ceratocístico. A divisão em 3 entidades do cisto odontogênico calcificante (agora em 2 entidades benignas e 1 maligna); a origem do tumor odontogênico adenomatóide, que antes era do ectomesênquima, e agora do epitélio odontogênico com estroma fibroso; a constatação de que o tumor odontogênico de células claras é de fato maligno, chamado então de carcinoma odontogênico de células claras; e algumas mudanças a respeito de subtipos e terminologia. Sendo assim, a atual classificação dos tumores odontogênicos epiteliais segundo a OMS é: Tumores benignos: T. odontogênico epitelial calcificante, T. odontogênico adenomatoide, T. odontogênico

ceratocisto, ameloblastoma (e suas variantes), T. odontogênico escamoso; Tumores malignos: Carcinoma de células escamosas intraósseo, Carcinoma odontogênico de células fantasmas, Carcinoma odontogênico de células claras, Ameloblastoma metastatizante, Carcinoma ameloblástico (HENRIQUES et al., 2009).

Na espécie humana, são raros os casos de tumores de tecidos odontogênicos, totalizando cerca de 1% de todos os tumores que ocorrem na mandíbula. Em 1971 foi publicado pela OMS o primeiro sistema de classificação internacional para tumores odontogênicos. Essa classificação foi revisada em 1992 e atualizada em 2005. Com distribuição geográfica variada, sua etiologia é desconhecida e seu desenvolvimento ocorre sem causa aparente. A maioria dos tumores odontogênicos possui curso indolor da doença, fato que o deixa imperceptível até atingir grandes dimensões. Possuem crescimento auto-limitado, fato que muitos pacientes não sentem necessidade de consultar um dentista clínico-geral ou um cirurgião buco-maxilo. Para melhor estabelecer a expressão destas lesões em determinadas populações é necessário conhecer as suas características, desta forma se torna mais simples identificar os possíveis fatores associados ao seu desenvolvimento, os grupos de risco e auxilia a desenvolver mais precisamente os diagnósticos. Estudos mostram incidências de 0,74% na Europa, 1,82% na América do Sul, 1,55% na América do Norte, 3,9% na Ásia e 9,6% na África. Destas lesões, 94,4% se mostram benignas e 5,6% malignas, destacando assim a possibilidade de malignidade dos tumores odontogênicos (SEKERCI et al., 2015).

Os tumores odontogênicos são de grande importância clínica pois, mesmo em sua maioria serem classificados como benignos, possuem potencial para comprometer a saúde e longevidade do paciente (ANYANECHI et al., 2014).

Algumas das patologias odontogênicas benignas são os ameloblastoma e o ceratocisto odontogênico. Entretanto, possuem comportamento altamente agressivo, podendo alcançar grandes dimensões e conseqüentemente espalhar para além das suas margens radiográficas e clínicas, invadindo outros tecidos, causando deformidade óssea e ter altas taxas de recorrência (KUMAR, 2015).

2.3.1 Tumor odontogênico ameloblástico

Chamado em 1885 de Adamantinoma (termo atualmente utilizado para ilustrar uma forma rara de câncer ósseo), o ameloblastoma (termo criado por Ivey e Churchill em 1930 e atualmente aceito) é responsável por 9 a 14% de todos os tumores odontogênicos. O ameloblastoma é originário do epitélio odontogênico, surgindo durante a fase de formação dentária, a partir do desenvolvimento do órgão do esmalte, de crescimento lento. Sua nomenclatura deriva da palavra em inglês "amel", que significa esmalte e da palavra grega "blastos", que significa germe, e foi descrito pela primeira vez em 1827 por Cusack. Seu pico de incidência está na terceira e na quarta décadas de vida. É relatado como o mais frequente em populações brasileiras, egípcias e chinesas, seguido pelo tumor odontogênico ceratocístico e o odontoma. Atinge em maiores números a mandíbula. Possui pequena predileção pelo sexo masculino e ocorre com maior frequência em molares mandibulares (80%, proporção 5:1 em relação a maxila). É considerado benigno, indolor, de comportamento agressivo e invasivo, raro e com altos índices de recidiva, com tratamento cirúrgico conservador (cerca de 90% de chances de reincidência). Esta patologia pode chegar a grandes dimensões causando assimetria facial, má oclusão, deslocamento de dentes e fraturas ósseas/patológicas. Normalmente com multiprofissionais, o tratamento cirúrgico radical apresenta menores índices de recorrência quando comparado ao tratamento cirúrgico conservador. Porém, existem relatos na literatura de reincidências deste tumor após o tratamento radical. Com tratamento cirúrgico radical, o índice de recidiva baixa para 5%. Por ter comportamento biológico altamente variável, o mecanismo de recorrência é bastante complexo. As recidivas podem ocorrer até 45 anos após o tratamento inicial. Além do surgimento a partir da formação de um dente, esses tumores podem surgir também a partir do revestimento epitelial de cistos odontogênicos ou células da camada basal da mucosa. É raro os relatos de ocorrência em crianças (10% a 15%), e quando ocorrem atingem a média de idade de 14,5 anos (MADHUP et al., 2006; RAM et al., 2010; CHANTRAVEKIN & KOONTONGKAEW, 2014; CIORANU et al., 2014; LIN et al., 2014; MAZGHI et al., 2014; CHAE et al., 2015; MASTHAN et al., 2015; SEKERCI et al., 2015).

O ameloblastoma, de acordo com a OMS, é dividido em 4 classificações, conforme seu aspecto radiográfico, comportamento clínico e características histológicas. São eles: sólidos (multicísticos), unicísticos, desmoplásticos e periférico. O subtipo mais agressivo, que contém vários espaços císticos,

responsável por aproximadamente 86% de todos os casos de ameloblastoma é o multicístico. Este subtipo também possui suas classificações que podem ocorrer isoladamente ou em associações de diferentes padrões, são eles: basalóide, plexiforme, acantótico, folicular e de células granulares. Quando ocorre em associações, o tumor é classificado de acordo com o padrão predominante. Os mais comuns são o folicular (27,7%) e plexiforme (21,1%). Os de células granulares representam cerca de 5% de todos os casos, e quando ocorrem, normalmente é de forma associada principalmente com o padrão folicular. O tipo unicístico representa de 5 a 25% dos casos, sendo menos comum que o tipo multicístico, porém, atinge uma população mais jovem. Possui as variantes: intraluminal, simples, luminal e mural. O tipo periférico é o menos comum. Poucos possuem potencial maligno, cerca de 2 a 4,5% de todos os casos, podendo ocorrer metástases e atingir o pulmão - local mais comumente atingido (SILVA et al. 2004; CIORANU et al., 2014; SINGH et al., 2014; CHAE et al., 2015).

Nos casos de ameloblastomas em crianças, a prevalência é do subtipo unicístico, com números próximos a 95%. Para o tratamento em crianças, ainda há discussão. Quando se trata do subtipo unicístico, bons resultados podem ser alcançados utilizando procedimentos conservadores (curetagem e enucleação). Contudo, se for do subtipo multicístico, recomenda-se tratamento semelhante aos adultos, com cirurgia ressectiva, com margens de segurança de 1 cm. São raros os relatos de metástases (2 a 5%), porém quando ocorrem atingem pulmão, linfonodos cervicais, vértebras, crânio, diafragma, glândula parótida e fígado respectivamente. Um intervalo de 0,3 para 31 anos é o tempo em média do diagnóstico inicial de ameloblastoma para o aparecimento de metástases pulmonares. Metástases pulmonares podem ocorrer por três vias: aspiração, linfática e hematogênica, podendo estar associadas às várias tentativas cirúrgicas de retirada do tumor (CIORANU et al., 2014).

Em alguns casos podem ocorrer variantes, mas estas não diferem no comportamento biológico do tumor e nem no prognóstico, como: queratoameloblastoma papilífero e ameloblastoma hemangiomaso, este é considerado uma variante rara de tumor ameloblástico. Estima-se cerca de apenas 15 casos documentados. Este tumor possui em seu estroma espaços contendo muitos vasos capilares e sangue. Podem acarretar em complicações cirúrgicas, que devem ser lembradas durante o planejamento do tratamento. A vascularização pode

se originar do crescimento de um hamartoma ou como parte do processo neoplásico, porém a origem do componente vascular ainda não é compreendida claramente. Algumas das teorias propostas são: representar uma neoplasia separada; má formação de hamartoma; angiogênese no desenvolvimento do tumor; incidente traumático; entre outras. Entre as hipóteses, sugere-se que durante a odontogênese, a indução da formação dos vasos sanguíneos resulta em uma proliferação anormal, se transformando assim em um componente do tumor. O trauma durante as extrações cirúrgicas pode induzir a formação de tumores a partir das células do ligamento periodontal, pois, qualquer alteração na reparação dos tecidos pode formar tecido de granulação, que consiste na formação de novos capilares e células endoteliais (KASANGARI et al., 2015).

Embora seja mais comum o aparecimento do ameloblastoma em mandíbula, quando encontrado na maxila atua de forma mais agressiva. A maxila possui espessura óssea cortical menor que a mandíbula, fato que pode acelerar o crescimento do tumor, podendo invadir o sistema nervoso central estendendo-se além dos limites do osso maxilar, diminuindo a taxa de cura cirúrgica. Em alguns casos, estes tumores são tratados apenas com curetagem e sem um detalhado exame histológico, resultando assim em uma alta taxa de recorrência e morbidade (CHAE et al., 2015).

Poucos estudos oferecem informações sobre a maneira de crescimento desses tumores, devido ao fato de serem tratados durante décadas após sua primeira apresentação e sem que o diagnóstico fosse confirmado. Para prever a “agressão biológica”, algumas pesquisas demonstraram cálculos de crescimento mensal estimado dos tumores, dividindo o volume médio do tumor no momento da aparição pela duração dos sintomas. De acordo com esse cálculo, incluindo a suposição de que esses tumores possuem crescimento de forma linear, o ameloblastoma multicístico tem a taxa de crescimento mais veloz ($0,81 \text{ cm}^3/\text{mês}$) e o ameloblastoma periférico o crescimento mais lento ($0,17 \text{ cm}^3/\text{mês}$). O ameloblastoma desmoplásico também é considerado menos agressivo ($0,36 \text{ cm}^3/\text{mês}$) que o subtipo multicístico, sendo esse fato devido a desmoplasia atuando como uma barreira limitante do tumor. As evidências mostram que inicialmente esses tumores apresentam crescimento lento, contudo, mais tarde o seu crescimento acelera. Inicialmente são indolores, porém podem causar complicações como edema, anemia secundária, sangramento nas ulcerações, obstrução levando a

pequena abertura de boca, obstrução das vias aéreas, dificuldade de mastigação, fonação, deglutição e perda de dentição (BAGHAEI et al., 2014).

A maioria dos estudos de tumores foca apenas as alterações celulares, porém, o microambiente do tumor também exerce fator de grande importância na sua proliferação e invasão. Existem anormalidades no estroma do ameloblastoma, e estes podem ser classificados em três grupos: fatores de crescimento (como o fator de transformação do crescimento beta - TGF β); citocinas osteolíticas e osteoprotegerina; e proteinases que degradam a matriz extracelular (metaloproteinases da matriz - MMPs) (CHANTRAVEKIN & KOONTONGKAEW, 2014).

2.3.2 Ameloblastoma e MMPs

Pesquisa realizada por Matos et al. (2012), avaliou a expressão em ameloblastomas de MMP-1, -2, -7, -9 e -26 e TIMPs -1 e -2. Foi constatado que a MMP-9 coopera com a progressão tumoral, refletindo no seu comportamento clínico. Verificou-se que o estroma do tumor representa fonte de MMPs, que podem ser reguladas por condições que promovem o crescimento do tumor, através da degradação dos tecidos adjacentes. Concluíram que as MMPs estão associadas ao comportamento biológico do ameloblastoma e que participam da recorrência e do processo de invasão de algumas lesões odontogênicas.

Para melhor esclarecer o comportamento do ameloblastoma, Florescu et al. (2012) investigaram através da imuno-histoquímica as reações entre diferentes variações deste tumor. Eles utilizaram a MMP-9, TIMP-2, E-caderina e vimentina. Foram identificadas para a MMP-9 intensidades variáveis de atividade no epitélio da neoplasia e no estroma ao redor do tumor. Esta MMP se mostrou intensa na variante histológica acantomatosa. Os resultados da pesquisa mostraram também que no estroma, independente da variante histológica, foi constatado maior potencial invasivo. Concluíram que os marcadores utilizados demonstraram influencia no crescimento do tumor.

Ribeiro et al. (2009) compararam a expressão de metaloproteinases-1, -2, e-9 no ameloblastoma sólido e no tumor odontogênico adenomatóide. Foram utilizados 20 ameloblastomas sólidos e 10 tumores adenomatóides. As metaloproteinases

foram avaliadas através da técnica imuno-histoquímica. Na imunoexpressão as MMPs-2 se mostraram reativas em 65% dos ameloblastomas, no que diz respeito as células do estroma. As MMPs-9 se mostraram reativas tanto em células do estroma como em células do parênquima. Os autores concluíram que as MMPs estão relacionadas à progressão e ao crescimento dos tumores analisados. Concluíram também que a agressividade do ameloblastoma pode estar relacionada à participação ativa das células do estroma.

O estudo de Shen et al., (2010) objetivou examinar a associação entre proteína rica em cisteína (SPARC) com MMP-1, MMP-2 e MMP-9 em ameloblastoma. As MMPs -1,-2 e -9 e SPARC foram detectadas nos citoplasmas das células ameloblásticas, em células semelhantes ao retículo estrelado e na região estromal (fibroblastos e células endoteliais). Os autores sugeriram que existe uma associação entre SPARC e MMPs (principalmente a -9) regulando a invasão do tumor.

Siqueira et al. (2010) demonstraram em seu estudo a expressão da MMP-9, fatores de crescimento e TIMP-2. Como resultado concluíram que a MMP-9 e as outras enzimas da pesquisa possuem atividades relacionadas ao crescimento e invasão do tumor. O ameloblastoma apresentou tanto as MMPs-9 como os fatores de crescimento e TIMP-2 em células neoplásicas e estroma, sendo que a maior parte estava presente em região de estroma.

Na tentativa de verificar relação entre a atividade proliferativa dos ameloblastomas e a ação das metaloproteinases 1, 2 e 9, Pinheiro et al., (2004) pesquisaram através da imuno-histoquímica e métodos bioquímicos (zimografia e Western blotting) se as MMPs se encontravam latentes ou ativas no tecido. Eles concluíram que as MMPs possuem grande influência na invasividade local dos ameloblastomas.

