

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Avaliação histopatológica e expressão imunoistoquímica de PTHrP e receptor de PTH/PTHrP tipo I em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos

Adriana Corrêa de Lima

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

Ribeirão Preto

2009

Adriana Corrêa de Lima

Avaliação histopatológica e expressão imunoistoquímica de PTHrP e receptor de PTH/PTHrP tipo I em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos

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

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Ribeirão Preto

2009

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

L732a Lima, Adriana Corrêa de, 1982 -
Análise histopatológica e expressão imunoistoquímica de PTHrP e
receptor de PTH/PTHrP do tipo I em cistos radiculares, cistos
dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos
/ Adriana Corrêa de Lima. - - Ribeirão Preto, 2009.
103 f.: il. color.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão
Preto, UNAERP, Odontologia, área de concentração:
Endodontia. Ribeirão Preto, 2009.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cistos odontogênicos.
4. Imunoistoquímica. I. Título.

CDD: 617.6342



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Odontologia e no Laboratório de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/ PROSUP (12/02-5).

"É possível ser cientista e pesquisador num abrir e fechar de olhos: basta aprender a abrir os olhos para ver, e aprender a fechá-los depois, para pensar."

Prof. Dr. Geraldo Maia Campos



Dedicatórias

À Deus

Senhor meu DEUS e meu Pai; Eu te Agradeço por tudo que tens feito em minha vida: pela alegria de viver, por minha família, pelos meus amigos, pelo ar que respiro, pelos dons que me deste e pelos relacionamentos que possibilitam que eu cresça a cada dia. Obrigada, PAI, pelas oportunidades que me tens dado de testemunhar o Amor com que amas a mim e a todas as pessoas. Obrigada por Teu perdão e por dar-me uma vida plena e abundante. Senhor, a Ti, que já és dono de tudo o que sou e que possuo, dedico a minha vida, clamando que ela possa ser usada para fins nobres e verdadeiros e que todos os frutos de minha vida Honrem e Glorifiquem o Teu nome.

À minha querida ***Mãe, Terezinha Barbosa de Lima***

Primeiramente, quero dizer que te amo muito. Meus olhos se enchem de lágrimas quando lembro dos momentos felizes que passamos juntas. Nos momentos de tristezas você sempre está do meu lado me consolando. Em todos os momentos da minha vida você é, minha amiga, meu pai, minha irmã e conselheira. Você é minhas pernas quando eu não posso andar, meus olhos quando não enxergo, minha boca quando não falo... Você tem sido um raio de esperança e motivo para muitas risadas quando eu só queria chorar. Seria pouco te dar o mundo, talvez o mar, talvez a felicidade completa. Mas tudo isso seria pouco demais perto do que merece. Porém, eu sei que te dar tudo isso seria impossível, pois o que tenho a lhe oferecer em forma do meu agradecimento, seria todo o meu amor sincero, o meu sorriso e dizer que quando precisar de alguém, chame por mim, e eu virei com toda ternura do mundo para lhe dar a minha vida se for possível. Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, seja sempre esta pessoa maravilhosa que você é, porque você é a pessoa que admiro, amo e respeito, pelo ontem, por hoje, pelo amanhã e para sempre.

Você é meu tesouro!

Ao meu querido ***Pai, Pedro Eustáquio Corrêa de Lima***

Foi a tua mão que encontrei estendida, quando realmente precisei de um amigo. Foram teus olhos que fixei, quando senti-me só. Tuas palavras me orientaram, mostrando o caminho correto, que eu não encontrava. Teu sorriso consolou-me. Sua força interior era tudo que precisava. Pai, obrigada por existir, sempre te admirei e eternamente te amarei.

Te amo!

Aos meus irmãos, ***Patrícia e Paulo César,***

O que sinto nesse momento é uma enorme alegria, em saber que sempre quando preciso, posso contar com vocês! Na minha caminhada são alicerces que nunca me deixam cair, nas horas de angústia as palavras são de conforto, quando me sinto sozinha, estão sempre por perto me apoiando e dizendo palavras de carinho e compreensão. E na felicidade estamos sempre juntos. "Agradeço a Deus por ter me dado vocês como amigos e irmãos, pois assim eu aprendi o caminho da verdadeira felicidade."

Amo vocês!



Agradecimentos

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

Ao meu orientador **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, por contribuir para o meu aprendizado, pela confiança, dedicação, orientação e acompanhamento deste trabalho em todas as fases, meu especial agradecimento.

À **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, pela simplicidade, amizade, dedicação, carinho e contribuições valiosas que ampliaram meus conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto**, pelo exemplo de dedicação, competência e perseverança, pelos ensinamentos ao aprimoramento profissional e pela confiança atribuída

Ao **Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa**, pelo exemplo pessoal e profissional, amizade e apoio na minha formação.

Aos professores do Curso de Mestrado em Odontologia, área de concentração Endodontia, da Universidade de Ribeirão Preto: **Profa. Dra. Neide Aparecida de Sousa Lehfeld, Profa. Aline Evangelista de Souza Gabriel, Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho, Prof. Celso Bernardo de Souza Filho, Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Lisete Diniz Casagrande, Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan, Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto, Prof. Manoel H. Gabarra, Prof^a. Dra. Melissa Marchesan, Prof. Dr. Ricardo**

Gariba Silva, Prof^a. Dr^a. Yara T. Corrêa Silva Sousa, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas de turma da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Roseli Azevedo, Caroline Zamin, Lívia M. Rodrigues, Raqueli Viapiana, Leandro Tolentino, César A. P. Oliveira, Jorge A. da Costa, Lizandro Gonçalves, Ernando Assunção Ferreira, Felipe Barros Matoso, Alison L. Kirchhoff e Marcelo F. Munhoz.**

Aos amigos **José Estevam Vieira Ozório, Fuad Jacob Abi Rached Jr , Alessandro Rogério Giovani.**

A funcionária **Rosemary Alexandre**, do Serviço de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto, pelo carinho e atenção sempre que precisei, obrigada pelos ensinamentos.

A **Cecília Maria Zanferdini e Joana Neiva Vieira** secretárias da Pós-Graduação e às secretárias do Curso de Odontologia **Marina Janólio Ferreira, Valéria Rodrigues da Silva**, pela dedicação e seriedade com que realizam o seu trabalho.

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, **Fábio Juliano do Santos, Fabíola Domenes de Sousa, Sérgio Pereira de Mendonça**, pela dedicação.

Aos amigos da **Odontológica Sistema Integrado de Saúde Oral-LTDA**, obrigada por tornarem a minha vida mais colorida.

Aos diretores, professores e funcionários da **Associação Brasileira de Odontologia- Regional Uberlândia-** em especial aos amigos do departamento de **Endodontia e Periodontia** pela gentileza e amizade.

Ao **Antonelly Corrêa** pela paciência nos ensinamentos de informática.

À querida prima **María Madalena** e filhos, por participarem da minha vida.

Aos meus padrinhos **Marinézia Costa Freitas e Gilmar Sousa Freitas,** juntamente com seus lindos filhos **Cecília Pedrosa e Gabriel Pedrosa,** pelo carinho, força e incentivo.

À **Percília** e sua família, por compartilhar alegria nessa etapa da minha vida.

À querida amiga **Sinara Vieira,** por me ouvir nos momentos mais difíceis e me dar conselhos tão valiosos, obrigada pela amizade.

Ao grande amigo **Sérgio Sargentti,** pelo incentivo e colaboração sempre que precisei.

À amiga **Francine Oliveira,** pelo apoio.

Ao **Prof. Marco Aurélio Versiani,** pela amizade e compreensão.

Ao amigo **José Antônio Vidal,** por sempre transmitir alegria.



Sumário

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	01
REVISTA DA LITERATURA	08
PROPOSIÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ANEXO



Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar as características histopatológicas e expressão imunoistoquímica comparativa de PTHrP e seu receptor PTH/PTHrP tipo I no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa de cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Para tanto, foram analisados 35 casos de cisto radicular, 22 de cisto dentígero e 17 de tumor odontogênico queratocístico, todos oriundos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Ribeirão Preto. Os dados foram coletados das fichas de encaminhamento das lesões. Cortes histológicos de 3 μ m de espessura foram obtidos de blocos de parafina, nos quais foram realizadas reações imunoistoquímicas, utilizando o método estreptavidina-biotina-peroxidase. Para determinar a porcentagem de células positivas, as lâminas foram avaliadas por 2 examinadores de forma independente, em aumento de 400x, adotando os seguintes critérios: negativo - <5% de células positivas, expressão fraca - 5%-50% de células positivas e expressão forte - >50% de células positivas. Além disso, a intensidade da expressão de PTHrP e PTH/PTHrP-1R também foi avaliada, considerando-a como fraca (+) ou forte (++) . Para análise estatística, utilizou-se o teste exato de Fisher e a correlação de coeficientes de Spearman, adotando significância de 5%. Comparando a expressão de PTHrP no epitélio cístico das lesões estudadas, não se observou diferença estatística significativa ($p=0,9$), o mesmo observado quanto a expressão do receptor PTH/PTHrP ($p=0,3$). Entretanto, as intensidades de expressões de PTHrP ($p=0,01$) e receptor de PTH/PTHrP ($p=0,007$) no epitélio cístico foram significativamente mais fracas nos cistos radiculares, quando comparadas aos cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Na cápsula fibrosa, as diferenças na expressão ($p=0,1$) e intensidade da expressão ($p=0,9$) de PTHrP entre as lesões não foram estatisticamente significantes, o mesmo sendo observado na intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP ($p=0,7$). A expressão do receptor PTH/PTHrP na cápsula fibrosa dos cistos radiculares foi significativamente mais forte ($p=0,04$), quando comparada à expressão nos cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Com esses achados, concluiu-se que a intensidade de expressão de PTHrP e do seu receptor PTH/PTHrP-1R é significativamente mais fraca no revestimento epitelial do cisto radicular, quando comparada ao cisto dentígero e tumor odontogênico queratocístico. Além disso, a co-expressão de PTHrP e seu receptor PTH/PTHrP-1R em quase todos os casos analisados sugere um papel importante dessas proteínas no desenvolvimento e crescimento dessas lesões.



Summary

The aim of this study was to assess the histopathological features and the comparative immunohistochemical expression of PTHrP and its receptor PTH/PTHrP type I (PTH/PTHrP-1R) in the epithelial lining and fibrous capsule of radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. For this study, 35 cases of radicular cyst, 22 of dentigerous cyst and 17 keratocystic odontogenic tumor were evaluated, all from the files of Oral Pathology Laboratory, University of Ribeirao Preto. Epidemiological data were recorded from the guiding form of the lesions to the Laboratory. Histological sections of 3 μ m were obtained from paraffin-embedded tissues, which were used for the immunohistochemical reactions by streptavidin-biotin-peroxidase method. To determine the percentage of positive cells, the slides were independently evaluated by 2 observers, in high power fields (400x), according to following criteria: negative - < 5% of positive cells, weak expression – 5%-50% of positive cells and strong expression - > 50% of positive cells. Moreover, the intensity of PTHrP and PTH/PTHrP-1R expressions was also evaluated, classifying as weak (+) or strong (++) . For statistical analysis, it was used Fisher exact test and the Spearman correlation coefficients, considering a significance of 5%. Comparing the PTHrP expression in the epithelial lining from the 3 studied lesions, no significant statistical difference was observed ($p=0.9$), the same it was observed in the PTH/PTHrP-1R expression ($p=0.3$). However, the intensity of PTHrP ($p=0.01$) and PTH/PTHrP-1R ($p=0.007$) expressions in the epithelial lining of radicular cysts were significantly weaker, when compared to dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. In the fibrous capsule, the differences in the expression ($p=0.1$) and intensity of expression PTHrP ($p=0.9$) between the lesions were not significant. Similar findings were observed in the intensity of PTH/PTHrP-1R expression ($p=0.7$). The PTH/PTHrP-1R expression was significantly stronger in the fibrous capsule of radicular cysts when compared to other lesions ($p=0.04$). According to these findings, it is possible conclude that the intensity of PTHrP and PTH/PTHrP-1R expressions is significantly weaker in the epithelial lining of radicular cyst, when compared to dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. Moreover, the co-expression of PTHrP and its receptor PTH/PTHrP-1R suggests an important role of these proteins in the developing and growth of these lesions.



Introdução

Os cistos odontogênicos originam-se a partir de remanescentes embrionários de epitélio odontogênico e são representados principalmente pelos cistos radiculares, dentígeros e queratocistos (BROWNE, 1975; SHEAR; SPEIGHT, 2006).

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

O desenvolvimento do cisto radicular ocorre devido a uma reação inflamatória no periodonto apical em resposta a uma infecção localizada no interior do canal radicular, o qual apresenta tecido pulpar necrótico. Essa reação inflamatória, juntamente com produtos bacterianos, oriundos do canal radicular, estimulam os restos epiteliais de Malassez a se proliferarem, causando conseqüente degeneração desse epitélio reativo e finalmente formando a cavidade cística (BROWNE, 1975; MAIN, 1985; SHEAR; SPEIGHT, 2007). Atualmente, consideram-se 3 fases na patogênese do cisto radicular; fase de iniciação, fase de formação e fase de crescimento.

Radiograficamente, o cisto radicular se apresenta como lesão radiolúcida bem circunscrita, localizada no periápice ou lateralmente à raiz de um dente com necrose pulpar. Na análise histopatológica, caracteriza-se por uma cavidade revestida internamente por epitélio escamoso estratificado com número variável de camadas celulares e uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que o reveste externamente, a qual frequentemente apresenta infiltrado inflamatório crônico de intensidade variável.