Zhang et al., (2009) afirmaram que tumores apresentam importante papel na sua própria regulação, remodelando a matriz extracelular e degradando a membrana basal através de MMPs sintetizadas por suas próprias células. Quando ativa a MMP, ocorre degradação de colágeno IV, facilitando a invasão dos tumores, através da regulação e adesão entre as células e matriz.

Yoon et al., (2011) declararam que a através da expressão das MMP-2 e -9, que são capazes de degradar o colágeno tipo IV, componente principal da

membrana basal, ocorre uma maior invasão das células tumorais e maiores chances de metástases em carcinomas de boca.

Jiang et al. (2008) relataram que o padrão de crescimento do ameloblastoma, principal característica biológica, é considerado extremamente invasivo, com altas taxas de recorrência pós-operatória. Sua patogenia e seu crescimento invasivo ainda não são totalmente esclarecidos, contudo, sabe-se que a expressão de MMPs contribui para esses fatores. Elas são capazes de degradar a membrana basal e a matriz extracelular.

O estudo de Fregnani et al., (2009) destacou a importância de conhecer os marcadores das lesões odontogênicas. Eles alegaram que a ativação das MMPs pode promover a liberação de fatores de crescimento e citocinas, melhorando assim as condições para a migração celular e a angiogênese. Relataram o envolvimento de miofibroblastos na expressão de MMPs e afirmaram que estas células estão presentes em grandes quantidades no estroma de ameloblastomas.

Kumamoto et al., (2003) avaliaram em ameloblastomas, componentes estromais e germes dentários a expressão das MMPs-1,-2 e -9 e TIMPs -1 e -2. As células da região estromal do ameloblastoma tiveram marcações muito significativas para a MMP-9, enquanto que as células tumorais apresentaram fraca marcação para a MMP-2. Eles obtiveram como conclusão que a expressão de TIMPs e MMPs está associada a interações celulares nos tumores odontogênicos ameloblásticos e estas moléculas desempenham um papel na regulação da progressão desta lesão.

Wang et al. (2008) conduziram um estudo para avaliar o papel das MMPs-2 na invasão do ameloblastoma. Foi constatado que as células analisadas expressaram citoqueratina e MMP-2. Através de experimentos, conseguiram inibir a ação das MMPs-2 por interferência no ácido ribonucleico (RNA). Esta inibição reduziu os locais de invasão das células tumorais, podendo servir de terapia para estas lesões.

2.3.3 Diagnóstico e tratamento do ameloblastoma

Para o tratamento, informações clínicas, radiográficas e histológicas precisas devem ser bem esclarecidas. É fundamental para o diagnóstico o exame histopatológico. Além dessas condições, há necessidade de avaliação do tamanho

da lesão, sua localização, sua anatomia, sua variante histológica e a anatomia adjacente envolvida. Ameloblastomas são descobertos normalmente em radiografias de rotina (aspecto de bolhas de sabão, com destruição óssea) ou devido a quedas dentárias e deformidades na face. Caso não seja tratado, pode causar significativa morbidade e em alguns casos até a morte, mas, se tratado de forma correta, possui bom prognóstico. Existem escolas que defendem o tratamento cirúrgico mais radical, com ressecção óssea contendo margem de segurança de 1 a 1,5cm. Em contrapartida, existem escolas que acreditam que o tratamento cirúrgico mais conservador, através da enucleação do osso adjacente é o melhor tratamento a ser realizado. Contudo, não se comenta a respeito da utilização de radiação, pois acredita-se que esta técnica não interfere no tratamento da lesão (MAZGHI et al., 2014; SINGH et al., 2014).

Em alguns casos, estes tumores são tratados apenas com curetagem e sem um detalhado exame histológico, resultando assim em uma alta taxa de recorrência e morbidade. O principal objetivo do tratamento é a remoção completa do tumor e a restauração da função e da aparência do paciente. Quanto mais cedo o tratamento for realizado, menores as chances de sequelas (cicatrizes) e melhor conforto psicológico. As cirurgias podem ser conservadoras ou radicais e a excisão do tumor deve ser seguida por uma reconstrução com enxerto ósseo e próteses dentárias (CHAE et al., 2015).

A maioria dos estudos elege a cirurgia ressectiva como o padrão ouro para o tratamento deste tumor e relatam a radiorresistência do mesmo. Nas ressecções ósseas em bloco, grande parte dos casos necessita de enxertos ósseos para que seja restabelecido o local. Este restabelecimento é necessário devido a necessidade de existir suporte adequado para o tecido facial, e, exige profissionais de várias áreas. O enxerto ósseo pode ser proveniente de algumas regiões, como: costela, tibia e crista ilíaca. Problemas emocionais, estéticos e funcionais podem ser gerados devido a grandes ressecções de tumores malignos ou benignos na mandíbula caso não forem tratados. Para a reabilitação os enxertos podem ou não estarem associados a utilização de próteses e/ou implantes. Pesquisas mostraram que as taxas de sucesso dos implantes, overdentures e próteses fixas em pacientes com mandíbula reconstruídas é semelhante as de pacientes clinicamente saudáveis (SOUZA et al., 2014)

Radioterapia e quimioterapia não possuem papel no tratamento desses tumores. As técnicas conservadoras incluem a curetagem e enucleação, de execução simples, sendo mais utilizado no tratamento do subtipo unicístico. Para melhorar sua eficácia, pode ser associada a crioterapia, eletrocauterização ou a agentes de cauterização. Contudo, quando realizada no subtipo multicístico, está associada com altas taxas de recidiva (cerca de 30 a 90%). Outro fator importante é que a curetagem ou enucleação podem não remover o tecido tumoral de dentro do osso esponjoso. As técnicas radicais realizadas com margens adequadas garantem máxima remoção da patologia e diminuem o índice de recorrência e metástases para 0 a 10% (CHAE et al., 2015).

Para o tratamento em casos de ameloblastoma maligno e/ou carcinoma ameloblástico, excisão cirúrgica com ou sem radioterapia é o recomendado, método que apresenta taxas de recorrência local menores de 15%. Ainda há discussões à respeito da utilização de radioterapia no tratamento, pois este tumor maligno é considerado radiorresistente. Não há indicações de quimioterapia em tratamento primário (RAM et al., 2010; RIZZITELLI et al., 2015).

Algumas pesquisas relataram que em casos de recusa das opções cirúrgicas de tratamento, após estudos básicos sobre os efeitos da terapia com radiação, que esta terapia pode causar efeitos em tumores localmente avançados. Pesquisas realizadas in vivo (Atkinson em 1984) e revisões de literatura relataram que os ameloblastomas são radiosensíveis. Esta ideia da radiosensibilidade do ameloblastoma exposto a alta radiação, se torna importante como terapia nos casos em que as técnicas cirúrgicas são contra-indicadas ou de difícil execução. Elas também podem ser utilizadas em associação com as cirurgias para aumentar o controle local (MAZGHI et al., 2014).

Reynolds e Pacyniak (1982) *apud* Madhup et al. (2006), realizaram uma pesquisa bem fundamentada sobre os efeitos da radiação, utilizando os princípios da radioterapia moderna. Foi concluído que não se pode dizer ao certo se esta lesão é radiorresistente ou radiosensível, mas que essa terapia exerce um possível papel quando utilizada no tratamento dos pacientes. Portanto, se corretamente aplicadas, as técnicas de megavoltagem podem ser úteis no tratamento destes tumores, principalmente nos casos de difícil excisão cirúrgica completa (devido ao grande volume da lesão), localização do tumor e idade do paciente.

2.4 Cistos odontogênicos

Lesões que também geram grandes preocupações e não menos importantes são os cistos odontogênicos. Uma cavidade forrada por células epiteliais com material fluido em seu interior é a definição de cisto. Sua localização habitual é intra-óssea. Patologias como cistos merecem atenção especial dos cirurgiões-dentistas, pois, embora possam se desenvolver em qualquer parte do organismo, eles atingem com maior frequência a mandíbula e maxila. Cistos se desenvolvem a partir da proliferação dos restos epiteliais, geralmente assintomáticos, podendo atingir dimensões extensas, causando expansão óssea e afastamento dos dentes. O diagnóstico precoce favorece o tratamento e causa menos danos funcionais e estéticos ao paciente. Quando são limitados por epitélio originado do epitélio odontogênico, são classificados como cistos odontogênicos (PEREIRA et al., 2010; VAROLI et al., 2010; PARK et al., 2014).

2.4.1 Cistos odontogênicos e MMPs

Khot et al. (2015) alegaram que, em geral, acredita-se que o aumento da pressão osmótica no lúmen cístico é a causa do crescimento dos cistos dentígeros, cistos radiculares e ceratocistos. Porém, fatores inerentes do próprio epitélio ou atividade enzimática na cápsula fibrótica também podem estar relacionados a esse desenvolvimento. Estudos mais recentes sugeriram o envolvimento de MMPs durante o crescimento cístico. Estas enzimas são pouco encontradas sob condições fisiológicas.

Amm et al. (2014) constataram que as MMPs desempenham caráter invasivo em lesões como ceratocisto odontogênico. Na sua pesquisa, as MMP-1, -2, -3, -11, -12, -14, e -16 foram expressas em três tumores primários. Todos estes tipos de metaloproteinases se mostraram difusas ao longo de todo o tumor ou foram localizadas na camada de queratina das células epiteliais. Relataram que o microambiente do tumor serve como mediador das metaloproteinases da matriz, contribuindo para seu desenvolvimento e progressão.

Silveira et al. (2007) realizaram uma pesquisa em cistos odontogênicos (radiculares, dentígeros e ceratocistos) onde a imunomarcagem para as MMPs -1, -2

e -9 se mostrou de forma variada tanto em tecido conjuntivo, como em epitélio. Os resultados mostraram que todas estas lesões produzem as MMPs -1, -2 e -9 de forma variada. Tanto as células epiteliais como as da cápsula são capazes de secretar proteínas que degradam a matriz óssea, contribuindo para o crescimento cístico. As MMPs -2 e -9 são essenciais na completa degradação do colágeno e encontram-se envolvidas na angiogênese e no crescimento dos tumores. Para os cistos dentígeros, foi verificado que a MMP-2 exibiu marcação predominantemente difusa em 5 das 10 lesões estudadas e, esteve presente de forma focal em epitélio e mesenquima dos ceratocistos odontogênicos. Em relação à MMP-9 a marcação foi intensa nos ceratocistos e focal nos cistos dentígeros. Concluíram que a forma de crescimento dos ceratocistos odontogênicos como das outras entidades estudadas pode ser influenciado e conduzido pela secreção das metaloproteinases da matriz, e que, a agressividade dos ceratocistos se deve em partes pela expressão mais exuberante nas MMPs no mesênquima.

Ramos et al., (2014) realizaram um estudo afim de compreender melhor a interação entre as células tumorais e estroma. O objetivo era comparar a expressão das MMPs da matriz, o índice de proliferação celular e a presença de miofibroblastos no ceratocisto. As MMPs utilizadas foram MMP-1, -2, e -9. Foram estudadas 23 lesões e separadas em 2 grupos. Concluíram que as MMPs e o índice de proliferação celular desempenham papéis importantes na patogenia do ceratocisto. Elas foram associadas principalmente na produção do parênquima, influenciando assim no crescimento da lesão.

Suojanen et al. (2014) estudaram a comparação de um cisto dentígero com um folículo dental saudável. Avaliaram a imunoexpressão de algumas MMPs para verificar a remodelação óssea nos folículos em condições normais e em cistos dentígeros. Nos cistos dentígeros o epitélio é o responsável por forrar a cavidade cística, enquanto que, nos folículos dentários consiste apenas em um tecido conectivo com poucas ilhas de epitélio odontogênico detectáveis. A partir dos achados desta pesquisa, sugeriram que a presença de MMPs pode ter influência na expansão dos cistos dentígeros.

Para Santos et al. (2011) o cisto dentígero, que normalmente está associado a coroas de dentes permanentes, possui comportamento indolente e rara recorrência após remoção. Porém, fatores fisiológicos e patológicos sugerem que

através de ações de enzimas, como as MMPs, ocorra a degradação da membrana basal causando expansão desta patogenia.

O trabalho de Henriques et al. (2011) objetivou a avaliação da expressão das MMPs-9 e TIMPs-2 através da técnica imuno-histoquímica em cistos dentígeros, cistos radiculares, ceratocistos e ameloblastomas. No estudo utilizaram 20 amostras de cada lesão. Encontraram como resultados a interação da MMP-9 e TIMP-2 com o colágeno tipo IV presente na matriz extracelular. Constataram que essa interação é um fator importante para o estabelecimento do comportamento biológico de todos os cistos e tumores estudados.

2.4.2 Ceratocisto odontogênico – Características gerais

Dentre os cistos, o que chama mais atenção por ter altas taxas de incidência e ser muito agressivo é o ceratocisto. Apesar de várias pesquisas indicarem a origem dos cistos de remanescentes da lâmina dentária, para este cisto específico, sua origem pode também ser a partir da proliferação de pequenos hamartomas do epitélio gengival ou células da camada basal do epitélio oral adjacente à lesão. Este cisto deve ser considerado como neoplasma cístico benigno, por se diferenciar dos cistos dentígero e radicular no mecanismo de crescimento e comportamento histológico. Ele se diferencia dos outros cistos pois possui também a capacidade de reincidência após o tratamento cirúrgico. São encontrados em diversas faixas etárias (entre 10 e 40 anos em maioria), maioria homens, raça branca, crescimento lento, com capacidade de grande crescimento antes de se manifestar clinicamente, comportamento agressivo, afetam principalmente a região posterior da mandíbula (60% a 80%), geralmente dentes inclusos, podendo ser encontrado mais de um cisto no mesmo momento. Pesquisas já foram realizadas para verificar o local mais afetado pelo ceratocisto, e a região de terceiro molar inferior e ramo da mandíbula tiveram os maiores índices, seguido pela região de canino superior (PEIXOTO et al., 2009; VAROLI et al., 2010; DINESHKUMAR et al., 2015).

Devido e a sua alta taxa de recorrência, aspectos histológicos específicos e ao seu comportamento clínico agressivo, os ceratocistos odontogênicos merecem uma melhor atenção. Por ser considerado um neoplasma verdadeiro, a OMS em 2005 reclassificou o ceratocisto odontogênico no grupo dos tumores odontogênicos

e não mais como cisto. Evidências consideráveis ao longo dos anos mostraram que este cisto é capaz de ser uma neoplasia benigna cística, então sua terminologia foi modificada e ele passou a ser chamado de tumor odontogênico ceratocístico. Apesar do aumento do conhecimento ao longo dos últimos tempos, o processo patológico preciso ainda é confuso. Uma das explicações do seu crescimento e agressividade local é a capacidade proliferativa do epitélio (principalmente camada basal), porém ainda não totalmente elucidado. Outra opção para o crescimento é que ele também pode ocorrer devido à atividade enzimática na cápsula fibrosa (PEIXOTO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012; DIANA et al., 2014; RAMOS et al., 2014; DINESHKUMAR et al., 2015; ZHONG et al., 2015).

Entre os cistos odontogênicos, esta lesão tem prevalência de 10 a 12% dos casos e entre os tumores de 35,8%, perdendo apenas para o ameloblastoma (43,3%). É benigno e assintomático quando em dimensões menores, e quando em dimensões maiores pode apresentar sintomatologia, observando-se dor, tumefação, drenagem e parestesia. Possui margens bem definidas radiograficamente e lesão radiotransparente, porém, não é o suficiente para o diagnóstico, necessitando do exame histopatológico. Pode ser unilocular ou multilocular. Seu epitélio é limitante de uma cavidade que contém um líquido claro, contendo restos de queratina. Este epitélio é constituído com células colunares, contendo hiper cromatismo nuclear, dispostas em paliçada e é classificado como epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado. O limite epitélio conjuntivo é plano. O tecido conjuntivo é bem vascularizado, normalmente sem infiltrado inflamatório, friável e fibroso. As variantes histológicas da lesão estão relacionadas aos índices de recorrência (60%) e agressividade, por esta razão o exame histopatológico é de grande importância (OLIVEIRA et al., 2005; PEIXOTO et al., 2009; VAROLI et al., 2010).

Pesquisadores investigaram a proteína p53 em algumas lesões odontogênicas. Esta proteína é sintetizada pela própria célula que sofre mutação do gene supressor tumoral. Nos ceratocistos odontogênicos as marcações positivas e intensas para essa proteína alterada localizavam-se na camada supra-basal, sendo mais um motivo para alguns autores da reclassificação desta patologia como lesão tumoral. Pesquisadores estudaram também o depósito de perlecan (proteína observada em neoplasias como tumores salivares e odontogênicos) em vários tipos de cistos, entre eles o ceratocisto. O núcleo desta proteína foi localizado na margem celular das camadas subqueratinizada e basal do epitélio de revestimento desta

lesão. Nos outros tipos de cisto a proteína perlecan não foi encontrada, o que levou os autores a concluir uma nova evidência da natureza neoplásica da lesão. O tumor odontogênico ceratocístico pode estar associado a outras patologias, como a síndrome do carcinoma nevo basocelular, caracterizada por múltiplas lesões císticas. O melhor tratamento para a lesão varia de acordo com a agressividade desta. Quanto mais radical o tratamento, menor o índice de reincidência. O tratamento precoce da patologia influencia diretamente na diminuição do índice de recorrência. A recidiva do tumor depende também da natureza multifocal da lesão e não está apenas relacionada a técnica cirúrgica (VAROLI et al., 2010).

O ceratocisto odontogênico ou tumor odontogênico ceratocisto se difere dos outros cistos odontogênicos por sua rápida proliferação, por ser agressivo e potencialmente invasivo. Evidências científicas apoiam que o comportamento invasivo está relacionado à expressão de MMPs, de forma que as células cancerosas e a transição epitélio-mesenchimal (EMT) podem induzir o TGF- β a regular de forma positiva, através de ativação de fatores de transcrição, a expressão das MMP-7 e MMP-9. Reconhecida como característica da embriogênese, a EMT tem sido estudada e tem contribuído para entendimento fisiológico e processo patológico. A EMT compreende um processo onde as células epiteliais perdem sua coesão e polaridade e adquirem aumento da motilidade e morfologia mesenchimal, associado de forma íntima com a fibrose, embriogênese e tumorigênese. A literatura mostra que a EMT está envolvida com a progressão tumoral independente da fase de estágio (invasão, aquisição de resistência e metástase). A transição epitélio-mesenchimal pode favorecer comportamentos invasivos e letais de células tumorais, comportamentos esses associados à alta taxa de recorrência e mau resultado clínico. Células dos restos epiteliais de Malassez, responsáveis por originar patologias odontogênicas, contêm populações de células capazes de sofrer a EMT, porém ainda é incerto o envolvimento da EMT na patogênese do ceratocisto (ZHONG et al., 2015).

2.4.3 Diagnóstico e tratamento do ceratocisto odontogênico

Os diagnósticos radiológicos realizados na clínica odontológica muitas vezes se contradizem mediante os achados histológicos. Isso ocorre devido a aparência

das lesões císticas possuem características radiograficamente semelhantes, dificultando a escolha do diagnóstico inicial. Mesmo que aconteça do diagnóstico final não coincidir com o inicial, o diagnóstico inicial é fundamental para estabelecer um plano de tratamento. Os diagnósticos radiológicos consideram os achados morfológicos e a relação destes com as estruturas adjacentes, podendo ser observados posição, crescimento e tamanho da lesão. Em alguns casos demonstram lesões associadas com impactação de terceiros molares que causam deslocamento destes dentes. Após as análises clínicas, o exame histopatológico deve ser realizado. As características histopatológicas das lesões podem influenciar no seu comportamento biológico e no prognóstico (LEE et al., 2014).

O diagnóstico diferencial inicial mais preciso pode auxiliar os profissionais. Como por exemplo nos casos de dúvidas entre ceratocistos e cistos dentígeros. Após análise clínica, é sugerido a suspeita, e a biópsia é encaminhada para o exame histopatológico. Quando comparados histologicamente, a presença de queratina determina a morfologia da lesão, revelando o padrão mais agressivo do ceratocisto. Quando há envolvimento de uma lesão cística associada a terceiro molar impactado, há uma grande probabilidade de estar diante um caso de cisto dentígero. Outro exemplo é a comparação das lesões que ocorrem em maxilas e mandíbulas. A mandíbula tem espaço limitado pela presença do osso cortical bucal e lingual, bastante firme, obrigando o crescimento da lesão nas direções méso-distais (forma oval). A lesão ceratocística quando comparada a outros tipos de cisto, possuem um padrão de crescimento mais rápido. Isso ocorre devido ao aumento da pressão interna induzida por deposição de queratina no epitélio do cisto e a forte atividade dos osteoclastos (PEIXOTO et al., 2009; LEE et al., 2014).

Por possuir possibilidades de recidiva, foram propostas algumas razões que tentam explicar essa capacidade, como: tratamento inadequado, extensão do tumor, cápsula friável, localização do tumor e persistência dos restos epiteliais após remoção cirúrgica. A enucleação seguida por curetagem é o tratamento que se utiliza normalmente neste tipo de patologia, porém sua natureza friável dificulta a remoção. Autores sugerem que associado a essa técnica se faça uma cauterização da cavidade óssea utilizando a solução de Carnoy, crioterapia ou osteotomia. Na literatura, a maioria dos casos registra recidiva entre 5 a 10 anos, porém já ocorreram antes ou após estes períodos. É classificado como lesão benigna, como dito anteriormente, porém já foram registrados na literatura casos de transformação

maligna do ceratocisto, podendo sugerir um potencial maligno ainda não conhecido (PEIXOTO et al., 2009).

2.4.4 Cisto dentígero – Características gerais

Responsáveis por cerca de 24% dos cistos mandibulares, os cistos dentígeros são lesões que expandem o folículo que delimita a coroa de um dente não irrompido. Cistos dentígeros estão associados a dentes não erupcionados. Um folículo dentário considerado normal possui espaço que varia de 3 a 4mm. Quando este espaço é maior que 5mm pode-se ter a suspeita de cisto dentígero (VAZ et al., 2010; HASAN et al., 2014; IMADA et al., 2014).

Apresentam-se normalmente unilaterais, sendo incomum os achados bilaterais ou múltiplos. Quando estes achados incomuns ocorrem, podem estar associados à síndromes como displasia cleidocranial e síndrome Maroteaux-Lamy, e, as vezes induzidas por drogas como bloqueadores de cálcio e ciclosporina. Foram encontrados na literatura inglesa apenas 8 casos de cistos dentígeros bilaterais associados a sisos que não tinham nenhuma relação com síndromes. O exame diferencial é o histopatológico. Ele é de grande importância, pois esta lesão, em casos raros, pode dar origem a patologias mais graves como o ceratocisto e o ameloblastoma. O tratamento usual em dentes impactados é a remoção cirúrgica. Também podem ser realizadas técnicas como marsupialização e enucleação da lesão. Existem relatos de casos onde a lesão regrediu espontaneamente, porém, isso só ocorre se for diagnosticada precocemente (IMADA et al., 2014).

De acordo com Patil et al., (2014) dentes não erupcionados como os terceiros molares inferiores são associados frequentemente como algumas patologias, dentre elas, cistos e tumores odontogênicos, podendo causar reabsorção radicular, destruição óssea e efeitos prejudiciais em dentes adjacentes. Na literatura, existem diversos casos relatando a ausência de problemas associados aos terceiros molares retidos, porém, em dentes retidos podem-se desenvolver os cistos dentígeros. Em seu estudo, uma incidência de 2,24% de cistos relacionados à terceiros molares foi mostrada, contudo, já foram encontrados em outros trabalhos índices mais elevados, com taxas de 13,3%, 11% e 6,2%.

O epitélio de revestimento do cisto dentígero é derivado do epitélio reduzido do esmalte. Possui radiograficamente padrão unilocular bem definido, com borda esclerótica e radiolucidez envolvendo a coroa de um dente. Pode-se encontrar três tipos de cistos através das radiografias: quando a coroa do dente é delimitada pela radiolucidez (variedade central), quando a radiolucidez envolve parcialmente a coroa e lateralmente a raiz do dente (variedade lateral), e quando o dente está todo envolvido pela radiolucidez, com envolvimento de coroa e raiz (variedade circunferencial). Alguns mecanismos são propostos para a histogênese dos cistos dentígeros, são eles: desenvolvimento do cisto a partir de um folículo dental que se tornou secundariamente inflamado por um dente não vital; quando um dente permanente imaturo encontra um cisto radicular decorrente do dente decíduo sem vitalidade, e a medida que este vai irrompendo o cisto radicular resulta o cisto dentígero de origem extra folicular; e, devido a exsudatos inflamatórios normalmente oriundos de leões periapicais de dentes decíduos não vitais ou outras fontes. Cistos dentígeros podem ocorrer com dentes supranumerários causando deslocamento dos dentes adjacentes, destruição óssea, fístula e reabsorção radicular. Em torno de 5% dos casos esta lesão está associada a dentes supranumerários, e normalmente envolve mesiodentes na região anterior da maxila. Outro caso em que este tipo de cisto pode ser visto é em odontomas. São raros os relatos da ocorrência do cisto em dentes decíduos. O termo dentigerous tem significado “contendo dentes” e a característica principal desta patologia é a presença de um dente incluso envolvido pelo cisto. O primeiro caso de cisto dentígero envolvendo dentes supranumerários foi descrito em 1924. A maioria dos casos são em homens (1,6:1), entre 10 e 30 anos. São patologias normalmente solitárias, porém podem estar associadas a síndromes (mucopolissacaridose, Gardner, entre outras) e conter múltiplos cistos (HASAN et al., 2014).

O cisto dentígero também pode ser confundido com o tumor adenomatóide odontogênico. Este é um tumor incomum, de crescimento lento, benigno, que representa 2,2 a 7,1% dos tumores odontogênicos. Algumas lesões estão associadas a dentes inclusos, com semelhanças a imagens radiográficas do cisto dentígero. Porém, outras não apresentam qualquer relação com dentes. Este tumor pode ser confundido com o cisto dentígero pois ambos possuem em torno das coroas dentárias uma radiolucidez unilocular bem definida. Porém, o cisto dentígero possui fluido de cor palha no seu interior, o que ajuda a diferenciar do tumor, que é

praticamente todo sólido. Alguns cortes na superfície do tumor mostram um espaço parcialmente cístico revestido por uma massa sólida, contrastando com o grande espaço cístico do dentígero. Foi apresentado por este autor um caso clínico onde, na análise histológica foram encontradas áreas sólidas e também uma pequena porção cística. Assim, o autor chegou à conclusão de o tumor pode ter se desenvolvido no momento da expansão cística do cisto dentígero, oriundo dos restos laminares, ao lado ou em um folículo dental. O tumor adenomatóide odontogênico pode ser encontrado em associação a cápsula fibrosa do cisto dentígero. Para o tratamento de ambas, que são lesões benignas e encapsulas, enucleação e curetagem são os tratamentos cirúrgicos conservadores indicados (MAJUMDAR et al., 2015).

2.4.5 Diagnóstico e tratamento do cisto dentígero

Por ser assintomático, normalmente é descoberto em radiografias para investigar se há ausência de um germe dentário, porém se associados a infecções secundárias podem causar desconforto. Um exame de imagem baseado na tomografia computadorizada determina melhor a integridade das margens da lesão, deslocamento de dentes, proximidades de estruturas vitais e topografia da lesão (IMADA et al., 2014).

A localização habitual de um cisto é intra-óssea, podendo expandir drasticamente causando deformidade facial. Por mais que exista a necessidade de remoção destas patologias, a enucleação pode causar fraturas ósseas, lesão do nervo e infecções. Em casos onde estas lesões atingiram grandes dimensões, a marsupialização e a descompressão são indicadas para reduzir o tamanho do cisto, para posteriormente realizar a enucleação de forma mais segura. Preservação do seio maxilar e do nervo alveolar, prevenção de fraturas ósseas, manutenção da vitalidade pulpar e baixo índice de reincidência são algumas das vantagens das técnicas de marsupialização e descompressão. A marsupialização é um procedimento onde a parede superior do cisto é removida e a parede interna suturada na mucosa bucal. Esta técnica é um desafio para o operador. Na descompressão, o tamanho da lesão é diminuído através da inserção de um tubo de borracha em um orifício criado no cisto. Ambas as técnicas interrompem a

continuidade do crescimento da lesão. Porém, com a descompressão, a deformação pós-operatória é menos provável e a reconstrução com próteses mais fácil. Contudo, o tecido deixado na descompressão pode se tornar uma lesão ainda mais agressiva. Bons resultados são encontrados quando estes procedimentos são realizados 1 ano antes da enucleação. Cerca de 50% a 60% do volume da lesão é diminuído. Outras pesquisas mostraram que com 6 meses também já são encontrados resultados satisfatórios. Sabe-se, porém, que o resultado da descompressão e marsupialização varia de acordo com as diferentes características das patologias. Alguns estudos relataram que quanto mais jovem o paciente, melhor os resultados destas técnicas cirúrgicas, entretanto, outros negam esta relação. Entre os exames de imagem, a tomográfica computadorizada (TC) é uma das melhores técnicas para a técnica de excelência para avaliar o tamanho intra-ósseo da patologia. Ela fornece imagens tridimensionais com precisão, enquanto as radiografias panorâmicas reproduzem a anatomia apenas no plano bidimensional. Contudo, é um exame de imagem de alto custo (PARK et al., 2014).