Além dessas características histopatológicas comuns, a lesão pode ainda apresentar células mucosas, ciliadas ou com capacidade de formar queratina, todas elas produto de uma metaplasia sem causa determinada. O conteúdo cístico é formado por células epiteliais descamadas, células inflamatórias, cristais de colesterol, ácido hialurônico e proteínas (BROWNE, 1975; NAIR et al., 2002; NAIR, 2004; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Os aspectos morfológicos do tecido epitelial podem ser considerados um reflexo da atividade funcional do cisto radicular. Lesões com epitélio escamoso estratificado atrófico, de espessura regular e contendo até 10 camadas celulares, geralmente exibem infiltrado inflamatório leve a moderado no tecido conjuntivo e são considerados cistos quiescentes. Entretanto, nos cistos com epitélio escamoso estratificado hiperplásico, com espessura irregular, geralmente são encontrados arcos proliferativos e infiltrado inflamatório intenso na cápsula, caracterizando lesões ativas (SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Os cistos dentígeros e os queratocistos odontogênicos são cistos odontogênicos de desenvolvimento (BROWNE, 1975; MAIN, 1985). Apesar de pertencerem à mesma classificação, possuem características peculiares bem definidas e potencial proliferativo distinto (KICHI et al., 2005).

Os cistos dentígeros estão sempre associados à coroa de dentes não erupcionados, localizados na junção cimento-esmalte e são formados pela expansão dos folículos dentários resultante do acúmulo de fluidos entre a coroa do dente e componentes epiteliais. O epitélio do cisto dentígero origina-se do epitélio reduzido

do órgão dentário, derivado do órgão dentário, e que recobre completamente a coroa de um dente não erupcionado (GROSSMANN et al., 2007; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

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

Radiograficamente nota-se uma lesão radiolúcida unilocular caracterizada por margens escleróticas bem definidas e associada à coroa de um dente não erupcionado (SHEAR; SPEIGHT, 2007). Devido a essas características clínico-radiográficas e microscópicas próprias, o diagnóstico definitivo de cisto dentígero é dado pela análise dessas características em conjunto.

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

Os tumores odontogênicos queratocísticos originam-se dos resíduos da lâmina dental (BROWNE, 1975; KICHI et al., 2005; SHEAR; SPEIGHT, 2007). Caracterizam-se por uma cavidade cística revestida por uma fina camada de tecido epitelial

escamoso estratificado, de 5 a 10 camadas celulares, onde as células da camada basal são colunares e os núcleos se dispõem em paliçada, com freqüente desprendimento do revestimento epitelial da cápsula de tecido conjuntivo fibroso, que se apresenta delgada e raramente com infiltrado inflamatório. Além disso, o corrugamento da camada de paraqueratina superficial é comumente observado. O conteúdo cístico é geralmente semi-sólido, composto predominantemente por queratina e células epiteliais descamadas, e em menor quantidade pode-se observar albuminas e globulinas (BROWNE, 1975; KICHI et al., 2005; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Radiograficamente, os tumores odontogênicos queratocísticos são lesões radiolúcidas, uni ou multiloculares, bem circunscritas e com delgada cortical radiopaca. Quando múltiplas não é raro a presença bilateral e o envolvimento com a síndrome do carcinoma nevíde basocelular (Síndrome de Gorlin-Goltz) (TSUKAMOTO et al., 2002).

Como comentado acima, o cisto radicular, dentígero e o queratocisto odontogênico apresentam características clínicas, microscópicas e radiográficas peculiares. Além desses achados, a evolução dessas lesões também é distinta, com o tumor odontogênico queratocístico sendo localmente mais agressivo, apresentando características mais infiltrativas, o que representa clinicamente lesões maiores e com maiores taxas de recidiva (KICHI et al., 2005; SHEAR; SPEIGHT, 2007). Vários estudos observaram no tumor odontogênico queratocístico, uma maior taxa de proliferação epitelial e expressões diferenciais de fatores de crescimento e genes supressores de tumor (PIATTELLI et al., 2004; KICHI et al., 2005; MALCIC et al.,

2008), quando comparado às outras lesões císticas odontogênicas mais comuns, o cisto radicular e o cisto dentígero. Esses achados podem explicar, pelo menos parcialmente, o comportamento biológico diferente dessas lesões.

Com raras exceções, a maioria dos cistos odontogênicos é intra-óssea. Dessa forma, fatores envolvidos diretamente na indução da reabsorção óssea podem ser cruciais no início, formação e progressão dessas lesões. Várias vias e moléculas estão envolvidas na indução de reabsorção óssea pelos osteoclastos. Entre eles, destaca-se o sistema RANK-RANKL/OPG. O receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) está presente na superfície de osteoclastos em áreas de reabsorção óssea e pertence à superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF), sendo ativado pelo seu ligante, RANKL. Ao contrário, a osteoprotegerina (OPG) interrompe essa ativação, unindo diretamente à RANKL. Assim, os níveis de expressão do complexo RANK-RANKL e OPG regulam a maturação e a ativação de osteoclastos, interferindo em processos de reabsorção óssea fisiológicos e patológicos. RANK-RANKL e OPG foram identificados em granulomas periapicais, cistos radiculares, cistos dentígeros, tumores odontogênicos queratocísticos e ameloblastomas, sugerindo que esse complexo esteja envolvido na progressão dessas lesões (TAY et al., 2004; MENEZES et al., 2006; SILVA et al., 2008). Além disso, os níveis desse complexo têm se mostrado aumentados em tumores odontogênicos, os quais se apresentam localmente mais osteolíticos, quando comparados aos cistos odontogênicos (TAY et al., 2004; SILVA et al., 2008).

A proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) foi inicialmente descrita em pacientes com câncer que apresentavam hipercalcemia. PTHrP apresenta características estruturais e funcionais semelhantes ao PTH, sendo ambos potentes indutores de osteoclastogênese. PTHrP induz a produção de RANKL por osteoblastos, o qual ativa a diferenciação de pro-osteoclastos em osteoclastos (LIAO; McCAULEY, 2006). A ação dessa proteína é realizada via seu receptor PTH/PTHrP tipo I (PTH/PTHrP-1R), o qual também é ativado pelo PTH nativo, visto a similaridade estrutural compartilhada entre PTH e PTHrP. A sua expressão em metástases ósseas vem sendo correlacionada com aumento da destruição óssea e crescimento tumoral (DOWNEY et al., 1997; IDDON et al., 2000; KITAZAWA et al., 2002; LIAO; McCAULEY, 2006). Mesmo com a importância dessa proteína na progressão de várias lesões ósseas, poucos estudos avaliaram a expressão de PTHrP em cistos (LI et al., 1997) e tumores odontogênicos (ABDELSAYED et al., 2004; OHTSURO, 2005). Entretanto, PTHrP também está envolvida em vários processos fisiológicos, como no crescimento ósseo endocondral e na erupção dentária (YAMAZAKI et al., 1999; KITAHARA et al., 2002).

O receptor PTH/PTHrP-1R não é expresso somente em osteoblastos. Ele tem sido observado em células epiteliais de vários tumores malignos metastáticos para osso, sugerindo que a co-expressão de PTHrP e seu receptor PTH/PTHrP-1R pode ser um fator adicional de estímulo na proliferação celular e portanto, tendo fundamental importância na progressão de lesões que apresentem tal co-expressão. Entretanto,

não há estudos prévios que avaliem a expressão do receptor PTH/PTHrP-1R em lesões císticas odontogênicas.

Desta forma, torna-se relevante o estudo da expressão de PTHrP e seu receptor PTH/PTHrP-1R em lesões císticas odontogênicas, pois estes podem ser fatores envolvidos não só na indução da reabsorção óssea, mas também na manutenção das células epiteliais e mesenquimais de tais lesões.



Revista da Literatura

KRAMER et al. (1991) avaliaram a expressão imunoistoquímica de PTHrP em vários tecidos normais e neoplásicos, utilizando anticorpos mono e policlonais. Os autores observaram expressão imunoistoquímica de PTHrP em vários tecidos humanos normais, inclusive tecido epitelial, sugerindo PTHrP como um fator de crescimento parácrino. Além disso, observaram a imunoexpressão de PTHrP em vários tecidos neoplásicos, como carcinomas epidermóides, carcinomas de pulmão, carcinomas de bexiga, osteossarcomas e adenocarcinomas de colon.

LI et al. (1994) determinaram o padrão imunoistoquímico da expressão do fator de crescimento transformante (TGF)- α , fator de crescimento epidérmico (EGF) e TGF- β em tumores odontogênicos queratocísticos (n=27), cistos dentígeros (n=10) e radiculares (n=10). O revestimento epitelial de todos os casos se mostrou positivo para TGF- α , o qual estava localizado principalmente nas camadas basal e suprabasal. O epitélio dos tumores odontogênicos queratocísticos expressou altos níveis de TGF- α , quando comparado aos níveis apresentados pelos cistos radicular e dentígero. A expressão de EGF foi similar em todos os grupos, mais fraca que aquela de TGF- α e predominantemente suprabasal. TGF- α e EGF foram também observados em células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias localizadas nas cápsulas císticas. A expressão mais intensa de TGF- β foi nas cápsulas fibrosas, independente da lesão. A expressão diferencial de TGF- α e EGF nos diferentes tipos de cistos odontogênicos indica que esses fatores de crescimento podem estar envolvidos na patogênese dessas lesões, por via autócrina e/ou parácrina.

FORMIGLI et al. (1995) avaliaram a natureza dos processos de reabsorção óssea em cistos radiculares. Para o estudo, fragmentos de cistos associados ao tecido ósseo adjacente foram analisados por métodos histoquímicos e ultraestruturais. Além disso, o conteúdo cístico foi avaliado quanto à presença de citocinas com atividade osteolítica. As cápsulas císticas frequentemente apresentavam extensões, as quais infiltravam o tecido ósseo adjacente. Várias células positivas para a fosfatase ácida resistente ao tartrato foram observadas nas extensões intra-ósseas da cápsula cística e em contato direto com o tecido ósseo. Adicionalmente, células mononucleares positivas para TRAP também estavam presentes na cápsula cística. Altos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina-6 (IL-6) foram detectados nos fluidos císticos. Os autores concluíram que a reabsorção óssea ativa pode contribuir significativamente para o crescimento dessas lesões no complexo maxilo-mandibular.

LI et al. (1995) avaliaram a expressão dos genes de PTHrP e do seu receptor, e a sua proximidade em várias regiões do intestino, além de avaliar o quanto eles são evidentes em duas culturas de células intestinais. As técnicas de RT-PCR e *Northern blot* foram utilizadas para detectar o RNAm de PTHrP e do seu receptor em várias regiões do intestino normal de ratos, em populações de células epiteliais isoladas as criptas intestinais do jejuno de ratos e em culturas de células epiteliais gastrointestinais humanas. Anticorpo anti-PTHrP também foi utilizado para detectar o peptídeo em tecidos gastrointestinais de ratos e no meio de crescimento das células em cultura. Ambos, PTHrP e seu receptor, foram observados em todas as regiões do intestino dos ratos, nas populações celulares isoladas do jejuno e nas células em

cultura. Nos cortes histológicos, PTHrP foi identificado ao longo das vilosidades das células epiteliais do jejuno de ratos, mas não nas criptas. PTHrP também foi encontrado no meio de crescimento das células em cultura. Os resultados mostraram que os genes estudados são amplamente expressos no epitélio intestinal. A expressão dos dois genes nas mesmas regiões e nas mesmas linhagens celulares indica uma ação autócrina/parácrina desse peptídeo.

MEGHJI et al. (1996) avaliaram a atividade biológica de citocinas osteolíticas potentes em 6 tumores odontogênicos queratocísticos. Fragmentos das lesões obtidos de remoção cirúrgica foram mantidos em culturas e os meios de cultura foram avaliados com relação à atividade e capacidade de reabsorção óssea das citocinas – interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). Todas as lesões avaliadas apresentaram bioatividade de IL-1 e IL-6; entretanto, a bioatividade de TNF foi imensurável. Os meios contendo os fragmentos de cistos dialisados estimularam a reabsorção óssea e este processo foi completamente inibido por um anticorpo monoclonal que neutralizava IL-1 alfa e IL-1 beta. As células epiteliais do revestimento cístico apresentaram também imunexpressão de IL-1 alfa e IL-6, mas não expressaram IL-1 beta e TNF. Desta forma, os autores propuseram que IL-1 alfa é a principal citocina osteolítica produzida por tumores odontogênicos queratocísticos e que IL-6 e IL-1 podem contribuir para o crescimento da lesão promovendo proliferação das células epiteliais e reabsorção óssea, respectivamente.

DOWNEY et al. (1997) determinaram a localização tecidual de receptores de PTH/PTHrP em carcinomas primários de mama e estabelecer o potencial deles em responder ao estímulo de PTHrP. A localização celular do RNAm do receptor de PTH/PTHrP foi identificada por hibridização *in situ* em carcinomas primários de mama e em tecido mamário normal. Reações imunoistoquímicas foram realizadas, os tumores avaliados e escores foram estabelecidos por dois observadores utilizando a intensidade de expressão e o número de células tumorais positivas. Os tumores também foram avaliados quanto a expressão de Ki-67. Epitélio ductal de mamas normais expressaram RNAm do receptor PTH/PTHrP. Carcinomas de mama mostraram expressão variável de RNAm do receptor: 8 tumores foram negativos, 50 tinha escores similares ao tecido normal e 49 tinha escores maiores. Os níveis de expressão do receptor dentro dos carcinomas não correlacionaram com a expressão imunoistoquímica de PTHrP ou a qualquer fator prognóstico padrão. Havia correlação significativa ($p=0,05$) entre a expressão de Ki-67 e do receptor PHT/PTHrP. A presença de PTHrP e do seu receptor no epitélio mamário normal e nos carcinomas, demonstra que a maioria dos tumores de mama é capaz de responder a PTHrP. A expressão de Ki-67 sugere que PTHrP é um potencial fator de crescimento autócrino em carcinomas primários de mama.