2.5 Técnica imuno-histoquímica – Aspectos gerais

O padrão ouro para diagnosticar uma patologia e escolha da terapêutica é o exame histopatológico. A interpretação de cortes histológicos baseada nas características morfológicas é um processo subjetivo. Com o objetivo de diminuir a subjetividade dos exames patológicos, a imuno-histoquímica (IHQ) tem sido utilizada por patologistas para somar com as informações morfológicas e informação molecular. Esta técnica que envolve uma série de etapas uniformes, consiste em realizar a recuperação antigênica. Descoberta por Coons e Jones, os métodos de recuperação antigênica variam em termos de reagentes e métodos, envolvendo: panela de pressão, micro-ondas, seções de aquecimento histológico, tratamento de proteases; com o objetivo de desmarcar antígenos ocultos pelos meios de fixação ou pelas ligações cruzadas formol (CREGGER et al., 2006).

A IHQ é hoje em dia uma técnica complementar indispensável para a resolução de casos onde a técnica tradicional em hematoxilina eosina (HE) não conseguiu formular o diagnóstico diferencial. Desta forma, desde sua introdução na década de 1970, sua utilização obteve grande crescimento e publicações científicas.

O primeiro artigo publicado a respeito da contribuição da imuno-histoquímica no diagnóstico de tumores foi escrito por Leong e Wright, patologistas australianos. Eles relataram que esta técnica de diagnóstico foi fundamental para diferenciar o linfoma anaplásico de um carcinoma. Outro estudo demonstrou que a IHQ auxiliou em 83% dos casos nos diagnósticos diferenciais. Estas evidências mostraram que na grande maioria dos casos, quando um patologista não consegue um diagnóstico através das lâminas coradas em HE, a imuno-histoquímica pode lhe dar respaldo a encontrar se não o diagnóstico correto, pelo menos um diagnóstico adequado. Esta técnica de diagnóstico é de grande valor para identificar a linhagem celular de origem de uma neoplasia e agentes infecciosos. Mesmo que considerada uma técnica de excelência para diagnóstico diferencial, os achados morfológicos encontrados pela técnica de HE devem ser levados em conta. A técnica de imuno-histoquímica pode ser utilizada em várias situações no laboratório de patologia, entre elas: identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células; pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias; determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada; subclassificação de linfomas; e detecção de células neoplásicas metastáticas (WERNER et al., 2005; JARDIM et al., 2013).

Em 1940, com as pesquisas em imunopatologia, surgiu a técnica IHQ. Porém, esta técnica só foi aceita como um método de diagnóstico quando, em 1974, alguns antígenos tissulares incluídos em parafina e fixados em formalina foram demonstrados pela técnica imunoperoxidase. O advento da recuperação antigênica e a enorme fonte de reagente específicos para demonstração de antígenos celulares ou tissulares que foram propiciados pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais, marcaram a evolução da imuno-histoquímica. O avanço foi tão marcante na patologia cirúrgica, que a nova técnica passou a ser chamada de revolução marrom do laboratório de histopatologia. Apesar de ser uma técnica simples, alguns cuidados devem ser tomados para realizar a IHQ, pois, o resultado final pode ser influenciado por diversos fatores. Entre estes fatores estão: a fixação do espécime, a escolha do anticorpo a ser analisado, as reações propriamente ditas e a interpretação das lâminas. Portanto, conclui-se que o grau de utilidade e contribuição da técnica é diretamente proporcional a importância das mãos que

realizam as reações e ao conhecimento dos que interpretam os resultados (WERNER et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a marcação de MMPs -2 e -9 em cistos e tumores odontogênicos encontrados em um laboratório de anatomopatologia bucal.

3.2 Objetivos específicos

Observar a expressão das MMPs -2 e -9 através da técnica imunohistoquímica em tecido epitelial e tecido conjuntivo de cistos (cistos dentígeros e ceratocistos) e tumor (ameloblastomas) odontogênicos do Laboratório de Anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, verificando a relação com gênero e idade, correlacionando as lesões entre si e quais delas se mostram mais agressivas

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

Após aprovação pelo Comitê de Ética dos seres humanos da UFMS, parecer número 1.136.372, o trabalho avaliou quantitativamente a expressão das MMPs -2 e -9 pelo método imuno-histoquímico em espécimes de cistos e tumores odontogênicos, com intuito de verificar os diferentes graus de agressividade destas lesões. Dados como idade e gênero foram obtidos do prontuário dos pacientes.

4.2 Seleção dos blocos e dos materiais

Todos os blocos de cistos e tumores odontogênicos e seus prontuários foram selecionados do ano de 2000 a dezembro de 2014, triados no serviço de laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os critérios de inclusão foram os casos específicos de cistos (ceratocisto e cisto dentígero) e dos tumores ameloblastomas disponíveis no laboratório, com material emblocado em bom estado de conservação, em quantidades suficientes para novas confecções de lâminas e realização da técnica de imuno-histoquímica.

Os critérios de exclusão foram cistos e tumores que não se enquadram dentro dos escolhidos para o experimento, dúvidas de diagnóstico, blocos em má conservação e/ou com quantidades insuficientes de material para a realização de novos cortes.

4.3 Preparo das lâminas

Com os blocos selecionados, foram realizadas confecção de novas lâminas através da microtomia. O micrótomo (LUPETEC Modelo MRP2015- São Carlos, SP, Brasil) confeccionou cortes verticais, delgados e uniformes com uma lâmina de aço

afiada e um braço ao qual se prende o bloco. Os cortes histológicos tiveram 3 µm de espessura e foram estendidos sobre as lâminas.

Inicialmente as lâminas foram previamente limpas utilizando detergente e álcool 70%, a fim de facilitar a adesão na peça, e sofreram um processo chamado de silanização. O silano é uma substância que faz com que os cortes fiquem aderidos a lâmina, suportando o processamento. Após, passaram pelo processo de desparafinização e hidratação, que ocorreu nas máquinas ptLink (Dako® - São Paulo, SP, Brasil) com água deionizada e soluções prontas (Target retrieval solution) de ph baixo e ph alto. Foram atingidas temperaturas de aproximadamente 180°C num período de 72 minutos. Esta máquina funciona como uma panela de pressão. As soluções de ph baixo e alto são extremamente concentradas (50x) e foram diluídas em em 5L de água deionizada. Todo este processo também serve para expor as proteínas e recuperação antigênica.

4.4 Técnica imuno-histoquímica

A metodologia para a preparação de amostras foi realizada de acordo com o manual de instruções do fabricante (Dako Dinamarca A/S, 2011). A continuidade do processo se deu com uso de todo o kit Envision Flex (Dako®- São Paulo, SP, Brasil) para a realização da reação imuno-histoquímica, juntamente com uso de anticorpos concentrados a serem diluídos. Após os 72 minutos em alta temperatura, as tampas do PT LINK foram abertas e esperado o tempo de 30 minutos para o resfriamento das lâminas, para não ocorrer choque térmico e causar desnaturalização das células. Após o resfriamento, os carrinhos com as lâminas foram retirados da PT LINK e mergulhados 10 vezes em solução tampão Wash Buffer (Dako®- São Paulo, SP, Brasil- TBS com tween) e deixados a descansar por 5 minutos. Em sequência, foi trocada a solução tampão, e foi repetido o procedimento, mergulhando os carrinhos com as lâminas 10 vezes e colocando-os para descansar por 5 minutos. A troca do tampão foi realizada para melhor lavagem das lâminas.

Em seguida, os carrinhos com as lâminas foram retirados da solução. As lâminas foram retiradas dos carrinhos uma a uma, secadas nos arredores do fragmento com campo cirúrgico, e, foi feito um círculo com a caneta hidrofóbica (DAKO PEN®) ao redor do fragmento para delimitá-lo. Após, as lâminas foram

distribuídas nas caixas acrílicas lado a lado. Em seguida, foi pipetado 100ul de Peroxidase Blocking Solution (Dako®- São Paulo, SP, Brasil) e deixado por 5 minutos em descanso. Este processo serve para o bloqueio da peroxidase endógena. A peroxidase endógena causa desintoxicação celular e impede as ligações a serem realizadas, portanto devem ser bloqueadas. Na sequência, as lâminas foram lavadas com aproximadamente 500ml de solução tampão (WASH) e deixadas em descanso também por 5 minutos. Depois dos 5 minutos em descanso, foi retirado o excesso da solução tampão.

A próxima etapa consistiu na aplicação do anticorpo primário. Este foi diluído com diluente da Dako®(invision flex antibody diluente- ázida sódica). Após, foi retirada da lâmina a solução tampão. Esta foi enxugada com papel toalha, tomando o cuidado de não estragar fragmento. Em seguida foi delimitada a área do corte com caneta Dako Pen®. Na sequência o anticorpo primário já diluído foi pingado (100µl) em cima do corte. Então, as lâminas foram colocadas novamente na caixa de acrílico e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente.

Em sequência a reação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas novamente com solução tampão (WASH) e deixadas em solução tampão por 5 minutos. Em seguida, foi retirada a solução tampão e foi pipetado o polímero HRP (funciona como um anticorpo secundário, ligando o anticorpo às células) lâmina por lâmina. O polímero agiu por 20 minutos. Após, as lâminas foram colocadas novamente nas caixas e foi realizado novo processo de lavagem com a solução tampão por 2 vezes e descanso de 5 minutos em cada etapa.

4.5 Aplicação do cromógeno e contra-coloração com hematoxilina

A próxima etapa consistiu no processo de revelação com o cromógeno-Chromogen Substrate Working Solution (Dako®- São Paulo, SP, Brasil), onde foi pipetada a solução e colocada 2 vezes em reação com 5 minutos de intervalo em cada lâmina. O cromógeno serve para verificar se houve a reação, ele dá a cor nas reações. Posteriormente, foi aplicado com pipeta 500ml de solução de lavagem (tampão wash) e, as lâminas foram levadas nos carrinhos para às cubas de Hematoxilina de Mayer (PANREAC - Barcelona, Espanha) por 10 minutos em descanso. A Hematoxilina de Mayer realiza a contra-coloração, ela dá cor as outras

partes do tecido. Após, lavadas em água corrente. Em seguida, cada carrinho foi mergulhado na bateria de 4 cubas de álcool absoluto e 8 cubas de xilol, e levados à máquina de montagem das lâminas. Para finalizar, uma gota de resina líquida foi depositada sobre o corte e foi coberto com uma lamínula.

4.6 Avaliação histológica

Foi verificada a imunomarcção através de um estudo cego (para as MMPs) por dois examinadores patologistas em momentos distintos. As imunomarcções divergentes foram revisadas e analisadas novamente, a fim de estabelecer um diagnóstico final. Como controle, foram utilizadas lâminas de placenta (tecido normal) e lâminas de carcinoma de mama (neoplasia), ambas também marcadas pela imuno-histoquímica.

Em relação à distribuição, a presença ou ausência de marcação foi classificada de acordo com os escores: - (ausência de marcação), + (marcação focal, menos de 10% de células marcadas) e ++ (marcação difusa, mais de 10% das células marcadas). Também houve classificação em relação à intensidade, como fraca (F), moderada (M) ou intensa (I). Quanto maior e mais forte a presença da marcação, maior a agressividade do cisto ou do tumor (SILVEIRA et al., 2007).

A verificação da expressão das MMPs foi analisada separadamente em tecido epitelial e em conjuntivo (verificação de fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias). Também foram relacionados com as lesões a idade e gênero dos pacientes.

4.7 Análise estatística

Foram atribuídos valores numéricos aos escores referentes à presença ou ausência de marcação em relação à distribuição e à intensidade:

- “0” (zero) para ausência de marcação (-);
- “1” (um) para marcação focal com menos de 10% de células marcadas (+) e intensidade fraca (F);

- “2” (dois) para marcação difusa com mais de 10% das células marcadas (++) e intensidade fraca (F);
- “3” (três) para marcação focal com menos de 10% de células marcadas (+) e intensidade moderada (M);
- “4” (quatro) para marcação difusa com mais de 10% das células marcadas (++) e intensidade moderada (M);
- “5” (cinco) para marcação focal com menos de 10% de células marcadas (+) e intensidade intensa (I);
- “6” (seis) para marcação difusa com mais de 10% das células marcadas (++) e intensidade intensa (I);

Quanto maior o valor numérico, maior a agressividade do cisto ou do tumor. Para comparar os valores da expressão MMPs -2 e MMPs -9 em relação às variáveis de estudo: tipo de tumor e cisto e tipo de tecido afetado (epitelial e conjuntivo) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para amostras independentes (3 grupos). Para comparação entre as expressões MMPs -2 e MMPs -9, foi utilizado o teste de Wilcoxon (amostra pareada). O nível de significância adotado foi de 5%. Foi utilizado o programa estatístico SPSS Versão 23.0 (IBM, 2015).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 116 lâminas, 50% provenientes de pacientes do gênero feminino (n=58) e 50% do masculino (n=58). Por faixa etária houve a seguinte distribuição: 27,6% com idade até 20 anos (n=32), 48,3% de 21 a 40 anos (n=56) e 20,7% acima de 40 anos (n=24).

Do total de lâminas (n=116), 50% eram de ameloblastoma (n=58), 32,7% de ceratocisto (n= 38) e 17,2% de cisto dentífero (n=20). Em relação à localização nos tecidos, 50% era no epitélio (n=58) e 50% no tecido conjuntivo (=58).

De forma geral, a região estromal das lesões obteve expressões para os dois tipos de MMPs. Elas foram marcadas principalmente em células endoteliais, plasmócitos, fibroblastos, linfócitos e macrófagos (Figuras 1 e 2). As expressões também foram presentes em epitélio de ameloblastoma, que em sua grande maioria, demonstraram tecido epitelial espesso, com projeções epiteliais, acantose e presença de pouco infiltrado inflamatório (Figura 3). A expressão também foi evidente nas células semelhantes ao retículo estrelado (Figura 4). Para as amostras de ceratocisto odontogênico, foi notada a expressão em epitélio, e na maioria dos espécimes apresentou-se estratificado pavimentoso com espessura de seis a oito camadas de células, com presença de queratina. A camada basal com células cúbicas ou colunares em paliçada, com núcleo se localizando distante da membrana basal (Figura 5). Nas lâminas de cisto dentífero, o epitélio variou entre delgado e espesso, normalmente sem projeções e com presença constante de infiltrado inflamatório (Figura 6).