YAMAZAKI et al. (1997) estudaram a relação entre a expressão de PTHrP e o desenvolvimento mandibular de camundongos C57BL/6N. Para tanto, os espécimes foram avaliados em grupos de acordo com o período gestacional e a expressão imunoistoquímica de PTHrP qualitativa e quantitativamente. A topografia dos

receptores e PTH/PTHrP foi semelhante ao do PTHrP. Os resultados mostraram que a localização de PTHrP é espacialmente e temporalmente relacionado com o crescimento mandibular (cartilagem de Meckel).

LI et al. (1997) investigaram a expressão imunoistoquímica da proteína PTHrP em cistos odontogênicos dos maxilares. Realizou-se um estudo retrospectivo, utilizando 27 queratocistos odontogênicos, 10 cistos dentígeros e 10 radiculares. Os cortes histológicos submetidos às reações imunoistoquímicas foram avaliados segundo a intensidade e localização da marcação (positividade). O queratocisto odontogênico apresentou níveis significativamente maiores de PTHrP que o cisto dentígero e o radicular. Não houve diferença na expressão epitelial de PTHrP entre queratocisto solitário, recorrente ou associado a síndrome do carcinoma nevóide basocelular. O tecido fibroso de todos os cistos foram fortemente positivos para PTHrP com um decréscimo de intensidade no queratocisto odontogênico quando comparado aos cistos dentígero e radicular. Em síntese, é possível que o PTHrP module o crescimento e a reabsorção óssea em cistos odontogênicos.

ISHIZUYA et al. (1997) avaliaram o efeito anabólico do PTH na diferenciação de osteoblastos *in vitro*. As células osteoblásticas isoladas da calvária de ratos recém-nascidos foram tratadas com PTH pelas primeiras horas e a cada 48 horas de incubação cíclica. Quando as células osteoblásticas foram expostas intermitentemente ao PTH apenas pelas primeiras horas e a cada 48 horas de incubação cíclica e cultivadas no ciclo sem hormônio, a diferenciação osteoblástica foi inibida pela supressão da atividade da fosfatase alcalina, formação óssea nodular, e a expressão

do RNAm da fosfatase alcalina, osteocalcina, e receptores de PTH e PTHrP. Experimentos utilizando inibidores e estimuladores de cAMP/PKA e Ca/PKC demonstraram que cAMP/PKA foi o maior sistema de sinalização de transdução do sinal de inibição da ação do PTH. Ambos cAMP/PKA e o Ca /PKC parecem estar envolvidos cooperativamente no efeito anabólico. A exposição contínua ao PTH durante as 48 horas de incubação cíclica inibiu fortemente a diferenciação osteoblástica. Entretanto, ambos cAMP/PKA e o Ca /PKC estão envolvidos no efeito da exposição contínua do PTH, aparentemente agindo de forma independente. O anticorpo neutralizante anti-IGF-I bloqueou os efeitos estimulatórios da atividade da fosfatase alcalina e a expressão do RNAm da osteocalcina induzida pelas 6 horas de exposição intermitente. Estes resultados sugerem que PTH tem efeitos diversos na diferenciação osteoblástica dependendo do tempo de exposição *in vitro* mediado através dos diferentes sistemas de transdução de sinais. Estes achados *in vitro* explicam pelo menos em parte, a ação *in vivo* do PTH que varia com a modalidade da administração.

LUNDGREN et al. (1998) investigaram a expressão de receptores de PTH em odontoblastos de incisivos de ratos, uma vez que evidências indicam que o PTH exerce um efeito anabólico na dentinogênese. Foram utilizados incisivos centrais de ratos dissecados em diferentes fases de crescimento. Fragmentos amino-terminais de PTH {rPTH(1-34)} foram conjugados com isotiocinato de fluorescina, para visualizar sítios de receptores na superfície da célula. Os resultados demonstraram que rPTH(1-34) provoca uma resposta anabólica na atividade dentinogênica de odontoblastos, e

que deve ter uma mediação associada à proteína quinase A/cAMP, visto que nenhuma indicação para Ca^{2+} como um segundo mensageiro era evidente.

NAIR et al. (1998) avaliaram in vitro, o papel dos cristais de colesterol no retardo do processo de reparação. Cristais de colesterol puros foram inseridos em copos de teflon e implantados em tecido subcutâneo de cobaias. As análises microscópicas foram realizadas nos períodos de 2, 4 e 32 semanas após a implantação dos cristais. Os cristais de colesterol foram circundados por numerosos macrófagos e células gigantes multinucleadas de corpo estranho, formando uma área bem circunscrita de reação tecidual. Após 8 meses, as células não conseguiram eliminar os cristais. Os autores concluíram que, como a coleção de macrófagos e células gigantes multinucleadas de corpo estranho são conhecidamente a maior fonte de inflamação apical, os achados sugerem que o acúmulo de cristais de colesterol em certas lesões periapicais crônicas pode ser um fator de insucesso do tratamento endodôntico.

PHILBRICK et al. (1998) estudaram que o PTH e o PTHrP, presente em ratos *knockout*, durante o nascimento com um fenótipo condrodistrófico caracterizado pela diferenciação prematura do condrócito e pela formação acelerada do osso, visto que o PTHrP superexpresso nos condrócitos de ratos transgênicos produz atraso na maturação do condrócitos e na ossificação endocondral. A recolocação da expressão de PTHrP nos condrócitos dos ratos do PTHrP-*knockout* que usam um transgênico Ii-dirigido pro-colágeno que resulta na correção dos anormalidades esqueléticas letais e gera nos animais que são eficazmente PTHrP-nulos em todos os locais à exceção da

cartilagem. Estes ratos do PTHrP-*knockout* sobrevivem pelo menos a 6 meses da idade mas são pequenos na estatura e indicam um número de defeitos no desenvolvimento, incluindo a condrodistrofia cranial e uma falha na erupção dental. Os dentes desenvolvem-se normalmente, mas tornam-se presos pelo osso circundante e evoluem para uma impacção progressiva. A localização do RNAm de PTHrP durante o desenvolvimento normal do dente revela pela hibridização *in situ* aumento nos níveis de expressão no epitélio do esmalte antes da formação do processo de erupção. Sendo assim, conclui-se que o PTHrP, representa uma sinalização essencial na formação da cadeia de erupção dentária.

YAMAZAKI et al. (1999) avaliaram a imunoexpressão de PTHrP e o receptor PTH/PTHrP do tipo I durante o desenvolvimento fetal da cartilagem condilar da mandíbula em camundongos. Após 15 dias de gestação, a cartilagem condilar era evidente e alguns condrócitos se mostraram positivos para PTHrP. Aos 16 dias, a cartilagem foi aumentando em tamanho e largura, e PTHrP estava localizado nas células das camadas achatadas e hipertróficas. Aos 17 dias, quando a formação óssea endocondral já iniciou, PTHrP foi observado principalmente na camada achatada e em poucas camadas dos condrócitos hipertróficos. A localização do receptor PTH/PTHrP do tipo I foi similar para o PTHrP aos 15 e 16 dias, sendo amplamente distribuído aos 18 dias. Condrócitos em apoptose foram raramente observados aos 15 e 16 dias e apenas poucas células estavam presentes na frente de erosão aos 18 dias. Segundo os autores, esta localização espacial e temporal de PTHrP e do seu

receptor sugere que PTHrP é um possível fator autócrino/parácrino, regulando a diferenciação condrocítica condilar durante o seu desenvolvimento.

IDDON et al. (2000) avaliaram a expressão de PTHrP no desenvolvimento de metástases ósseas no carcinoma de próstata. Para isso, foram utilizadas as técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ* para avaliar a expressão de PTHrP e seu receptor em carcinomas primários da próstata e metástases ósseas de tumores prostáticos e não-prostáticos. PTHrP foi mais expresso em carcinomas primários do que nas metástases ósseas ($p=0,003$, teste exato de Fisher). Todas as metástases ósseas de tumores não prostáticos expressaram PTHrP. Entretanto, o receptor de PTHrP foi expresso em todas as metástases ósseas e em apenas 19% dos carcinomas primários ($p=0,001$). Em resumo, a expressão do receptor de PTHrP é aumentada em metástases ósseas de carcinomas de próstata e pode desempenhar importante papel na sua formação.

GERVÁSIO et al. (2002) determinaram, pelo teste ELISA, os níveis de fator estimulante de colônias macrófago-granulócito (FEC-MG), interleucina 3 (IL-3) e interleucina 6 (IL-6) em fluidos e tecidos de cistos radiculares. FEC-MG foi encontrado em 42,8% das amostras de fluido (164,3 pg/mL) e IL-6 em 92,8% (641,4 pg/mL). IL-3 não foi encontrada em nenhuma das amostras de fluidos. Nos tecidos, 28,6% dos casos foram positivos para IL-3 (369,2 pg/mL), 86,4% para IL-6 (92,4 pg/mL) e 95,8% para FEC-MG (200,5 pg/mL). De acordo com esses achados, FEC-MG e IL-6 foram largamente observados nas amostras de fluidos e tecidos de cistos radiculares. Por outro lado, IL-3 foi encontrada apenas nos tecidos de poucas lesões. Dessa

forma, essas citocinas podem contribuir para a inflamação, crescimento cístico e reabsorção óssea, características dessas lesões.

KITAHARA et al. (2002) investigaram o papel do PTHrP durante o desenvolvimento de germes dentais em ratos *knockout* para o gene PTHrP, por meio de estudo imunohistoquímico e ultra-estrutural. Suas observações sugeriram que o PTHrP é necessário para manter um rearranjo espacial apropriado para as células ósseas e a função osteoclástica, as quais são necessárias para o desenvolvimento normal dos germes dentários e do osso alveolar que cerca os germes dentais. Também demonstrou que a deficiência em PTHrP afeta a estrutura e a função dos osteoclastos exclusivamente localizados próximos aos germes dentários em desenvolvimento.

KITAZAWA et al. (2002) avaliaram a expressão imunohistoquímica e a hibridização *in situ* de PTHrP em um caso de mieloma múltiplo, onde o paciente apresentava altos níveis séricos de PTHrP. O paciente apresentava hipercalcemia e lesões osteolíticas avançadas. A análise bioquímica mostrou um aumento significativo nos níveis séricos de PTHrP (PTHrP - 3.7 pmol/L) e IL-6 (22.0 pg/mL). Pela hibridização *in situ* e análise imunohistoquímica de PTHrP em amostra colhida por biópsia aspirativa da medula óssea, o RNAm e a proteína PTHrP foram observadas no citoplasma das células tumorais. Pelo menos um terço das células tumorais eram positivas para PTHrP. Os autores concluíram que, considerando o PTHrP como um fator endócrino e agindo sistemicamente no osso e no rim, a hipercalcemia neste

caso pode ter sido causada tanto pela hipercalcemia osteolítica local quanto pela hipercalcemia humoral de mecanismos próprios associados a neoplasia maligna.

LINFORTH et al. (2002) avaliaram a co-expressão de PTHrP e seu receptor (PTH/PTHrP1R) em carcinomas de mama precoce (CMP) e carcinomas com metástases ósseas (CMO), correlacionando os achados com o prognóstico. Amostras de CMP (n=176) e CMO (n=43) cirurgicamente removidas foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. PTHrP foi determinada usando imunistoquímica e o seu receptor usando hibridização *in situ* (n=107) ou RT-PCR semi-quantitativo (n=69). PTHrP foi expressa em 115 de 170 (68%) dos CMP e em todos CMO (p<0,001), enquanto o RNAm do seu receptor foi expresso em 50% dos CMP e 81% dos CMO (p<0,001). Co-expressão de PTHrP e seu receptor foi evidenciada em 37% dos CMP e em 81% dos CMO (p<0,001). PTHrP e seu receptor correlacionaram com uma redução na taxa de sobrevida livre de doença (p<0,004) e apenas o receptor correlacionou com uma redução na taxa de sobrevida global (p<0,003). Co-expressão de ambos foi um fator preditivo de pior prognóstico aos 5 anos após o tratamento, com uma taxa de mortalidade de 32%. Os autores sugeriram que esses achados mostram que o receptor PTHrP é expresso mais frequentemente em CMO que CMP e está associado com menores taxas de sobrevida.

NAIR et al. (2002) descreveram 3 casos de cistos radiculares com revestimento epitelial formado por células ciliadas e também apresentaram um caso de cisto radicular infectado por *Actinomyces*. Para o estudo, cortes histológicos seriados de 256 ápices radiculares com lesões periapicais crônicas foram avaliados para identificar

a presença de cisto radicular com revestimento epitelial composto por células ciliadas. As lesões que apresentavam tal revestimento foram avaliadas em microscópio eletrônico de transmissão. Um total de 3 cistos com revestimento epitelial formado por células cilíndricas colunares foi identificado. Duas dessas lesões também continham epitélio estratificado escamoso. Todas as 3 lesões afetavam premolares superiores. O lúmen de 1 dos cistos continha colônias de *Actinomyces*. Os autores concluíram que embora o epitélio estratificado escamoso provavelmente seja derivado dos restos epiteliais de Malassez, as células ciliadas podem ser de origem sinusal. Microrganismos localizados no canal radicular podem alcançar os cistos radiculares, particularmente nas lesões superiores posteriores, disseminando para o seio maxilar.

ZHAO et al. (2002) analisaram a ação e expressão da proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) durante a histogênese do tecido ósseo da mandíbula de frangos. Antes do surgimento do tecido ósseo, o PTHrP e o receptor de PTH/PTHrP tipo I (PTH-1R) são co-expressos nas células da ectoderme, músculo esquelético, nervos periféricos e mesênquima. Cartilagem hialina foi observada na primeira fase HH 27, quando a maioria dos condroblastos expressavam PTHrP e PTH-1R. Na fase 34, PTHrP e PTH-1R não foram detectados em condrócitos, mas foram expressas no pericôndrio. Pré-osteoblastos positivos para fosfatase alcalina e tecido ósseo apareceram nas fases 31 e 34, respectivamente. Pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos co-expressaram PTH-1R e PTHrP. O tratamento com PTHrP aumentou AMPc mesenquimal na fase 1-36 de 26 embriões de frangos. A exposição contínua

dos frangos à PTHrP por 14 dias, observou-se aumento do nódulo cartilginoso e diminuiu a fosfatase alcalina, e quanto intermitente não afetou o nódulo cartilaginoso e aumentou a fosfatase alcalina em culturas de células mesenquimais na etapa 26. Adicionando anticorpos neutralizantes anti-PTHrP às culturas, o número de nódulos de cartilagem reduziram e não afetaram a fosfatase alcalina. Estes resultados mostram que PTHrP e PTH-1R são co-expressas por células esqueléticas antes e durante a histogênese do tecido ósseo, e que podem influenciar a histogênese do tecido ósseo afetando a diferenciação de células mesenquimais em condroblastos e osteoblastos mandibulares.

ABDELSAYED et al. (2004) avaliaram a expressão de PTHrP em ameloblastomas. A produção do PTHrP foi demonstrada em uma variedade de subtipos do tumor. Ameloblastoma é uma neoplasia epitelial odontogênica relativamente comum que apresenta um crescimento infiltrativo local. Neste estudo, foram utilizados 30 casos de ameloblastoma (24 sólido convencional, 4 unicísticos, e 2 que surgiram do revestimento epitelial de cistos dentígeros). Anticorpo anti-PTHrP foi incubado em cortes histológicos obtidos de blocos de tecidos embebidos em parafina, usando a técnica estreptavidina-biotina-peroxidase. Escore semiquantitativo e imunorreativo foi avaliado como suave, moderado, e intenso. Todos os casos foram positivos para PTHrP. Reação suave foi observada em 3 ameloblastomas convencionais, 1 unicístico e em 1 originado em cisto dentífero; positividade moderada foi encontrada em 12 ameloblastomas convencionais, em 3 unicísticos e em 1 originado em cisto dentífero. Intensa imunorreatividade foi observada em 9

casos de ameloblastoma convencional. Esta diferença em imunomarcacão não foi estatisticamente significativa ($P=0,358$). Os autores concluíram que os resultados desta investigação sugerem que PTHrP pode ter papel significativo na reabsorção óssea local, oferecendo explicação parcial para o crescimento infiltrativo e o comportamento destrutivo do tumor. A uniformidade da expressão de PTHrP pelo ameloblastoma, como detalhado neste estudo, pode abrigar implicações terapêuticas significativas.

AGARAM et al. (2004) avaliaram a perda de heterozigidade de genes supressores de tumor em tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ). Os autores estudaram 10 casos de TOQ para perda de heterozigidade de genes supressores de tumor, usando microdissecção e análise genotípica semi-quantitativa. Foram analisados 10 genes supressores de tumor comuns, incluindo o gene PTCH, o qual se apresenta mutado na síndrome do carcinoma nevíde basocelular. Perda de heterozigidade foi evidenciada em 7 dos 10 casos, com uma frequência que variou de 11% a 80% dos genes estudados. Os genes que apresentaram perdas alélicas mais frequentes foram p16, p53, PTCH e MCC, respectivamente. Cistos satélites foram associados com maior frequência de perdas alélicas ($p=0.02$). Os autores concluíram que um número significativo de TOQ apresenta perda clonal de heterozigidade de genes supressores de tumor comuns. As mutações clonais por deleção de DNA genômico reforçam a hipótese de que TOQ seja uma lesão neoplásica.

AMIZUKA et al. (2004) avaliaram a presença e o papel de PTHrP e FGFR3 no desenvolvimento ósseo e cartilaginoso de ratos. Para isso, os autores utilizaram esqueletos completos de ratos recém-nascidos geneticamente modificados, os quais apresentavam os genes codificadores de PTHrP e FGFR3 suprimidos. Realizaram análises imunoistoquímicas e citogenéticas. Os autores observaram que o desenvolvimento ósseo é regulado por uma cadeia de sinalização conservativa que é ligada aos fatores multifuncionais do crescimento e aos seus receptores de elevada afinidade. Os achados indicaram que a deficiência de FGFR3 pode inibir alguns efeitos causados pela deficiência de PTHrP, apresentando um papel importante na regulação da diferenciação e hipertrofia de condrócitos. Este estudo reforça o papel dominante de PTHrP na regulação no processo de proliferação celular durante o desenvolvimento ósseo e sugere que a sinalização por FGFR3 apresenta um papel importante na maturação da cartilagem e na invasão vascular na junção condro-óssea.

NAIR (2004) realizou uma revisão dos fatores relacionados a etiopatogênese da periodontite apical e as causas relacionadas às falhas no tratamento endodôntico, com persistência da lesão periapical. O autor postulou que a periodontite apical é uma sequela originada de uma infecção endodôntica e manifesta como uma resposta de defesa própria do hospedeiro a microrganismos patogênicos. Considerou essas lesões como uma reação dinâmica entre fatores relacionados aos microrganismos e a resposta de defesa do hospedeiro na interface entre a polpa radicular infectada e o ligamento periodontal, resultando em inflamação local, reabsorção de tecidos duros,

destruição de outros tecidos periapicais e eventual formação de lesões periapicais. O tratamento da periodontite apical, caracterizada como uma doença proveniente de um canal radicular infectado consiste na eliminação ou redução significativa dos microrganismos, e obturação do canal radicular para evitar reinfecção. Embora o tratamento endodôntico tenha altas taxas de sucesso, ele pode falhar. A maioria das falhas no tratamento é de natureza técnica, não conseguindo controlar e eliminar a infecção no canal radicular. Além disso, outros fatores também podem contribuir para a persistência da periodontite apical, como a formação de uma reação inflamatória granulomatosa de corpo estranho associada a cristais de colesterol ou a materiais ou substâncias exógenas.

PIATTELLI et al. (2004) avaliaram a expressão imunoistoquímica do fator de crescimento transformante (TGF)- β 1 em 30 cistos radiculares, 27 cistos dentígeros e 28 tumores odontogênicos queratocísticos. TGF- β 1 foi avaliado em vasos sanguíneos, fibroblastos e epitélio escamoso do revestimento cístico. A expressão de TGF- β 1 foi determinada, em cada espécime, pela avaliação de 1.000 células no revestimento epitelial e 500 células na cápsula fibrosa, contando as células positivas. O número de vasos positivos foi avaliado em 10 campos de maior aumento. Uma expressão estatisticamente superior foi observada nas camadas basal e suprabasal ($p=0,0011$), epitélio superficial ($p=0,05$) e células estromais ($p=0,0002$) de tumores odontogênicos queratocísticos, quando comparada com cistos radiculares e dentígeros. Essas diferenças sugerem que o controle do ciclo celular pode ser

anormal em tumores odontogênicos queratocísticos. Essas lesões podem ter um potencial de crescimento intrínseco, não apresentando pelas outras lesões císticas.

OHTSURU (2005) avaliou a expressão de PTHrP, PTH e o receptor de PTH/PTHrP do tipo I (PTHrH-1R) em ameloblastomas. Para a pesquisa, o autor utilizou as técnicas de RT-PCR (n=8), imunistoquímica (n=23) e ELISA (n=11). O RNAm de PTHrP foi detectado em todas as amostras. Imunoexpressão de PTHrP foi também observada em todos os 23 casos analisados. Havia uma diferença significativa na concentração de PTHrP no teste de ELISA entre ameloblastomas sólidos e unicísticos (p=0,04). Apenas 1 caso apresentou fraca expressão de RNAm de PTHrP-1R. A imunoexpressão de PTHrP-1R foi observada nos osteoblastos localizados no tecido ósseo adjacente ao tumor, mas as células tumorais foram negativas. PTH não foi detectado por nenhuma das técnicas utilizadas. Assim, esses resultados sugerem que o nível de PTHrP pode estar associado à infiltração óssea local no ameloblastoma.

TAY et al. (2004) avaliaram a expressão imunistoquímica de RANKL e a presença de fosfatase ácida tartrato resistente (TRAP) em cistos radiculares, dentígeros, tumores odontogênicos queratocísticos e ameloblastomas. Imunofluorescência para TRAP foi visualizada sob microscopia confocal. Todos os casos apresentaram positividade para RANKL e TRAP. As células positivas para TRAP também coraram com hibridização *in situ* para receptor de calcitonina, que é um marcador definitivo para osteoclastos. Foi observado que pré-osteoclastos mononucleares migraram da corrente circulatória para o tecido conectivo do estroma

e os osteoclastos multinucleados estavam localizados na superfície óssea. Com esses resultados, os autores concluíram que RANKL tem papel importante na reabsorção óssea induzida por lesões osteolíticas do esqueleto facial.

TAKEDA et al. (2005) avaliaram a prevalência de células ciliadas e mucosas no revestimento epitelial de cistos radiculares, dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. As células mucosas foram encontradas em 20,8% de todos os cistos examinados, enquanto as células ciliadas foram encontradas em 11,4% dos casos. As células ciliadas foram quase sempre acompanhadas por células mucosas. A prevalência de células mucosas nos cistos radicular e dentígero, e de células ciliadas no cisto radicular foram maiores na maxila do que na mandíbula. Por outro lado, a prevalência de células mucosas e ciliadas nos tumores odontogênicos queratocísticos e de células ciliadas nos cistos dentígeros foram maiores na mandíbula que na maxila. Os resultados do presente estudo indicam uma origem metaplásica das células mucosas e ciliadas no revestimento epitelial das lesões císticas estudadas, mas a causa e o significado biológico deste fenômeno ainda são desconhecidos.

LIAO; MACCAULEY (2006) realizaram extensa revisão da literatura abordando o papel da proteína relacionada com paratormônio (PTHrP) em lesões ósseas, sobretudo nas metástases ósseas. PTHrP é um derivado tumoral bem caracterizado que também integra funções no desenvolvimento normal e homeostase. PTHrP é produzida por praticamente todos os tipos de tumores que metastatizam para o osso e numerosos estudos têm demonstrado uma correlação entre a expressão e localização de PTHrP de tumores ósseos. PTHrP tem efeitos importantes no osso

através da sua interação com o receptor PTH-1 em células osteoblásticas. Através de meios indiretos, PTHrP promove osteoclastogênese por up-regulação do receptor ativador do ligante NFkappaB (RANKL) em osteoblastos. PTHrP regula a proliferação e diferenciação osteoblásticas tanto de forma dependente da dose quanto temporal. O PTHrP ósseo tem sido implicado na localização de tumores ósseos e no aumento do turnover ósseo. O turnover ósseo resultado da liberação de fatores de crescimento, tais como TGFbeta e minerais como o cálcio, tem impacto sobre o crescimento de células tumorais e podem contribuir para a continuação da produção de PTHrP. PTHrP também tem propriedades anabolizantes e poderia ser em parte responsável pelo tipo de reações osteoblásticas no câncer de próstata. Finalmente, os papéis das PTH e PTHrP, no apoio do desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas, no microambiente da medula óssea, sugerem uma interação entre as células tumorais e células hematopoiéticas e, merecem uma investigação mais aprofundada.

MENEZES et al. (2006) determinaram a expressão imunoistoquímica de RANKL e osteoprotegerina (OPG) associada à destruição óssea em cistos e granulomas periapicais. Os autores utilizaram 20 lesões periapicais crônicas (10 granulomas periapicais e 10 cistos radiculares), as quais foram coletadas após cirurgia apical, fixadas em formol 10% e processadas histologicamente. Em seguida, as reações imunoistoquímicas foram realizadas. Em ambas as lesões, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e linfócitos expressaram RANKL e OPG. Células epiteliais também foram positivas para RANKL e OPG nos cistos radiculares. Foi realizada também análise quantitativa, estabelecendo uma relação entre o número de células positivas e

o número total de células no campo microscópico. A relação de células RANKL positivas/total de células foi maior que a relação de célula OPG positivas/número total de células nos granulomas ($p < 0,0012$) e cistos periapicais ($p < 0,0001$). As relações de células OPG positivas/número total de células ($p < 0,0001$) e células RANKL positivas/número total de células ($p < 0,03$) foi maior nos granulomas do que nos cistos. Entretanto, a diferença na relação células RANKL positivas/células OPG positivas nos granulomas e cistos periapicais não foi estatisticamente significativa. De acordo com os autores, esses achados indicam que a presença de RANKL e OPG em cistos e granulomas periapicais sugerem o envolvimento dessas proteínas no desenvolvimento de lesões periapicais.

VARINAUSKAS et al. (2006) avaliaram a prevalência de cistos maxilo-mandibulares dos arquivos da Universidade de Kaunas durante o período de 1986-2004, e outros aspectos de interesse clínico e terapêutico, tais como suas características clínicas, mudanças que causaram nas estruturas faciais e os dentes que tinham causado a patologia. Um total de 850 casos foi estudado, sendo 455 homens e 395 mulheres. A idade dos pacientes variou de 4 a 87 anos, com uma média de 35,8. Mais da metade dos cistos diagnosticados (63%) localizavam na maxila e restante (37%) deles na mandíbula. As queixas comuns dos pacientes eram aumento de volume, dor, presença de fistula, mobilidade aumentada dos dentes e parestesia. Ao comparar os grupos, foram encontrados (em ordem da direita à esquerda): molares - 1:1, pré-molares 1.3:1, dentes anteriores superiores - 3.3:1, dentes anteriores inferiores 3.8:1, pré-molares inferiores 1.2:1, molares inferiores

0.7:1. Foi observado que os cistos odontogênicos podem se apresentar em ambos os sexos; os cistos maxilares são 1.5 vezes mais frequentes que os cistos mandibulares. Essa patologia pode igualmente afetar ambos os lados das maxilas, mas a maioria dos cistos que são diagnosticados são da região anterior da maxila.