Figuras 1 e 2 – Fotomicrografias da região estromal das lesões.

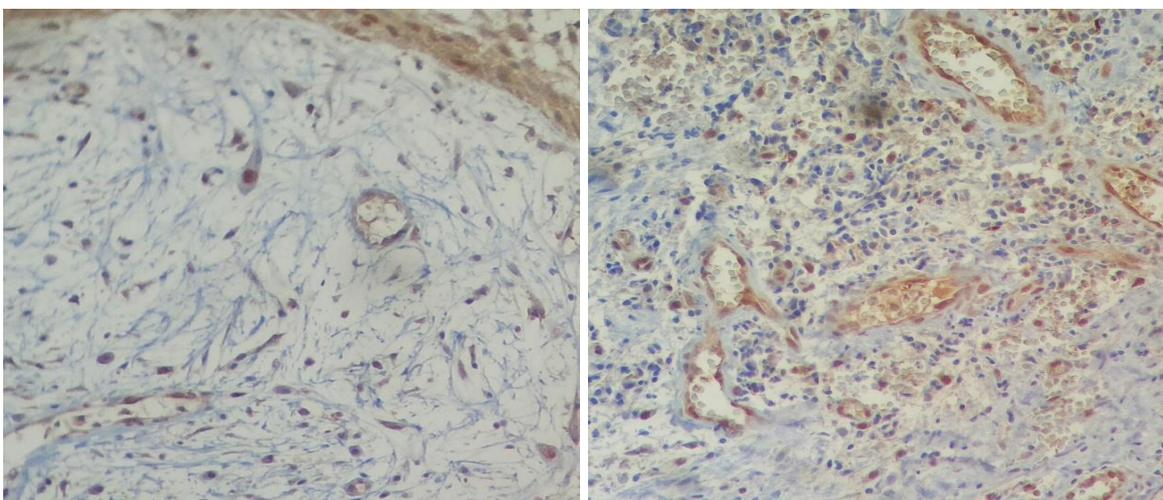


Figura 3 – Fotomicrografia de tecido epitelial do ameloblastoma.

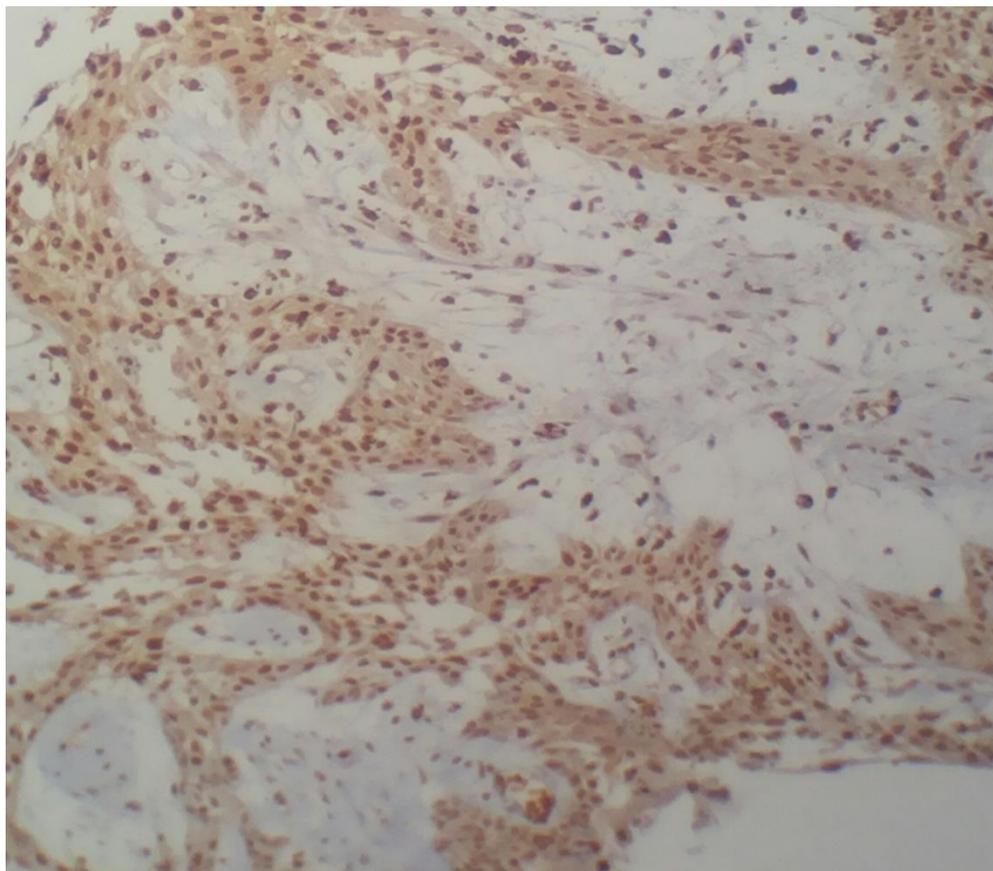


Figura 4 – Fotomicrografia das células semelhantes ao retículo estrelado do ameloblastoma.

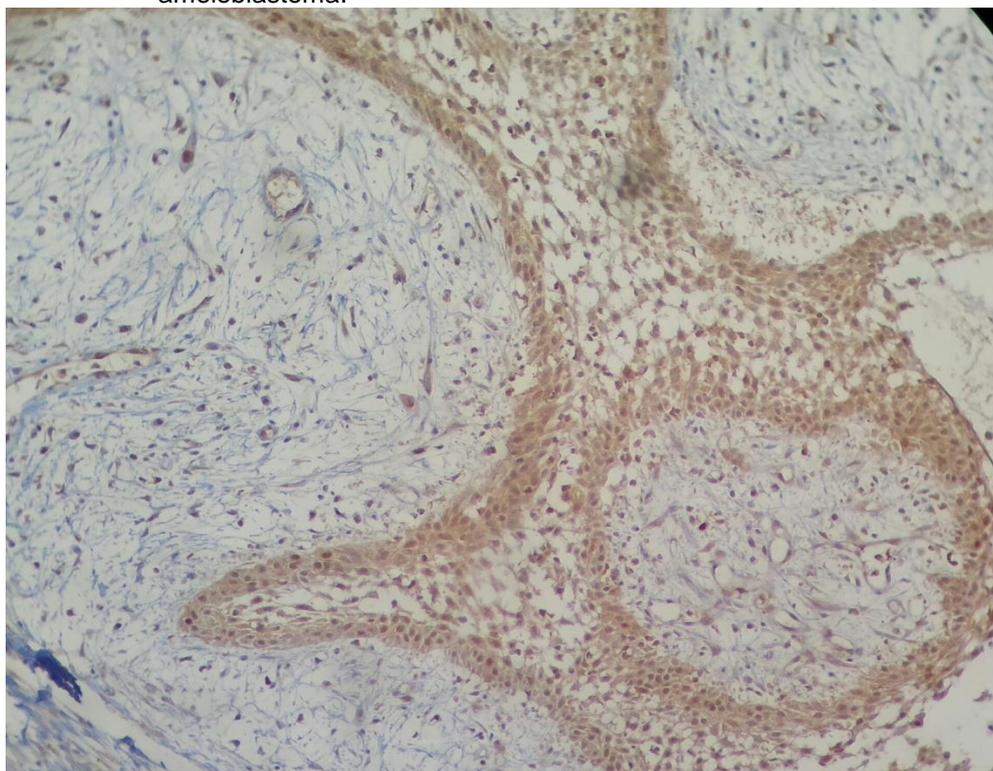


Figura 5 - Fotomicrografia de tecido epitelial do ceratocisto.

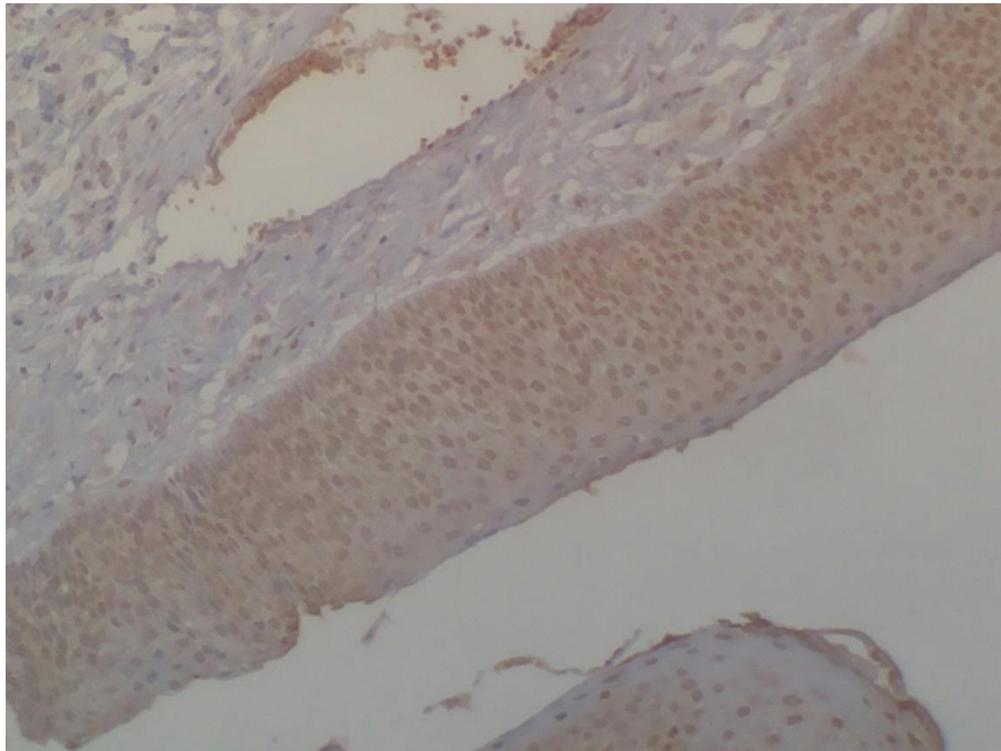
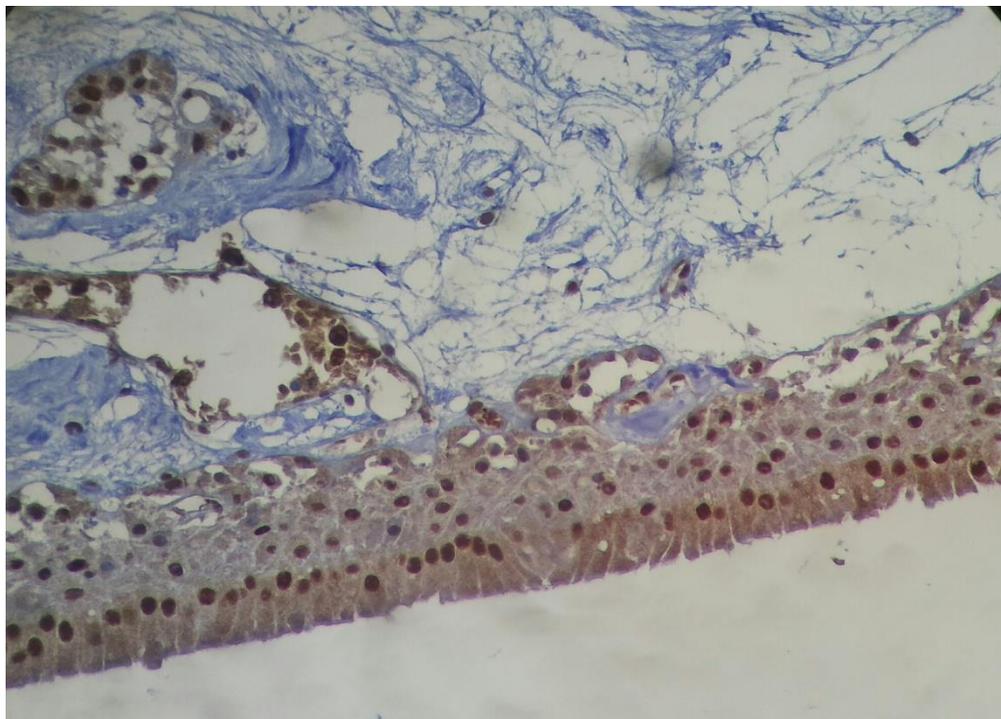


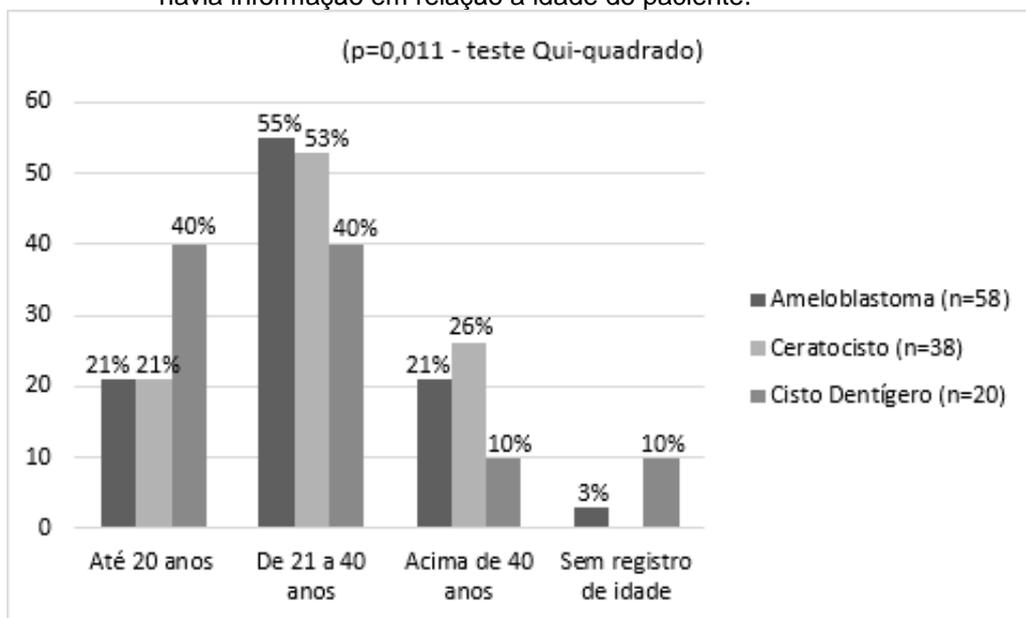
Figura 6 - Fotomicrografia de tecido epitelial do cisto dentígero.