YAO et al. (2007) estudaram a determinação cronológica da expressão de PTHrP no retículo estrelado de ratos e as implicações na erupção. A erupção do dente é um evento localizado que requer a expressão de determinadas moléculas que controlam a formação e reabsorção óssea. A proteína hormônio paratormônio relacionada (PTHrP) pode ser uma dessas moléculas. Embora PTHrP seja produzido no retículo estrelado do dente e exerça seu efeito no folículo dental adjacente, seu teste padrão da expressão no retículo estrelado é desconhecido. Foram usadas microdissecção a laser e RT-PCR para determinar a expressão cronológica de PTHrP. As células dentais do folículo foram incubadas *in vitro* com PTHrP e RT-PCR foi conduzido para determinar seu efeito na expressão do gene VEGF e BMP-2. Como resultado, foi observado que o PTHrP teve expressão máxima em 7 dias pós-nascimento, e no retículo estrelado com nível da expressão ainda alta no nono dia. *In vitro*, houve superexpressão de PTHrP e expressão de VEGF120 e VEGF164 após 4 h da incubação com um efeito máximo em 6 horas. A superexpressão de PTHrP e a expressão do gene BMP-2 tiveram nível máximo em 2 horas. Sendo assim concluíram que a osteoclastogênese necessária para a erupção ocorre em torno do dia 10 e é possível que PTHrP esteja estimulando a formação de osteoclastos via VEGF.

Simultaneamente, a superexpressão de BMP-2 e PTHrP pode estimular o crescimento do osso na base da crista óssea para promover a erupção.

GROSSMANN et al. (2007) determinaram o perfil demográfico de cistos odontogênicos e não odontogênicos em uma população brasileira, diagnosticados histologicamente num período de 50 anos. As informações clínicas foram obtidas dos prontuários dos pacientes, arquivados no Serviço de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil, durante o período de 1953-2003. Entre 19.064 biopsias orais, 2.905 (15.2%) apresentaram critérios diagnósticos de cistos odontogênicos (CO) e não-odontogênicos (NCO). Destes, 2.812 espécimes (14.7%) foram diagnosticados como CO e 93 (0.5%) representaram NCO. Os 3 CO mais frequentemente diagnosticados foram o cisto radicular (61.0%), cisto dentígero (25.3%), e o queratocisto odontogênico (7.2%). O NCO mais freqüente foi o cisto do ducto nasopalatino (2.2%). Os resultados demonstram que há uma larga escala de CO e de NCO, com alguns cistos que têm uma predileção por idade, o gênero, e a localização. Também foram apresentados aspectos demográficos e características clínicas destes cistos.

NADALIN (2008) avaliou a expressão imunohistoquímica de syndecan-1 (CD138), Ki-67, p53, α -actina de músculo liso e MMP-2 em cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos. Além disso, avaliou também a intensidade de expressão de syndecan-1. O tumor odontogênico queratocístico apresentou positividade estatisticamente superior para Ki-67 na camada suprabasal ($p < 0,001$) em relação às outras lesões estudadas. Nos cistos radiculares, observou-se

correlação positiva entre a expressão da proteína p53 e Ki-67 basal ($p=0,03$), expressão ($p=0,02$) e intensidade ($P=0,0001$) de syndecan-1, além de correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e intensidade de syndecan-1 ($p=0,01$) e entre a expressão e intensidade de syndecan-1 ($p<0,001$). Diferente do que ocorreu nos cistos radiculares, nos tumores odontogênicos queratocísticos a positividade de Ki-67 na camada suprabasal correlacionou positivamente com expressão ($p=0,01$) e intensidade ($p=0,01$) de syndecan-1. A expressão de α -actina de músculo liso foi observada em 34,2% dos cistos radiculares, 36,3% dos cistos dentígeros e 46,9% dos tumores odontogênicos queratocísticos, enquanto a expressão de MMP-2 foi positiva em praticamente todos dos casos, sendo 97% dos CRs, 90,9% dos CDs e 94% dos TOQs. A expressão de MMP-2 foi significativamente mais forte nos CRs ($p=0,009$). O autor concluiu que nos cistos radiculares e tumores odontogênicos queratocísticos, syndecan-1, miofibroblastos e MMP-2 parecem ter papel importante na progressão das lesões.

SILVA et al. (2008) compararam a expressão do fator nuclear B (RANK), do ligante RANK (RANKL), e de osteoprotegerina (OPG) em tumores odontogênicos epiteliais e em cistos dentígeros. A expressão destas moléculas foi avaliada por imunistoquímica em ameloblastomas sólidos/multicísticos ($n = 12$), ameloblastomas unicísticos ($n = 8$), tumores odontogênicos queratocísticos ($n = 19$), cistos dentígeros ($n = 9$), e folículos dentais ($n = 9$). Os autores observaram expressão similar de RANK, RANKL e OPG no epitélio odontogênico de todas as amostras. No estroma, o número de células positivas para RANK e RANKL foi mais elevado nos

ameloblastomas sólidos/multicísticos quando comparados com os cistos dentígeros. Os folículos dentais tiveram menor número de células positivas para RANK, RANKL e OPG do que ameloblastomas sólidos/multicísticos e tumores odontogênicos queratocísticos. A maioria dos ameloblastomas sólidos/multicísticos (75%) e dos ameloblastomas unicísticos (62,5%) apresentou maior número de células RANKL-positivas que OPG-positivas. Entretanto, 62,4% dos tumores odontogênicos queratocísticos e todos os cistos dentígeros apresentaram maior número de células OPG-positivas do que células RANKL-positivas. Assim, os autores concluíram que há diferenças na expressão de RANK, RANKL e OPG nos cistos e tumores epiteliais odontogênicos e esta diferença poderia explicar a capacidade distinta de reabsorção óssea destas lesões.

LOZANO et al. (2009) avaliaram se as mudanças no fenótipo de osteoblastos de pacientes diabéticos são derivadas da diminuição dos níveis de PTHrP. Os autores utilizaram um modelo de ablação da medula óssea em ratos com diabete, induzida por injeções múltiplas de estreptozotocina. Nos animais, foram administrados 100 µg/Kg de PTHrP ou o veículo por 13 dias começando 1 semana após a ablação da medula. Após 6 dias de ablação, os animais diabéticos apresentaram perda óssea tanto nos fêmures intactos quanto nas tíbias em reparação; esses achados foram relacionados a diminuição de osteoblastos, de superfície osteóide, vasos sanguíneos e aumento do depósito adiposo na medula óssea. Além disso, uma diminuição na matriz mineralizada ocorreu em culturas de medula óssea de tíbia de ratos diabéticos. Essas alterações esqueléticas foram associadas com diminuição da expressão gênica,

analisada por RT-PCR, de Runx2, osterix, osteocalcina, PTHrP, receptor PTH/PTHrP tipo I, fator de crescimento vascular (VEGF) e seu receptor, sistema RANK/RANKL-OPG. A administração de PTHrP reverteu essas alterações tanto nos ossos intactos (fêmures) quanto nos ossos em regeneração (tíbias) de ratos diabéticos. Esses achados sugerem fortemente que PTHrP apresenta um papel importante na função osteoblástica alterada relacionada a diabete.



Proposição

O objetivo deste estudo foi analisar as características histopatológicas e expressão imunohistoquímica comparativa da proteína relacionada ao Paratormônio (PTHrP) e seu receptor PTH/PTHrP tipo I no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa de cistos radiculares, cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos.



Material e Métodos

Seleção da Amostra

Foi realizado um estudo retrospectivo, cujos dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos formulários clínicos de encaminhamento das lesões ao Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Ribeirão Preto. O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado sem restrições, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (Anexo).

Para o estudo, foram selecionados 35 casos de cisto radicular, 22 de cisto dentígero e 17 de tumor odontogênico queratocístico, todos do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, diagnosticados entre 1994 e 2006, totalizando 74 casos. Consideraram-se como critérios de inclusão no estudo: 1 - os casos de cisto radicular que apresentaram cavidade cística bem formada, com tecido epitelial de revestimento se mostrando bem diferenciado, pavimentoso e estratificado; 2 – os casos de cisto dentígero que apresentavam informações clínicas e radiográficas confiáveis, proporcionando diagnóstico inequívoco da lesão; 3 – disponibilidade de material arquivado em parafina suficiente para confirmação histopatológica e para novos cortes histológicos, os quais foram utilizados nas reações de imunoistoquímica.

Análise Histopatológica

A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), e posteriormente analisados para descrição

morfológica e confirmação do diagnóstico. Na descrição microscópica, foram avaliados diferentes aspectos nas lesões císticas estudadas:

1. Situação do epitélio de revestimento cístico – hiperplásico ou não-hiperplásico. No cisto radicular, foram classificados como epitélio não-hiperplásico aqueles com até 10 camadas celulares; no cisto dentífero até 6 camadas celulares e no tumor odontogênico queratocístico, foi considerado epitélio normal o que apresentava as características típicas da lesão, com paraqueratina superficial corrugada, células da camada basal dispostas em paliçada e com cerca de 6 camadas celulares.

2. Intensidade da reação inflamatória na cápsula cística foi classificada em leve (escassas células inflamatórias focais ou dispersas no tecido conjuntivo) ou intensa (grande quantidade de células inflamatórias difusas ou dispersas no tecido conjuntivo adjacente ao revestimento epitelial).

Especificamente nos cistos radiculares, outras características microscópicas também foram avaliadas, como presença de células mucosas, células ciliadas, cristais de colesterol associados ou não a células gigantes multinucleadas e corpúsculos de Rushton

Reações imunoistoquímicas

Após a revisão histopatológica e confirmação do diagnóstico, selecionou-se os casos de cistos radiculares e dentíferos, além daqueles que apresentavam quantidade de material suficiente para as fases subsequentes do experimento. Assim,

para o preparo do material a ser submetido às reações de imunistoquímica, foram realizados cortes histológicos de 3 μm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, EUA)

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

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada e por lavagem em água destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM, pH 7,4 por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se incubação com anticorpos primários diluídos em títulos previamente estabelecidos em tampão PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) 1% (Sigma Aldrich, cat # A9647, EUA) e azida sódica 0,1%, por 18 horas a 4°C em

câmara úmida. Foram realizadas três lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada (Tabela I).

Tabela I - Lista de anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Anti-receptor PTH/PTHrP tipo I	3D1.1	1:400	Neomarkers
Anti-PTHrP	Policlonal	1:100	Neomarkers

Seguiu-se a técnica com o sistema de amplificação, onde as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cat # RE7260-k, Newcastle Upon Tyne, UK), seguido por três lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Posteriormente, foram incubadas com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37°C e, novamente levados a lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

As lâminas foram então reveladas em solução substrato contendo 60 mg de 3,3' tetrahydrocloro de diaminobenzidino (DAB) (Sigma, cat # D-5637, EUA), 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol) em 100 mL de PBS incubadas por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas foram lavadas em água destilada, sendo contra-coradas com Hematoxilina de Harris por um minuto. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e destilada e imersas duas vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Os cortes foram então desidratados em banhos de etanol 80%, 95% e 100% por duas vezes de 30 segundos cada, 2 banhos de xilol (5 minutos cada) e procedeu-se a montagem das lâminas com Entellan neu (Merck, cat #1.07961, Alemanha) e lamínulas. Controles

positivos, que consistiram de espécimes de carcinoma de mama para ambos os anticorpos (Figura 1), e negativos (controle positivos com supressão do anticorpo primário) foram incluídos em todas as reações.

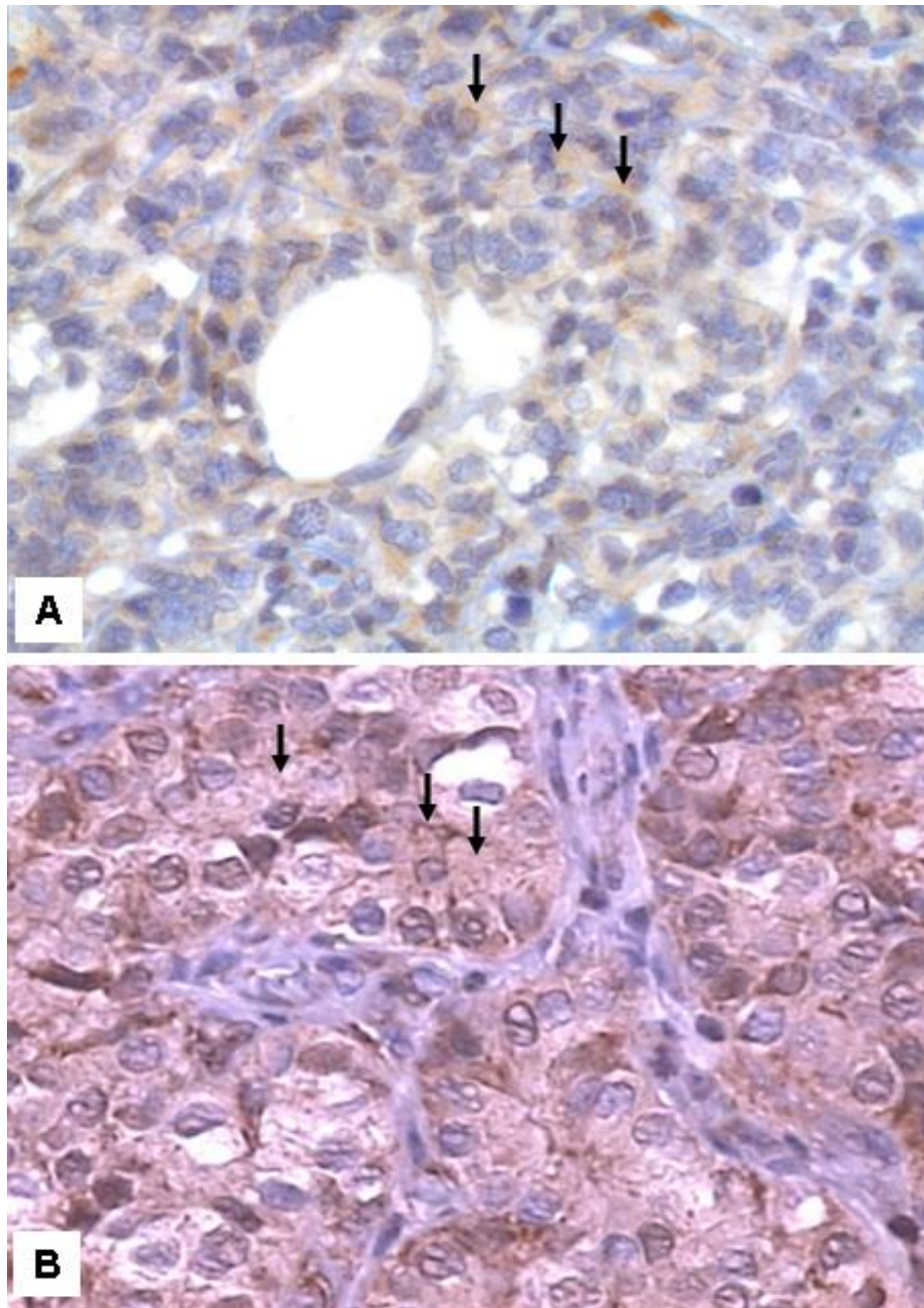


Figura 1 – Controles positivos para os anticorpos anti-PTH/PTHrP-1R (A) e anti-PTHrP (B). A – Células tumorais mostrando expressão de PTH/PTHrP-1R (setas). B – Forte expressão de PTHrP em células de carcinoma de mama (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