De acordo com o Gráfico 1, quando comparados apenas a mesma lesão entre as faixas etárias, nota-se que o ameloblastoma e o ceratocisto odontogênico foram

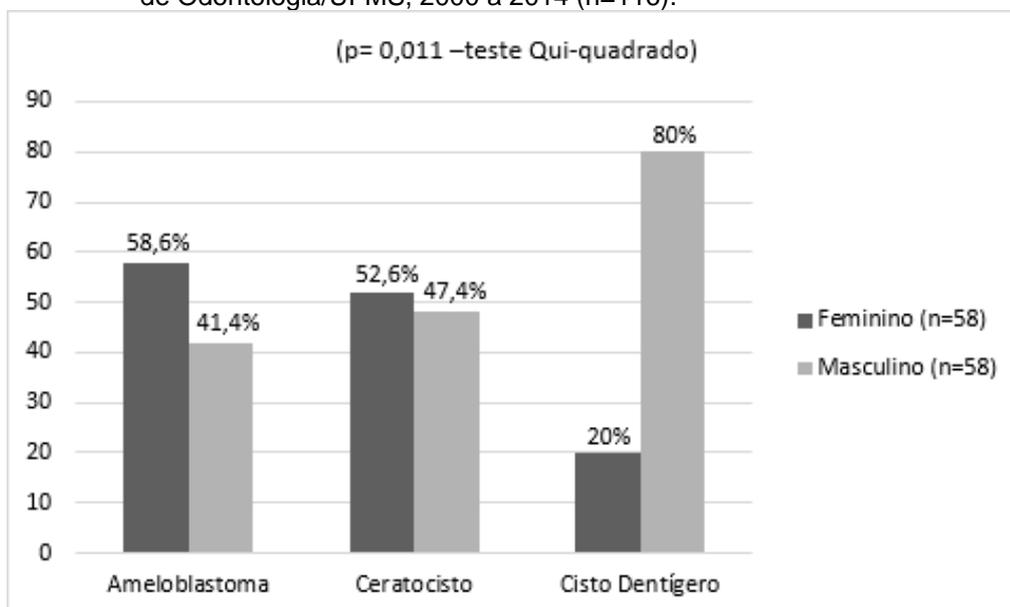
mais prevalentes na faixa etária de 21 a 40 anos e o cisto dentífero obteve os maiores valores para a faixa até 20 anos e de 21 a 40 anos.

Gráfico 1 – Número e porcentagem de lâminas segundo o a faixa etária e o tipo de tumor ou cisto, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116). Em 4 (quatro) lâminas não havia informação em relação a idade do paciente.



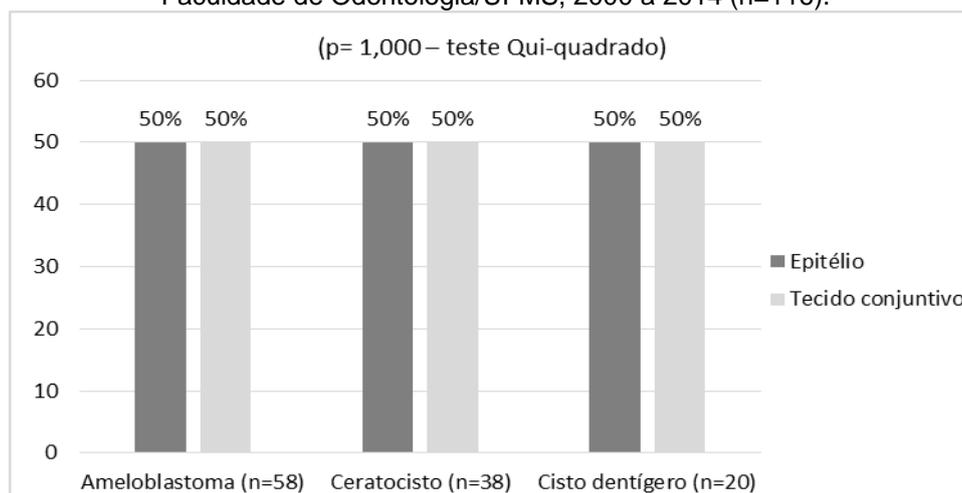
Segundo o Gráfico 2, no ameloblastoma e ceratocisto odontogênico houve maior porcentagem de lesões em mulheres com 58,6% e 52,6% respectivamente. Para o cisto dentífero, houve maior porcentagem em homens (80%).

Gráfico 2 – Número e porcentagem de lâminas segundo o gênero e o tipo de tumor ou cisto, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).



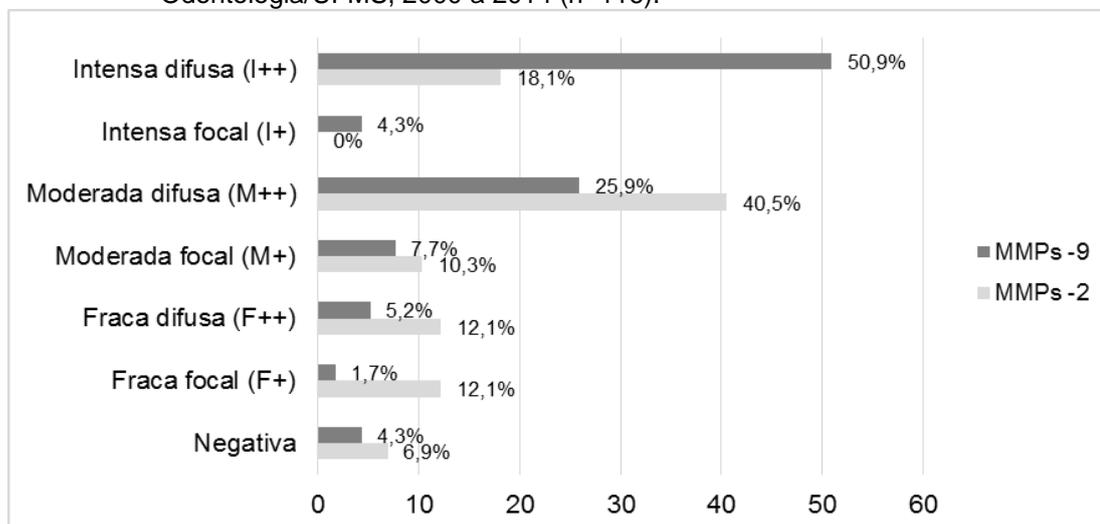
A quantidade de lâminas com o epitélio afetado foi exatamente a mesma com o tecido conjuntivo afetado ($p= 1,000$ – teste Qui-quadrado), nos ameloblastomas, ceratocistos e cistos dentígeros, conforme o Gráfico 3.

Gráfico 3 – Número e porcentagem de lâminas segundo o tipo de tumor ou cisto e o tecido afetado, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).



Em relação à expressão MMPs -9 (n=116), houve maior percentual (55,2%) de imunomarcção do tipo intensa (50,9% I++ somado a 4,3% I+), em comparação à marcação MMPs -2 (18,1% de I++), na qual houve maior porcentagem de lâminas classificadas nas categorias de menor agressividade: 40,5% de M++, 10,3% de M+, 12,1% de F++, 12,1% de F+ e 6,9% de marcação negativa (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Porcentagem de lâminas segundo a imunomarcção da expressão MMPs -2 e MMPs -9, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).



De acordo com a Tabela 1, quando foi comparada a imunomarcação da expressão da MMPs -2 segundo o tecido afetado, o valor foi maior no epitélio em comparação ao tecido conjuntivo para o ameloblastoma ($p < 0,001$), o que não ocorreu para o ceratocisto ($p = 0,237$) e nem para o cisto dentífero ($p = 0,199$). Para a expressão MMPs -9 não houve diferença em relação ao tecido afetado (epitélio versus tecido conjuntivo) para nenhum tipo de tumor ou cisto: ameloblastoma ($p = 0,371$), Ceratocisto ($p = 0,620$) e Cisto Dentífero ($p = 0,734$).

Ao considerar apenas o epitélio, não houve diferença na imunomarcação da expressão da MMPs -2 ($p = 0,374$) e da MMPs -9 ($p = 0,311$) entre os tipos de tumor ou cisto (ameloblastoma, ceratocisto e cisto dentífero), o mesmo ocorreu em relação ao tecido conjuntivo, MMPs -2 ($p = 0,411$) e da MMPs -9 ($p = 0,960$) (Tabela 1).

Os valores da expressão MMPs -9 foram maiores em comparação a MMPs -2 no tecido conjuntivo, em todos os tipos de tumor e cisto (ameloblastoma, $p < 0,001$; ceratocisto, $p < 0,001$ e cisto dentífero, $p = 0,005$). Em relação ao epitélio, os valores da expressão MMPs -9 foram maiores em comparação aos valores da MMPs -2 apenas no ceratocisto ($p = 0,046$).

De maneira geral, não houve diferença na agressividade da lesão mediante a imunomarcação da expressão da MMPs -2 e MMPs -9 entre o epitélio e o tecido conjuntivo, com exceção do ameloblastoma que apresentou maior agressividade no epitélio (moderada difusa) em comparação ao tecido conjuntivo (moderada focal) pela MMPs -2. A imunomarcação da expressão da MMPs -9 foi maior (intensa) no tecido conjuntivo em comparação ao MMPs -2 (fraca a moderada) para todas as lesões. No epitélio isso aconteceu apenas no ceratocisto, a mediana da MMPs -9 foi maior (intensa) em comparação ao MMPs -2 (moderada).

Tabela 1 – Média, desvio padrão (DP) e Mediana dos valores da expressão MMPs -2 e MMPs -9 em lâminas, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).

Variáveis	n	MMPs -2			MMPs -9			⁽¹⁾ p
		Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
Ameloblastoma								
Epitélio	29	4,3	1,6	4,0	5,0	1,6	6,0	0,067
Tecido conjuntivo	29	3,1	1,1	3,0	4,7	1,4	5,0	<0,001
p⁽²⁾			<0,001			0,371		
Ceratocisto								
Epitélio	19	3,6	2,1	4,0	4,2	2,2	5,0	0,046
Tecido conjuntivo	19	2,8	1,8	2,0	4,7	1,7	6,0	<0,001
p⁽²⁾			0,237			0,620		
Cisto dentífero								
Epitélio	10	3,5	2,2	4,0	4,4	1,5	4,0	0,142
Tecido conjuntivo	10	2,2	1,7	2,0	4,6	1,7	5,0	0,005
p⁽²⁾			0,199			0,734		
Epitélio								
Ameloblastoma	29	4,3	1,6	4,0	5,0	1,6	6,0	0,067
Ceratocisto	19	3,6	2,1	4,0	4,2	2,2	5,0	0,046
Cisto dentífero	10	3,5	2,2	4,0	4,4	1,5	4,0	0,142
p⁽³⁾			0,374			0,311		
Tecido conjuntivo								
Ameloblastoma	29	3,1	1,1	3,0	4,7	1,4	5,0	<0,001
Ceratocisto	19	2,8	1,8	2,0	4,7	1,7	6,0	<0,001
Cisto dentífero	10	2,2	1,7	2,0	4,6	1,7	5,0	0,005
p⁽³⁾			0,411			0,960		

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa.

⁽¹⁾ Teste de Wilcoxon.

⁽²⁾ Teste de Mann Whitney.

⁽³⁾ Teste de Kruskal Wallis.

Segundo a Tabela 2, não houve diferença na expressão entre o tumor e cistos odontogênicos nas duas imunomarcações: MMPs -2 ($p=0,239$) e MMPs -9 ($p=0,624$).

Tabela 2 – Média, desvio padrão (DP) e Mediana dos valores da expressão MMPs -2 e MMPs -9 em lâminas, Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFMS, 2000 a 2014 (n=116).

Tipo de tumor ou cisto	n	MMPs -2			MMPs -9		
		Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana
Ameloblastoma	58	3,7	1,5	4,0	4,8	1,5	6,0
Ceratocisto	38	3,2	2,0	4,0	4,5	2,0	5,5
Cisto dentífero	20	2,9	2,0	3,5	4,5	1,6	4,0
P			0,239			0,624	

Nota: se $p \leq 0,05$ – diferença estatisticamente significativa. Teste de Kruskal Wallis.

6 DISCUSSÃO

Conhecer o comportamento biológico das patologias que afetam a boca é fundamental para a abordagem, terapêutica e prognóstico adequados. Assim, estudar a biologia molecular das populações de células patológicas é a forma de tentar esclarecer questões ainda obscuras. As MMPs possuem papel importante na composição, integridade e degradação da matriz extracelular e membrana basal, e têm sido relacionadas a tumorigênese. Diversos estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado expressão de MMPs e inibidores teciduais de metaloproteinases em patologias odontogênicas (MATOS et al., 2012).

As MMPs são expressas através de estímulos específicos por células existentes no tecido conjuntivo, em especial as células inflamatórias. Assim elas têm a capacidade de remodelação do tecido conjuntivo, fato já evidenciados *in vivo*. Além das remodelações teciduais patológicas, as MMPs promovem também processos naturais de remodelação, como: ovulação, desenvolvimento embrionário, a involução pós-parto do útero, remodelações ósseas fisiológicas, reparação de feridas etc. Sendo assim, é sabido que as MMPs são ativadas não apenas por alterações patológicas, mas que fazem parte também da manutenção fisiológica de diversos processos (SOUZA & LINE, 2002; NAVARRO et al., 2006).

Nesta pesquisa, foram escolhidas as MMPs-2 e -9. Ambas são pertencentes ao grupo das gelatinases e estão diretamente associadas à casos de lesões altamente agressivas e metástases cancerosas. Optou-se por estes dois tipos de MMPs pois, de acordo com a literatura, são enzimas presentes nos processos mais agressivos de tumores e cistos.

A MMP-2 é do grupo das gelatinases e possui como característica principal a degradação do colágeno tipo IV, mas também é capaz de degradar colágeno V, VII, X, gelatinases tipo I, elastina e fibronectina. A MMP-9, também uma enzima do grupo das gelatinases, degrada principalmente colágeno do tipo IV e V e gelatinases do tipo I e V, está envolvida na resistência das células tumorais dificultando os mecanismos de defesa do hospedeiro e estimula as ações anti-inflamatórias/pró-inflamatórias (RAMOS et al., 2014).

Cistos e tumores odontogênicos são patologias consideradas benignas e que derivam do epitélio odontogênico. Dentre as lesões odontogênicas existentes, este

trabalho abordou o estudo das expressões das MMPs em 3 tipos de lesões: ameloblastomas, ceratocistos e cistos dentígeros.

Neste trabalho, todas as lesões foram benignas. Para os ameloblastomas, a faixa etária prevalente foi de 21 e 40 anos, coincidindo com as médias relatadas nos trabalhos de Anyanechi et al., (2014), Baghaei et al., (2014) e Florescu et al. (2012). Na pesquisa de Chae et al., (2015) a média foi de 41 anos de idade, com intervalo de 10-62 anos, números maiores dos que encontrados nesta pesquisa, e o intervalo de idades foi de 11-55.

Ao analisar a faixa etária entre os ceratocistos odontogênicos deste trabalho, prevaleceram os pacientes com idade entre 21 e 40 anos, em acordo com Peixoto et al., (2009). O achado destes autores foi em média 30 anos. Eles sugerem que quanto mais tarde o surgimento da lesão, maiores as chances de recidiva.

Hasan et al., (2014) relataram que o maior aparecimento de cistos dentígeros está entre pessoas de 10 à 30 anos de idade, sendo que nesta pesquisa a faixa de até 20 anos e 21 a 40 anos obtiveram valores iguais.

Quando ao gênero, foi observado nesta pesquisa números equivalentes com 29 lesões ocorrendo no gênero feminino (50%) e 29 no gênero masculino (50%). Apesar de na literatura revisada em geral não citar prelideção por nenhum gênero, alguns autores colocaram em suas pesquisas em qual gênero pertenciam a maioria dos pacientes acometidos pelas lesões.

Anyanechi et al., (2014) e Florescu et al., (2012) encontraram maiores casos de ameloblastomas no gênero masculino, discordando desta pesquisa (58,6% para mulheres). Já Chae et al., (2015) e Baghei et al., (2014) concordaram com este estudo, demonstrando incidências de 2,67:1 (mulheres para homens) e 63,4%, respectivamente.

Para cistos odontogênicos (ceratocisto e cisto dentígero) Baghei et al. (2014); Amm et al., (2014); e Hasan et al., (2014) mostraram maior incidência em homens (55,9%); (1,2:1); (1,6:1) respectivamente. Esta pesquisa está de acordo com a prevalência masculina em apenas cistos dentígeros (80%). Para o ceratocisto (52,6%) ocorreu em mulheres.

Células da interface tumor/estroma podem sintetizar substâncias que participam do crescimento ameloblástico, como as metaloproteinases. Através da sua ação podem atuar sobre a superfície celular, sobre reguladores de crescimento

ligados a matriz, favorecer a proliferação e a invasão de células neoplásicas. (SIQUEIRA et al., 2010; FLORESCU et al., 2012).

Kumamoto et al., (2003) relataram em sua pesquisa a expressão das MMPs - 1, -2 e -9 em ameloblastomas. Eles verificaram a expressão destas enzimas em germes dentários e em componentes celulares de tumores neoplásicos. A marcação para a MMP-9 foi significativamente mais intensa em células estromais do ameloblastoma do que quando comparados com células epiteliais e no folículo dentário. Em geral, as células tumorais mostraram marcação fraca para a MMP-2. Yoon et al., (2011), Ribeiro et al., (2012) e Florescu et al., (2012) encontraram resultados semelhantes, com predominância da MMP-9 em células estromais do ameloblastoma e fraca marcação para a MMP-2. No presente estudo a marcação da MMP-9 se mostrou mais intensa em região estromal do que a MMP-2 no tumor ameloblástico ($p < 0,001$), concordando com os achados dos referidos autores.

Para Jiang et al., (2008) as glicoproteínas transmembranar são capazes de induzir a partir de células tumorais, fibroblastos e células endoteliais a expressão das MMPs, aumentando significativamente a quantidade desta enzima na região patológica. Estas glicoproteínas foram expressas principalmente por células endoteliais próximas as membranas basais com proliferação de células ativas, o que pode justificar a presença das MMPs em estroma. Estas glicoproteínas estavam presentes em 85,37% dos ameloblastomas estudados e 62,50% dos cistos estudados na pesquisa.

Matos et al., (2012) constataram a presença das MMPs-2 e -9 em todos os processos teciduais de tumores odontogênicos (ameloblastoma, ceratocisto odontogênico, tumor odontogênico adenomatóide, mixoma odontogênico, tumor odontogênico cístico calcificante, etc), que está de acordo com esta pesquisa.

Florescu et al., (2012) relataram em sua pesquisa que em epitélio, as MMPs-9 foram localizadas nas células cilíndricas e nas células semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte. Na região do estroma, a imunorreatividade destas enzimas foram localizadas em fibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais, em torno de ninhos de células tumorais. Em epitélio, a marcação obteve significância apenas para a MMP-2 (quando comparada ao estroma), e evidente nas células semelhantes ao retículo estrelado. Na presente pesquisa, obteve-se resultados semelhantes ao comparar o tecido epitelial ao estroma da lesão apenas para a MMP-2, o ameloblastoma apresentou maior expressão em epitélio ($p < 0,001$).

Não houve diferença estatística quando comparado epitélio e região estromal para a MMP-9.

Pinheiro et al., (2004) relataram que a capacidade das células tumorais do ameloblastoma em produzir MMP-1, -2 e -9 foi constatada por zimografia e pela técnica imuno-histoquímica. Ao produzirem fatores mitogênicos e degradar a matriz óssea, contribuem para a proliferação tumoral. Além da ação das MMPs na matriz extracelular, elas também agem nos substratos não-matriz, induzindo reguladores de crescimento ligados a matriz, liberando-os em “lojas” e agindo sobre a superfície celular. Através das ações das MMPs na superfície celular ocorre sinalização mediada, resultando na liberação de receptores de fator de crescimento de fibroblastos. Ambas as células (tumorais e estromais) são capazes de expressar MMPs, que após degradar a matriz óssea libera fatores mitogênicos de forma aleatória. Estes, aumentam a taxa de proliferação das células do ameloblastoma e estimulam o crescimento com projeções para fora da porção central do tumor. Através destas ramificações, a neoplasia tem capacidade de penetrar profundamente no osso, provando assim a sua capacidade de invasão local.

Wang et al., (2008) sugerem que a inibição das MMPs pode ser uma forma de terapêutica contra o ameloblastoma.

Ao se tratar de cistos odontogênicos, Ribeiro et al., (2012) sugeriram que a explicação para o crescimento dos ceratocistos é relacionada com o aumento hidrostático dentro da lesão, ocorrendo o pressionamento das estruturas adjacentes e causando a reabsorção óssea. Contudo, esta patologia possui também o crescimento através do osso medular, que sugere a ação de outros mecanismos na progressão da lesão, como as MMPs (degradação principalmente do colágeno). Ao redor dos cistos e tumores, existe um estroma bastante complexo, a matriz extracelular. A destruição desta inclui três etapas: migração das células para a degradação da MEC, adesão das células tumorais à MEC, e a degradação por proteólise da MEC.

Para Matos et al., (2012) o aumento de MMP-2 pode estar relacionado com o comportamento mais agressivo e infiltrativo, causando reabsorção óssea. A Metaloproteinase 9 também parece cooperar com a progressão da lesão, mas talvez não seja a principal protease envolvida no processo. Segundo Ramos et al. (2014), o revestimento epitelial do tecido conjuntivo do ceratocisto odontogênico apresentou em 100% de suas amostras a presença da MMP-2. A marcação foi considerada

intensa em todos os fibroblastos presentes, e ao longo de todo contorno nas células epiteliais em contato com o tecido conjuntivo. Para a MMP-9, o tecido epitelial demonstrou 100% de marcação, porém de baixa intensidade; enquanto o tecido conjuntivo marcou 91% das amostras também com baixa intensidade. Amm et al., (2014) também declararam que em todas as células dos ceratocistos foram expressas intensas atividades da MMP-2, determinadas por zimografia em gelatina. Foram encontradas de forma difusa por todo o tumor e também da camada de paraqueratina do epitélio.

Os resultados desta pesquisa não coincidem com os autores acima citados. Demonstrou-se que a MMP-9 esteve presente de forma mais intensa que a MMP-2 em tecido conjuntivo ($p < 0,001$) de todas as lesões císticas em epitélio para os ceratocistos ($p < 0,046$). Pelo fato do ceratocisto odontogênico ser uma lesão altamente agressiva, e nesta pesquisa ter sido encontrada expressões consideráveis de MMP-9, sugere-se a participação destas enzimas na degradação os componentes extracelulares e no crescimento e agressividade desta lesão.

De acordo com Dineshkumar et al., (2015) pouca atenção tem se dado a região de estroma dos tumores e cistos odontogênicos. O trabalho atual se preocupou em avaliar a expressão dos marcadores em estroma, e verificou-se que os componentes deste tecido (células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos) demonstraram expressões significativas.

Ribeiro et al. (2012), relataram a expressão de MMP-9 em ceratocistos, e detectaram que a marcação expressiva em região de estroma com índices de 60%, e em sequência em epitélio (10%). Foi detectada a presença da marcação suave para MMP-2. Maior significância foi obtida pelo estroma, assim como esta pesquisa.

Na camada suprabasal, é notada grande atividade mitótica epitelial. Alguns estudos relataram que as MMPs sintetizadas pelas células estromais podem potencializar as MMPs produzidas pelas células epiteliais. Assim, é sabido que o estroma desempenha papel importante na regulação do microambiente tumoral, pela ação de fibroblastos estromais em cooperação com células epiteliais na síntese das MMPs e favorecimento do crescimento da lesão (MATOS et al., 2012).

Nesta pesquisa as expressões por MMP-2 e MMP-9 foram evidenciadas em diversas células na região do estroma da lesão. Principalmente a MMP-9. A grande quantidade de marcação em macrófagos, fibroblastos, células endoteliais foram

detectadas em várias amostras de ceratocistos e menos frequentes nos cistos dentígeros

Khot et al.(2015) demonstraram que em região de estroma, ceratocisto expressou MMP-9 em 84% dos casos e o cisto dentígeros 38%. Em epitélio, a MMP-9 foi expressa apenas pelos ceratocistos. Os resultados encontrados no presente estudo, também mostraram expressão significativa em região estromal para a MMP-9 em ceratocistos e cistos dentígeros quando comparados a MMP-2 ($p<0,001$). Em relação ao epitélio não houve valores expressivos para os cistos dentígeros. Em relação a infiltrado inflamatório, este se demonstrou leve em ceratocistos quando comparado ao cisto dentígero. Nas últimas pesquisas têm se associado a expansão do epitélio cístico a presença de resposta inflamatória. Este fato de torna interessante levando em consideração que as células inflamatórias são capazes de produzir MMPs.

Suojanen et al., (2014) provaram que células epiteliais individuais dos cistos dentígeros apresentaram positividade suave para a expressão das MMP-9. Na região de conjuntivo, as MMP-9 foram expressas em células endoteliais próximas as regiões epiteliais, fatos também presentes nesta pesquisa.

Santos et al., (2011) constataram a presença de forma ativa das MMPs-9 em 75% dos ceratocistos e 30% dos cistos dentígeros. Foi apontado maior expressão desta MMP em células epiteliais do que nas células no tecido conjuntivo da cápsula fibrosa. Os resultados acima estão em desacordo com esta pesquisa (estroma para MMP-9 com $p>0,005$). Estes autores sugeriram que essa maior presença em células epiteliais pode ser a principal causa da degradação da membrana basal.

Ao comparar a marcação entre as lesões, há uma concordância entre diversos autores sobre a ligação das MMPs com a progressão das lesões odontogênicas. Zhang et al. (2009), evidenciaram maior a expressão em ameloblastoma (84,06%); Ghada et al. (2010) concluíram que a MMPs pode estar relacionada com a progressão, crescimento, invasão e recorrência das patologias intra-ósseas odontogênicas

Para Santos et al., (2011) e Ribeiro et al. (2012) o ceratocisto odontogênico possui maior expressão quando comparado aos outros cistos odontogênicos, entres eles o cisto dentígero. A quantidade da expressão da MMP apresentou semelhança a expressão no ameloblastoma.

Contudo, nesta pesquisa não houve números estatísticos significativamente maiores para nenhuma das patologias, discordando com alguns autores da literatura. As discordâncias dos resultados podem ser explicadas pelas diferenças de processamento de tecidos em laboratórios ou pelos diferentes anticorpos utilizados. De fato, o ameloblastoma possui números maiores de expressões para a MMP-2 e -9 quando comparados a ceratocistos e cistos dentígeros. Assim ocorre também com os ceratocistos, que possuem expressões maiores que os cistos dentígeros. Neste estudo não se evidenciou maior agressividade por parte de nenhuma lesão.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a expressão das MMP-2 e -9 em tumores ameloblásticos, ceratocistos odontogênicos e cistos dentígeros. Comparações entre tipos de tecidos e expressão das MMPs foram realizadas. Todas estas lesões apresentaram a presença destas proteínas de forma aumentada tanto em epitélio como em estroma/tecido conjuntivo. Ao comparar a MMP-9 com a MMP-2, a região estromal das três lesões e o tecido epitelial do ceratocisto odontogênico apresentaram resultados significativos apenas para a MMP-9. A MMP-2 demonstrou expressão bastante significativa ao ser comparada entre os dois tipos de tecido, com maior significância para o tecido epitelial, apenas no ameloblastoma.

De forma geral, apesar do ameloblastoma ter demonstrado números de expressões maiores para os dois tipos de metaloproteinases, esses não foram estatisticamente significantes. O mesmo ocorre na comparação entre o ceratocisto odontogênicos e o cisto dentígero, onde o primeiro obteve maiores expressões. Sendo assim, não houve diferença significativa entre as expressões de MMPs nas três lesões, não ocorrendo maior agressividade por parte de nenhuma delas. Concluí-se que a agressividade maior por parte do ameloblastoma e ceratocisto estudado na literatura, pode ser devido a outros fatores influentes oriundos do estroma ou mesmo do próprio epitélio.