Análise das reações imunoistoquímicas

Para a avaliação da reação imunoistoquímica foi utilizado microscópio óptico modelo Eclipse E600 (Nikon, Tóquio, Japão), com as objetivas de 20 e 40x. A leitura das reações foi realizada de forma semi-quantitativa por dois observadores que fizeram as avaliações de forma separada e independente, considerando a expressão e a intensidade de expressão das lesões, de acordo com os critérios que serão descritos a seguir. Nos casos em que não foi possível avaliar fragmento representativo da lesão, o caso foi considerado não avaliável. Considerou-se célula positiva aquela que apresentava coloração acastanhada, conferida pelo cromógeno DAB.

A expressão de PTHrP e receptor de PTH/PTHrP foi analisada nas células epiteliais do revestimento cístico e na cápsula fibrosa das respectivas lesões, considerando nessa região as células inflamatórias e mesenquimais (fibroblastos). Para PTHrP e receptor de PTHrP, foram consideradas células positivas aquelas que tiveram a membrana e/ou citoplasma marcados. A porcentagem de células positivas em 10 campos de maior aumento (400x) foi utilizada para classificar cada lesão cística, utilizando os seguintes valores: negativo: <5% de células positivas; expressão fraca: 5%-50% de células positivas; expressão forte: >50% de células positivas. Além disso, tanto no revestimento epitelial quanto na cápsula de tecido fibroso, analisou-se a intensidade da positividade das células epiteliais (+: fraca intensidade; ++: forte intensidade). Considerou-se como fraca intensidade de expressão os casos que apresentavam células com pálida coloração marrom/dourada no citoplasma e como forte intensidade de expressão, os casos que apresentavam densa coloração

marrom/dourada no citoplasma das células epiteliais ou daquelas localizadas na cápsula fibrosa das lesões.

Análise Estatística

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



Resultados

Características Clínicas e Histopatológicas

Cisto Radicular

Dos 35 casos de cistos radiculares, 21 (60%) ocorreram em homens e 14 (40%) em mulheres. A idade média dos pacientes foi de 42,2 anos (variando de 19 a 78 anos) e a maxila mais acometida (57,1%) que a mandíbula (42,9%). Os dados referentes às características clínicas e demográficas estão dispostos na Tabela II.

Microscopicamente, observou-se tecido epitelial estratificado, pavimentoso, não queratinizado e com espessura variável. 18 casos (51,4%) se apresentaram epitélio de revestimento não-hiperplásico e 17 (48,6%) mostravam hiperplasia epitelial. Adicionalmente, 2 casos (5,7%) apresentaram células mucosas no revestimento epitelial e em 1 caso (2,8%), células cilíndricas ciliadas também foram observadas (Figura 2).

Na cápsula de tecido conjuntivo fibroso, cristais de colesterol associados a células gigantes multinucleadas de corpo estranho foram observados em 10 casos (28,6%), além de corpúsculos de Rushton que estavam presentes em 2 casos (5,7%). 23 casos (65,7%) apresentaram cápsula fibrosa com reação inflamatória crônica intensa (difusa) e 12 (34,3%) com inflamação leve (focal) (Figura 2).

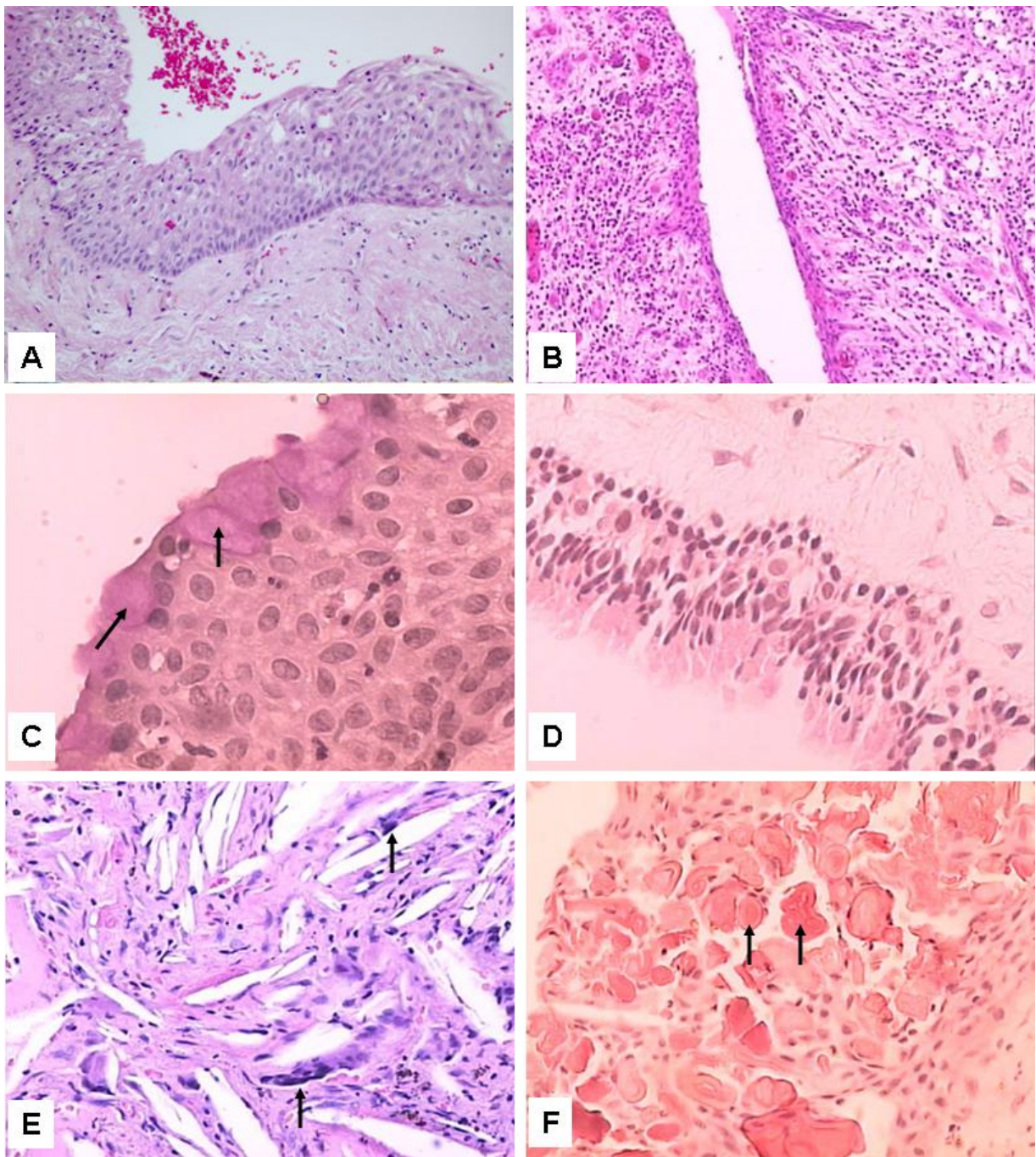


Figura 2- Características histopatológicas do cisto radicular. A - Epitélio hiperplásico, com reação inflamatória crônica leve (HE, 100x). B - Epitélio não-hiperplásico, com inflamação crônica intensa (HE, 100x). C - Células mucosas (setas) no revestimento epitelial (PAS, 200x). D- Células cilíndricas ciliadas no revestimento cístico (HE, 200x). E - Cristais de colesterol associados a células gigantes multinucleadas de corpo estranho (setas) (HE, 100x). F - Corpúsculos de Rushton (setas) permeando o revestimento epitelial cístico (HE, 100x).

Cisto dentígero

Nos 22 casos de cisto dentígero, os pacientes apresentavam idade média de 29 anos (variando de 7 a 68 anos), onde 13 casos (59,1%) ocorreram em homens. A maxila foi acometida em 17 casos (77,3%) e a mandíbula em 5 casos (22,7%) (Tabela II).

Histologicamente, na maioria dos casos (15 – 68,2%) foi observado epitélio de revestimento formado por duas a quatro camadas celulares, constituídas frequentemente por células epiteliais cúbicas (Figura 3). Entretanto, em 7 (31,8%) casos o epitélio cístico se apresentava hiperplásico. Na cápsula conjuntiva, reação inflamatória crônica foi observada em 13 casos (59,1%), sendo classificada como leve em 11 (84,6%) e intensa em 2 (15,4%).

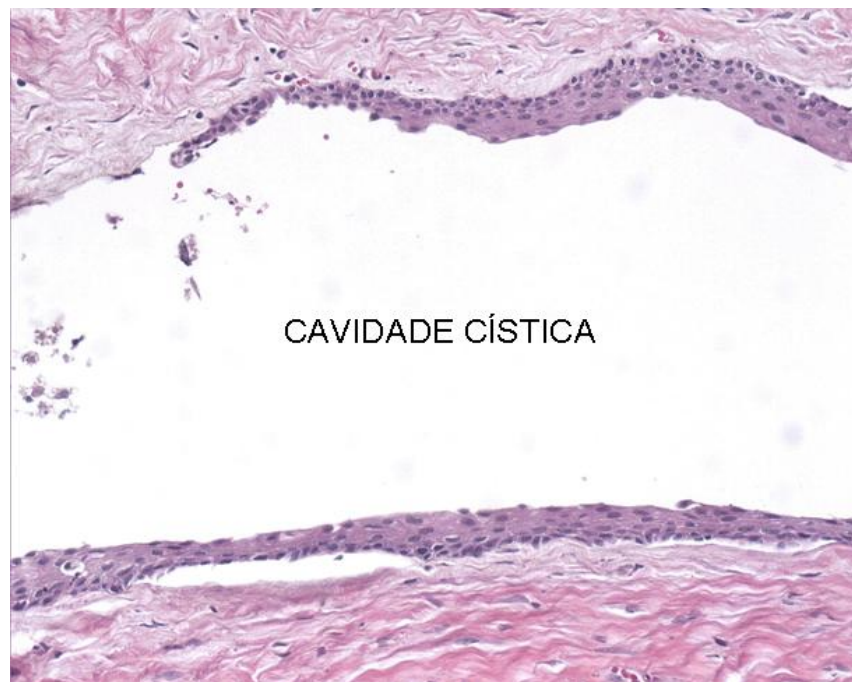


Figura 3 – Cisto dentígero apresentando revestimento epitelial com cerca de 4 camadas celulares, sem infiltrado inflamatório na cápsula cística (hematoxilina-eosina, 100x).

Tumor odontogênico queratocístico

A maioria dos casos de tumor odontogênico queratocístico 10 (58,8%) ocorreu em homens, com uma média de idade de 45,8 anos (variando de 13 a 78 anos). 12 casos (70,6%) ocorreram na mandíbula e 7 (29,4%) na maxila (Tabela II).

Microscopicamente, foram observados em todos os casos epitélio de revestimento composto por 6 a 8 camadas celulares, com paraqueratina superficial corrugada, além de camada basal composta por células polarizadas e dispostas em paliçada (Figura 4). Todos os casos apresentaram superfície de paraqueratina. Entretanto, 7 casos (41,2%) apresentaram infiltrado inflamatório crônico leve, e o tecido epitelial se apresentou hiperplásico nessas regiões, com perda de sua arquitetura convencional. Além disso, cistos satélites foram observados em 2 casos (11,7%).