REFERÊNCIAS

- Amm HM, Casimir MD, Clark DB, Sohn P, MacDougall M. Matrix metalloproteinase expression in keratocystic odontogenic tumors and primary cells. *Connect Tissue Res.* 2014;55(S1):97–101.
- Antunes JLF, Toporcov TN, Wunsch-Filho V. Resolutividade da campanha de prevenção e diagnóstico precoce do câncer bucal em São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2007;21(1):30-36.
- Anyanechi CE, Saheeb BD. A review of 156 odontogenic tumors in Calabar, Nigeria. *GHANA MEDICAL JOURNAL.* 2014 September;48(3):163-67.
- Avelar RL, Antunes AA, Santos TS, Andrade ESS, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.* 2008 Setembro/Outubro;74(5):668-673.
- Baghaei F, Zargaran M, Najmi H, Moghimbeigi A. A Clinicopathological Study of Odontogenic Cysts and Tumors in Hamadan, Iran. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* 2014 December;15(4):167-172.
- Chae MP, Smoll NR, Hunter-Smith DJ, Rozen WM. Establishing the Natural History and Growth Rate of Ameloblastoma with Implications for Management: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2015 February;10(2):1-13.
- Chantravekin Y, Koontongkaew S. Effects of ameloblastoma-associated fibroblasts on the proliferation and invasion of tumor cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics.* 2014 October-December;10(4):1082-1087.
- Cioranu VI, Iorgulescu D, Seceleanu VP, Cioranu SI, Toma C, Fronie AI, Fagetan IM, Nicolae V. Malignant ameloblastoma in an 8-year-old child with metastasis to the lung: case report with a clinicopathologic analysis. *Rom J Morphol Embryol.* February 2014;55(1):183–187.

Costa FS, Cardoso MJL, Muniz LMR, Vulcano LC, Justulin Junior LA, Felisbino SL, Martins Filho S. Avaliação das metaloproteínases de matriz –2 e –9 em gatos com desmineralização óssea secundária à tirotoxicose induzida. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008;60(5):1053-1060.

Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and Quantitative Analysis of Protein Expression. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 July;130:1026-1030.

Dako Denmark A/S. EnVision FLEX, High pH, (Link). Denmark. 4th ed. 2011.

Diana H, Maya R, Sekar B, Murali S, Ramesh K. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Keratocystic Odontogenic Tumour and Variants of Ameloblastoma – A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014 Nov;8(11):115-118.

Dineshkumar T, Priyadharsini N, Gnanaselvi UP, Sathishkumar S, Srikanth RP, Nagarathinam AE. Evaluation and Comparison of Vascular Endothelial Growth Factor Expression between Ameloblastoma and Keratocystic Odontogenic Tumor. *Journal of International Oral Health.* 2015 November;7(1):48-52.

Florescu A, Margaritescu CL, Simionescu CE, Stepan A. Immunohistochemical expression of MMP-9, TIMP-2, E-cadherin and vimentin in ameloblastomas and their implication in the local aggressive behavior of these tumors. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(4):975–984.

Fregnani ER, Sobral LM, Alves FA, Soares FA, Kowalski LP, Coletta RD. Presence of Myofibroblasts and Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in Ameloblastomas Correlate with Rupture of the Osseous Cortical. *Pathol. Oncol. Res.* (2009) 15:231–240.

Ghada A, Khalifa MD, Hanan M, Shokier MD, Eman A. Evaluation of Neoplastic Nature of Keratocystic Odontogenic Tumor Versus Ameloblastoma. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 2010 March;22(1):61-72.

Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Santos JET. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial?. *Rev Bras Hipertens*. 2010;17(4):226-230.

Hasan S, Ahmed SA, Reddy LB. Dentigerous cyst in association with impacted inverted mesiodens: Report of a rare case with a brief review of literature. *Int J Appl Basic Med Res*. 2014 Sep;4(1):S61–S64.

Henriques ACG, Cazal C, Fonsêca DDD, Bello DMA, Araújo NC, Castro JFL. Considerações sobre a classificação e o comportamento biológico dos tumores odontogênicos epiteliais: Revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009 Fev;55(2):175-184.

Henriques ACG, Vasconcelos MG, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY*. 2011 October;112(4):468-475.

Imada TSN, Tieghi Neto V, Gonçalves ES. Unusual bilateral dentigerous cysts in a nonsyndromic patient assessed by cone beam computed tomography. *Contemp Clin Dent*. 2014 Apr-Jun;5(2):240–242.

INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES CORPORATION (IBM). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk: IBM Corporation, 2015.

Jardim ECG, Manrique GR, Mendonça JCG, Hanssessian A, Barros RMG. Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia. *Arch Health Invest*. 2013;2(1):40-49.

Jiang LJ, Shao CK, He D, Li WG, Wu XZ, Cai DZ. Correlations of extracellular matrix metalloproteinase inducer and microvessel density to invasiveness of ameloblastoma. *Chinese Journal of Cancer*. 2008;27(12):510-513.

Kasangari MD, Gundamaraju K, Jyothsna M, Subash AV, Aravind K. Hemangiomatic Ameloblastoma- A Case Report of a Very Rare Variant of Ameloblastoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015 May;9(5):ZD08-ZD10.

Khot K, Deshmukh SB, Alex S. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous cyst and radicular cyst. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2015 July-September,11(3):635-640.

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*. 2003;32:114–20.

Kumar V. Conservative surgical approach to aggressive benign odontogenic neoplasm: a report of three cases. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2015;41:37-42.

Lee JH, Kim SM, Kim HJ, Jeon KJ, Park KH, Huh KJ. Characteristics of bony changes and tooth displacement in the mandibular cystic lesion involving the impacted third molar. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2014;40:225-232.

Lin Z, Sun G, Wang T, Hu Q, Chen F, Wen S. Soft tissue recurrent ameloblastomas also show some malignant features: A clinicopathological study of a 15-year database. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.(2014),doi:10.4317/medoral.20276.

Madhup R, Kirti S, Bhatt MLB, Srivastava M, Sudhir S, Srivastava AN. Giant ameloblastoma of jaw successfully treated by radiotherapy. *Oral Oncology EXTRA*. 2006;42:22–25.

Majumdar S, Uppala D, Rao AK, Talasila S, Babu M. Dentigerous Cyst Associated with Adenomatoid Odontogenic Tumour. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015 May;9(5):ZD01-ZD04.

Masthan KMK, Anitha N, Manikkam S. Ameloblastoma. J Pharm Bioallied Sci. 2015 Apr;7(1):S167–S170.

Matos FR, Vasconcelos RG, Queiroz LMG, Freitas RA. Expressão de MMPs, marcadores angiogênicos e proliferação celular em tumores odontogênicos. Bras Patol Med Lab. 2012 outubro;48(5):375-381.

Mazghi AE, Bouhafa T, El kacemi H, Loukili K, Chbani L, Kebdani T, Hassouni K. Rôle de la radiothérapie dans le traitement de l'améloblastome: à propos de deux cas. Pan African Medical Journal. 2014:1-4.

Miyagi SPH, Hiraki KRN, Martins MD, Marques MM. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic mixoma *in vivo* and *in vitro*. Journal of Oral Science. 2008;50(2):187-192.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. Revista de Odontologia da UNESP. 2006;35(4):233-38.

Oliveira CM, Ribas MO, Forone SG, Barreto E, Lima AAS, Sousa MH, Braga AMC. Ceratocisto odontogênico na maxila: relato de caso. Clin. Pesq. Odontol. 2005 out./dez.;2(2):139-143.

Park HS, Song IS, Seo BM, Lee JH, Kim MJ. The effectiveness of Decompression for patients with dentigerous cysts, keratocystic odontogenic tumors, and unicystic ameloblastoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2014;40:260-265.

Patil S, Halgatti V, Khandelwal S, Santosh BS, Maheshwari S. Prevalence of cysts and tumors around the retained and unerupted third molars in the Indian population. Journal of oral biology and cranio facial research. 2014:82-87.

Peixoto RF, Menezes DPB, Pereira JS, Pereira KMA, Costa ALL. Tumor odontogênico ceratocístico: revisão dos achados atuais. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac. 2009 jul./set.;9(3):21-28.

Pereira JV, Figueirêdo DU, Souza EA, Holmes TSV, Gomes DQC, Cavalcanti AL. Prevalência de cistos e tumores odontogênicos em pacientes atendidos na Fundação Assistencial da Paraíba: estudo retrospectivo. *Arquivos em Odontologia*. 2010 abril/junho;45(2):75-81.

Pinheiro JJV, Freitas VM, Moretti AIS, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology*. 2004, 45, 65–72.

Ram H, Mohammad S, Husain N, Gupta PN. Ameloblastic Carcinoma. *J. Maxillofac. Oral Surg*. 2010 Sept-Dec; 9(4):415–419.

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

Rashid H, Bashir A. Surgical and prosthetic management of maxillary odontogenic myxoma. *Eur J Dent* 2015;9:277-83.

Reis SCGB, Marcelo VC. Saúde bucal na velhice: percepção dos idosos, Goiânia, 2005. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2006;11(1):191-199.

Ribeiro BF, Iglesias DPP, Nascimento GJF, Galvão HC, Medeiros AMC, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1, -2 and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Diseases*. 2009;15:472-477.

Ribeiro ALR, Nobre RM, Alves-Junior SM, Kataoka MSS, Barroso RFF, Jaeger RG, Pinheiro JJV. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and growth factors regulate the aggressiveness and proliferative activity of keratocystic odontogenic tumors. *ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY*. 2012 October;114(4):487-496.

Rizzitelli A, Smoll NR, Chae MP, Rozen WM, Hunter-Smith DJ, Incidence and Overall Survival of Malignant Ameloblastoma. PLOS ONE. 2015;10(2):1-9.

Santos PPA, Aquino ARL, Barreto AO, Freitas RA, Galvão HC, Souza LB. Immunohistochemical expression of nuclear factor B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112(4):476-483.

Sekerci AE, Nazlım S, Etoz M, Deniz K, YasaY. Odontogenic tumors: A collaborative study of 218 cases diagnosed over 12 years and comprehensive review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2015 Jan;1;20(1):e34-44.

Shen LC, Chen YK, Hsue SS, Shaw SY. Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix Metalloproteinases in ameloblastoma. J Oral Pathol Med (2010) 39: 242–249.

Silva BF, Santos Junior JF, Abrahão M, Cervantes O, Miranda SL. Ameloblastoma: revisão de literatura. Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. 2004 jan./fev./Març.;33(1).

Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. Bras Patol Med Lab. 2007 junho;43(3):203-209.

Singh M, Shah A, Bhattacharya A, Raman R, Ranganatha N, Prakash P. Treatment Algorithm for Ameloblastoma. Case Reports in Dentistry. 2014 December;1-6.

Siqueira AS, Carvalho MRD, Monteiro ACD, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJV. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. Histopathology. 2010;57:128–137.

Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. Rev. FOB. 2002 jan./mar.; 10(1):1-6.

Souza JGO, Claus JPD, Ouriques FD, Gil LF, Gil JN, Cardoso AC, Bianchini MA. Treatment of Odontogenic Myxoma: A Multidisciplinary Approach-6-Year Follow-Up Case. *Case Reports in Dentistry*. 2014 December;1-4.

Suojanen J, Lehtonen N, Färkkilä EM, Hietanen J, Teronen O, Sorsa T, Hagström J. Common Matrix Metalloproteinases (MMP-8, -9, -25, and -26) Cannot Explain Dentigerous Cyst Expansion. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Sep;8(9):82-85.

Varoli FP, Costa E, Buscatti MY, Oliveira JX, Costa C. Tumor odontogênico queratocístico: características intrínsecas e elucidação da nova nomenclatura do queratocisto odontogênico. *J Health Sci Inst*. 2010;28(1):80-3.

Vaz LGM, Rodrigues MTV, Ferreira Júnior O. Cisto dentígero: características clínicas, radiográficas e critérios para o plano de tratamento. *RGO*. 2010 jan./mar.;58(1):127-130.

Wang A, Zhang B, Huang H, Zhang L, Zeng D, Tao Q, Wang J, Pan C. Suppression of local invasion of ameloblastoma by inhibition of matrix metalloproteinase-2 in vitro. *BMC Cancer*. 2008;8(182):1-9.

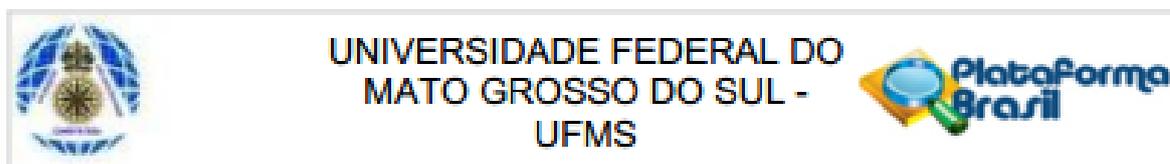
Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J Bras Patol Med Lab*. 2005 Outubro;41(5):353-64.

Yoon HE, Jo BC, Shin WJ, Cho YA, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Comparative Immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY*. 2011 December;112(6):767-776.

Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Chen WL, Tao O, Zeng DL, Zhang LT, Xu JH. Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. *J Oral Pathol Med* (2009) 38: 731–736.

Zhong WQ, Chen G, Zhang W, Ren JG, Wu ZX, Zhao Y, Liu B, Zhao YF. Epithelial-Mesenchymal Transition in Keratocystic Odontogenic Tumor: Possible Role in Locally Aggressive Behavior. *BioMed Research International*. 2015 February;1-9.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: MARCAÇÃO PELAS METALOPROTEINASES 2 E 9 EM CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS

Pesquisador: Camila Stevaneli Freitas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44425315.6.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.136.372

Data da Relatoria: 02/07/2015

Apresentação do Projeto:

Pesquisa longitudinal retrospectiva, em banco de material biológico, sobre cistos e tumores odontogênicos.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a expressão de MMPs 2 e 9 em cistos e tumores odontogênicos encontrados no laboratório de anatomopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por envolver a manipulação de biópsias já realizadas, sem qualquer tipo de envolvimento direto dos pacientes, os riscos são mínimos. Os benefícios são satisfatórios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho avaliará quantitativamente a expressão das MMPs 2 e 9 pelo método imuno-histoquímico em espécimes de cistos e tumores odontogênicos, com intuito de avaliar os diferentes graus de agressividade destas lesões. Dados como idade, gênero e local anatômico da lesão serão obtidos do prontuário dos pacientes. Serão selecionados todos os blocos dos respectivos cistos e tumores odontogênicos da pesquisa e seus prontuários do ano de 2000 à junho de 2014, triados no serviço de laboratório de Anatomopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 1.126.372

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Será verificada a imunomarcagem através de um estudo cego por dois examinadores patologistas em momentos distintos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta Autorização da Direção da Faculdade de Odontologia da UFMS, responsável pelo laboratório de Patologia Bucal. Apresenta Termo de Compromisso de Utilização de Banco de Dados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPO GRANDE, 02 de Julho de 2015

Assinado por:

PAULO ROBERTO HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: bioetica@propp.ufms.br