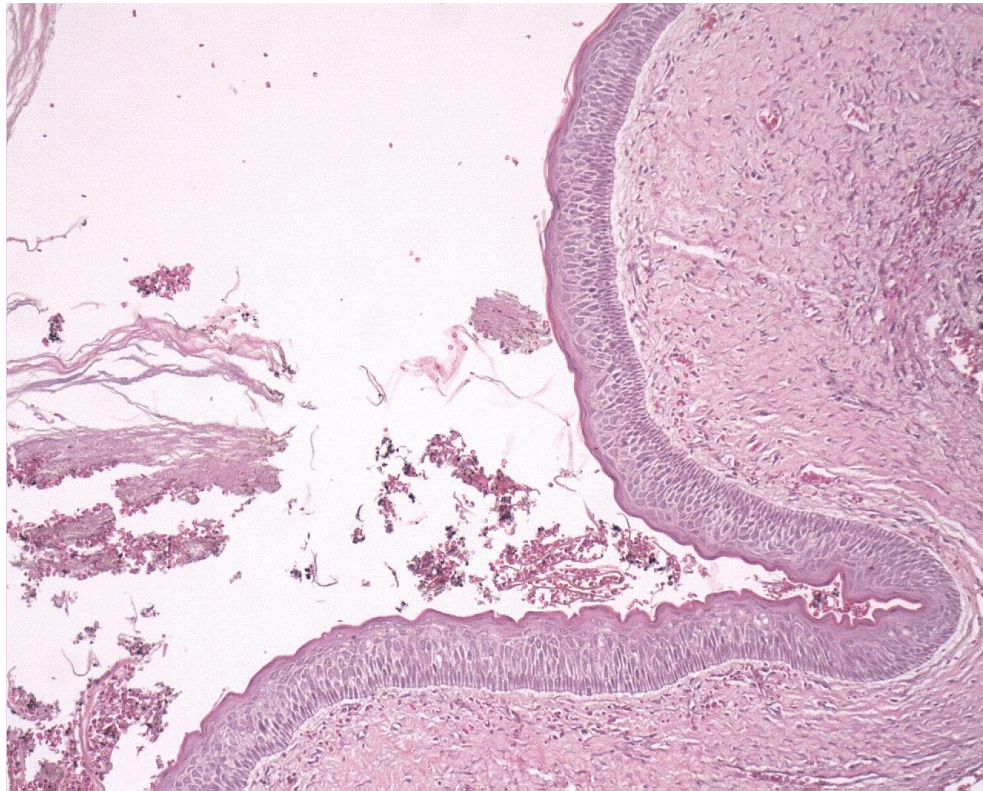


Figura 4 – Tumor odontogênico queratocístico apresentando revestimento epitelial clássico, com paraqueratina superficial corrugada e células basais se apresentando em paliçada (hematoxilina-eosina, 100x).

Tabela II – Dados epidemiológicos das lesões císticas estudadas

Características epidemiológicas	Lesões*		
	Cisto radicular n=35	Cisto dentígero n=22	Tumor odontogênico queratocístico n=17
Gênero			
Masculino	21 (60,0%)	13 (59,1%)	10 (58,8%)
Feminino	14 (40,0%)	9 (40,9%)	7 (41,2%)
Idade média	42,2 (19-78 anos)	29 (7-68 anos)	45,8 (13-78 anos)
Local			
Maxila	20 (57,1%)	17 (77,3%)	5 (29,4%)
Mandíbula	15 (42,9%)	5 (22,7%)	12 (70,6%)

Expressão Imunoistoquímica de PTHrP e Receptor PTH/PTHrP do Tipo I (PTH/PTHrP- 1R)

Antes da descrição dos achados imunoistoquímicos, vale salientar que houve co-expressão de PTHrP e seu receptor em todos os casos analisados, exceto 1 caso de cisto radicular.

Cisto radicular

Avaliando a expressão de PTHrP e receptor PTH/PTHrP-1R nas células do epitélio de revestimento cístico, observou-se que em 33 casos (94,3%) o epitélio de revestimento foi positivo para PTHrP, sendo 2 casos (6,1%) fracamente positivos e 31 (93,9%) fortemente positivos. Todos os casos apresentaram o epitélio cístico positivo para o receptor PTH/PTHrP-1R, com 2 casos (5,7%) apresentando fraca e 33 (94,3%) forte positividade.

Com relação à intensidade de expressão de PTHrP no epitélio cístico, dos 33 casos positivos para PTHrP, 20 (60,6%) apresentaram fraca intensidade de expressão (Figura 5A), enquanto 13 (39,4%) mostraram forte intensidade (Figura 5B, 5C, 5D). Dos casos de cisto radicular positivos para o receptor PTH/PTHrP, 23 (65,7%) apresentaram fraca intensidade e 12 (34,3%) mostraram forte intensidade de expressão (Figura 6).

A expressão de PTHrP e receptor de PTH/PTHrP-1R, assim como a intensidade da expressão, também foram avaliadas na cápsula fibrosa do cisto radicular. A grande maioria dos casos (34 – 97,1%) apresentou expressão positiva de PTHrP na cápsula fibrosa, com 18 casos (52,9%) apresentando forte e 16 casos (47,1%) fraca

expressão. A expressão do receptor PTH/PTHrP-1R foi positiva na cápsula fibrosa de 33 casos (94,3%) de cisto radicular; em 25 casos (75,7%) a expressão foi forte e em 8 (24,3%) havia fraca positividade.

A análise da intensidade de expressão de PTHrP na cápsula fibrosa revelou que dos 34 casos de cisto radicular positivos, 22 (64,7%) apresentavam forte (Figura 5B), enquanto 12 (35,3%) mostravam fraca intensidade de expressão. Já nos casos que apresentavam expressão do receptor PTH/PTHrP-1R na cápsula fibrosa, 21 (63,6%) também apresentavam forte intensidade (Figura 6D) e 12 (36,4%) fraca intensidade de expressão.

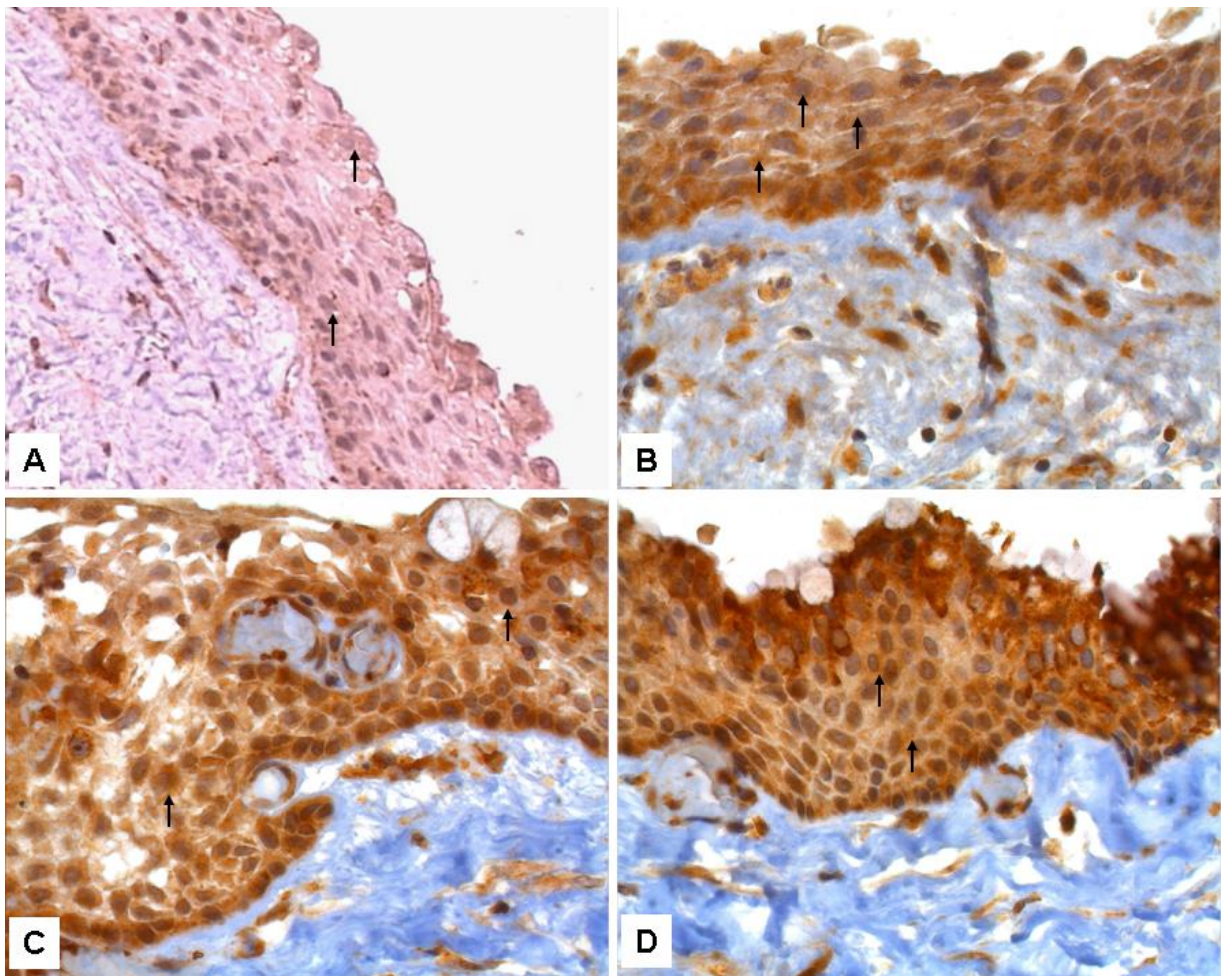


Figura 5 – Expressão imunoistoquímica de PTHrP em cistos radiculares. A – Fraca intensidade de expressão no revestimento epitelial de cisto radicular (setas). B – Forte intensidade de expressão de PTHrP no epitélio e cápsula cística de cisto radicular (setas). C, D – Forte intensidade de expressão de PTHrP no revestimento epitelial de cistos radiculares (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

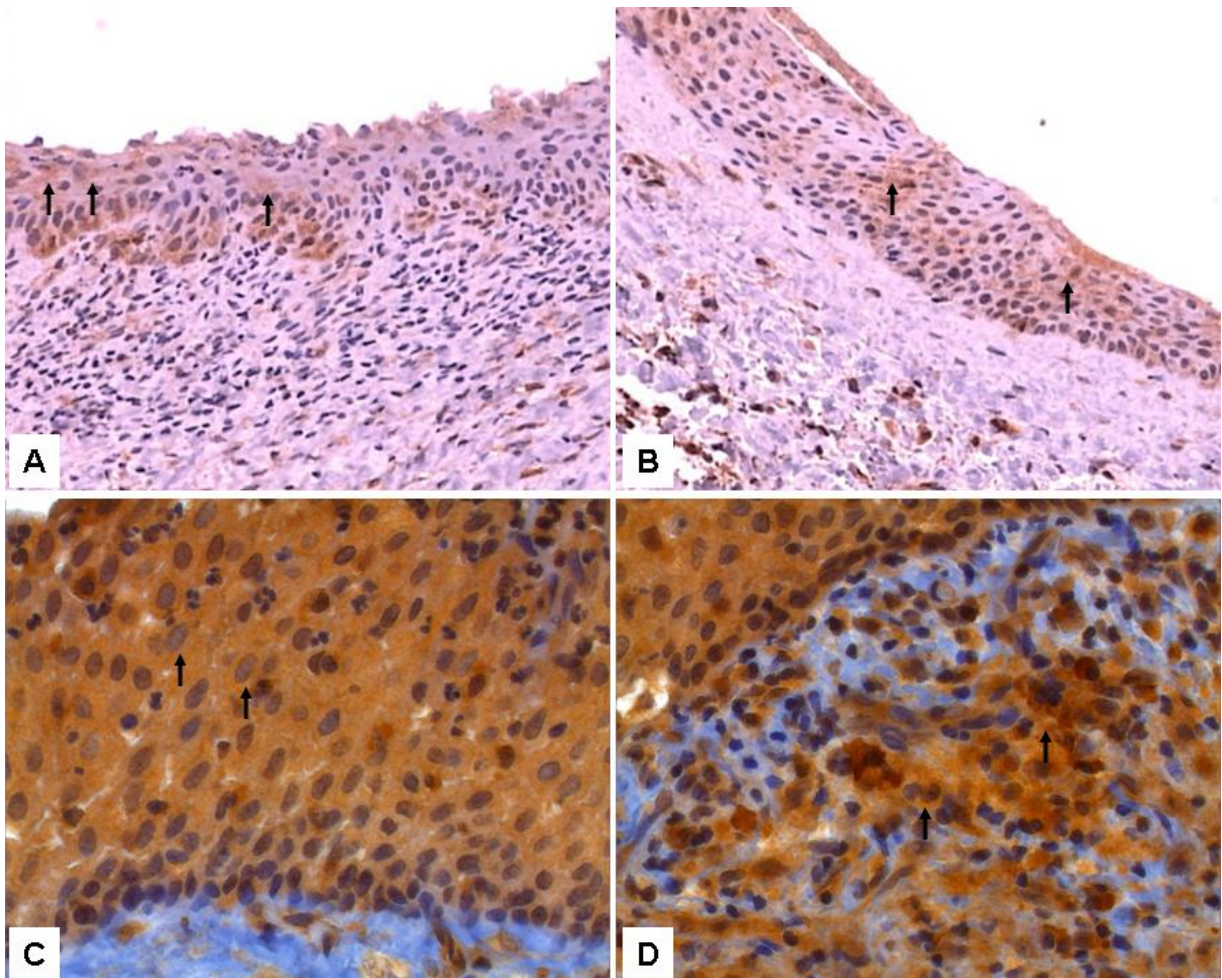


Figura 6 – Expressão imunoistoquímica do receptor PTH/PTHrP-1R em cistos radiculares. A, B – Fraca intensidade de expressão de PTH/PTHrP-1R (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 100x). C – Forte intensidade de expressão de PTH/PTHrP-1R no revestimento epitelial de cisto radicular (setas). D – Forte intensidade de expressão de PTH/PTHrP-1R na cápsula cística (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

Cisto dentífero

Todos os casos de cisto dentífero apresentaram expressão de PTHrP no revestimento epitelial, onde em 21 casos (95,4%) havia forte (Figura 7) e em 1 (4,6%) fraca expressão. Da mesma forma, todos os casos expressaram o receptor

PTH/PTHrP-1R no epitélio cístico, com a maioria dos casos (19 – 86,4%) apresentando forte expressão (Figura 8).

A avaliação da intensidade da expressão nos casos positivos para PTHrP no revestimento cístico, revelou que 17 casos (77,3%) apresentaram forte (Figura 7) e 5 (22,7%) fraca intensidade de expressão. Em quatorze casos (63,6%) foi evidenciada forte intensidade de expressão para o receptor PTH/PTHrP-1R e em 8 (36,4%) fraca intensidade foi observada (Figura 8).

Como ocorreu no revestimento epitelial, todos os casos apresentaram expressão de PTHrP na cápsula fibrosa, sendo forte em 18 casos (81,8%) e fraca em 4 (18,2%). Resultados similares foram observados na expressão do receptor PTH/PTHrP-1R na cápsula fibrosa, onde todos os casos de cisto dentífero foram positivos; destes, 11 (50%) mostraram forte e 11 (50%) fraca expressão do receptor PTH/PTHrP-1R.

Dos casos que apresentaram expressão de PTHrP na cápsula fibrosa, em 15 (68,2%) havia forte intensidade e em 7 casos (31,8%) fraca intensidade de expressão. Achados semelhantes foram observados na intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R na cápsula fibrosa de cistos dentíferos, com 12 casos (54,6%) apresentando forte intensidade e 10 (45,4%) fraca intensidade de expressão do referido receptor.

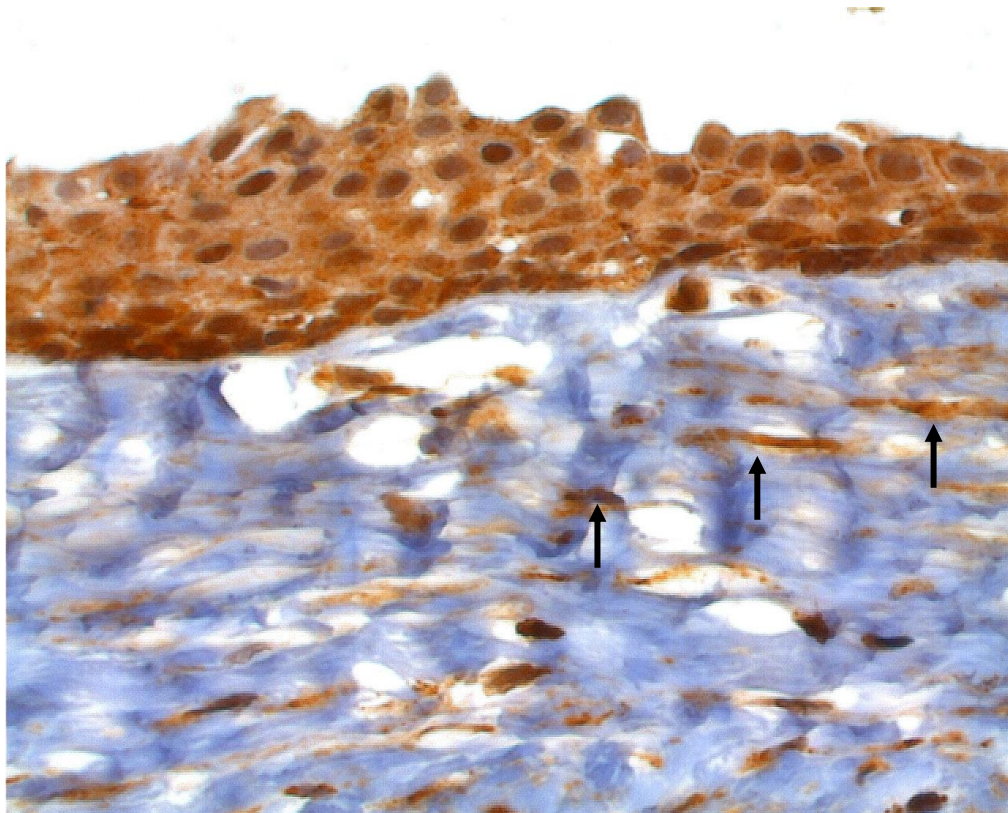


Figura 7 – Forte intensidade de expressão imunoistoquímica de PTHrP no revestimento epitelial de cisto dentígero. Note que a maioria das células mesenquimais da cápsula fibrosa também expressam PTHrP com forte intensidade (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

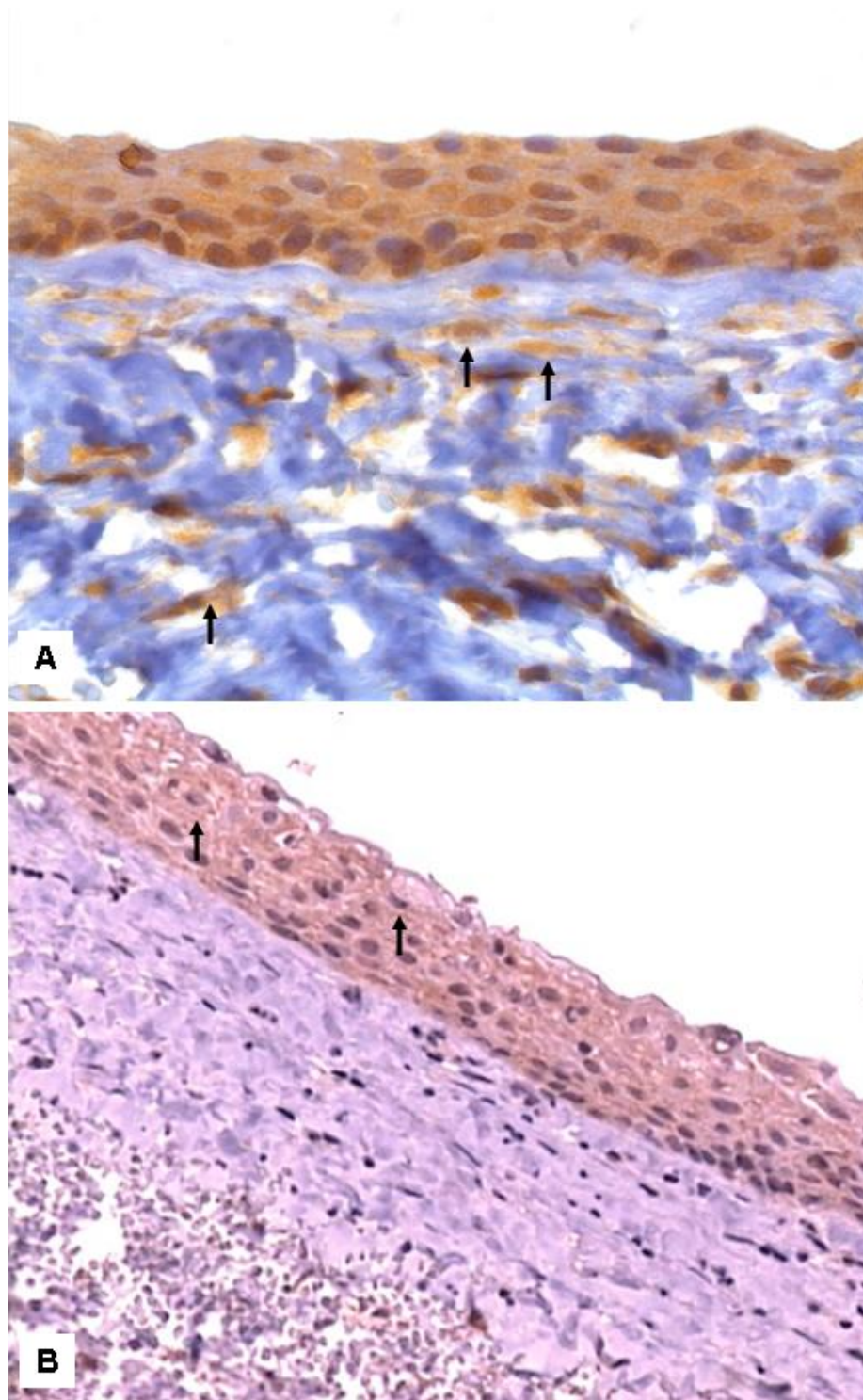


Figura 8 – Expressão imunoistoquímica de PTH/PTHrP-1R em cistos dentígeros. A – Forte intensidade de expressão de PTH/PTHrP no revestimento epitelial e cápsula fibrosa (setas) de cisto dentígero. B – Fraca intensidade de expressão de PTH/PTHrP-1R no revestimento epitelial (setas) (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

Tumor odontogênico queratocístico

Todos os casos de tumor odontogênico queratocístico apresentaram expressão de PTHrP no revestimento epitelial, onde em 16 casos (94,1%) havia forte (Figura 9A) e em 1 (5,9%) fraca expressão (Figura 9B). Com relação à expressão do receptor PTH/PTHrP-1R, todos os casos apresentaram forte expressão dessa proteína no epitélio cístico (Figura 10).

Doze casos (70,6%) de tumor odontogênico queratocístico apresentaram forte intensidade de expressão de PTHrP no epitélio cístico (Figura 9A), enquanto em 5 casos (29,4%) havia fraca intensidade de expressão (Figura 9B). A avaliação da intensidade da expressão para o receptor PTH/PTHrP-1R revelou que 13 casos (76,5%) apresentaram forte (Figura 10A) e 4 (23,5%) fraca intensidade de expressão (Figura 10B).

Da mesma forma, PTHrP foi expresso na cápsula fibrosa de todos os casos, apresentando forte expressão em 12 casos (70,6%) e fraca em 5 (29,4%) (Figura 9). Embora o receptor PTH/PTHrP-1R tenha sido expresso na cápsula fibrosa de todos os casos, 10 (58,8%) apresentaram fraca e 7 casos (41,2%) forte expressão (Figura 10).

Com relação à intensidade da expressão de PTHrP na cápsula fibrosa, 10 casos (58,8%) apresentaram forte e 7 (41,2%) fraca intensidade de expressão (Figura 9). Em onze casos (64,7%) foi observada forte intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R na cápsula fibrosa e em 6 (35,3%) houve fraca intensidade de expressão (Figura 10).

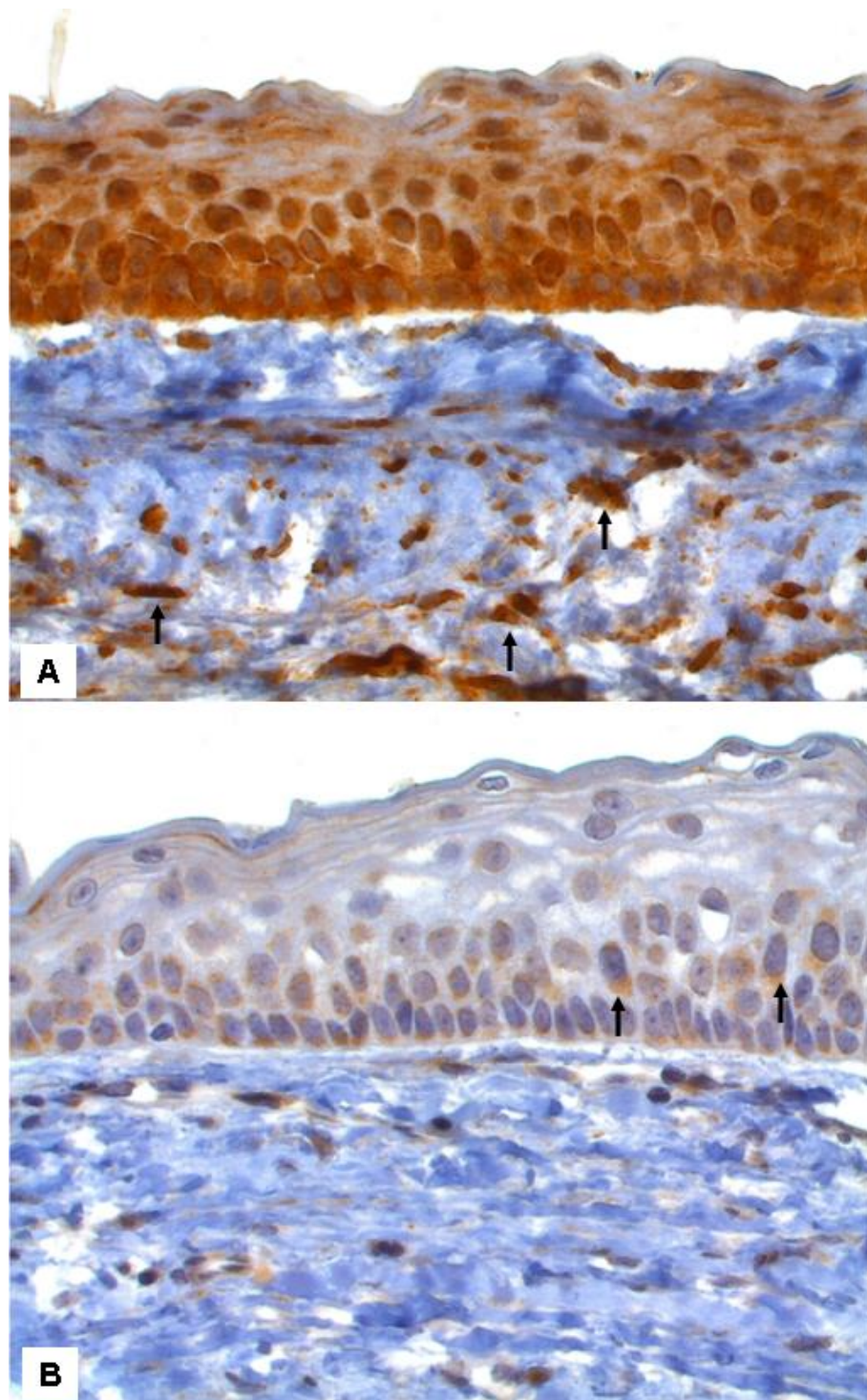


Figura 9 – Expressão imunoistoquímica de PTHrP em tumor odontogênico queratocístico. A – Forte intensidade de expressão de PTHrP no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa (setas) de tumor odontogênico queratocístico. B – Fraca intensidade de expressão de PTHrP no epitélio (setas) e na cápsula fibrosa de tumor odontogênico queratocístico (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

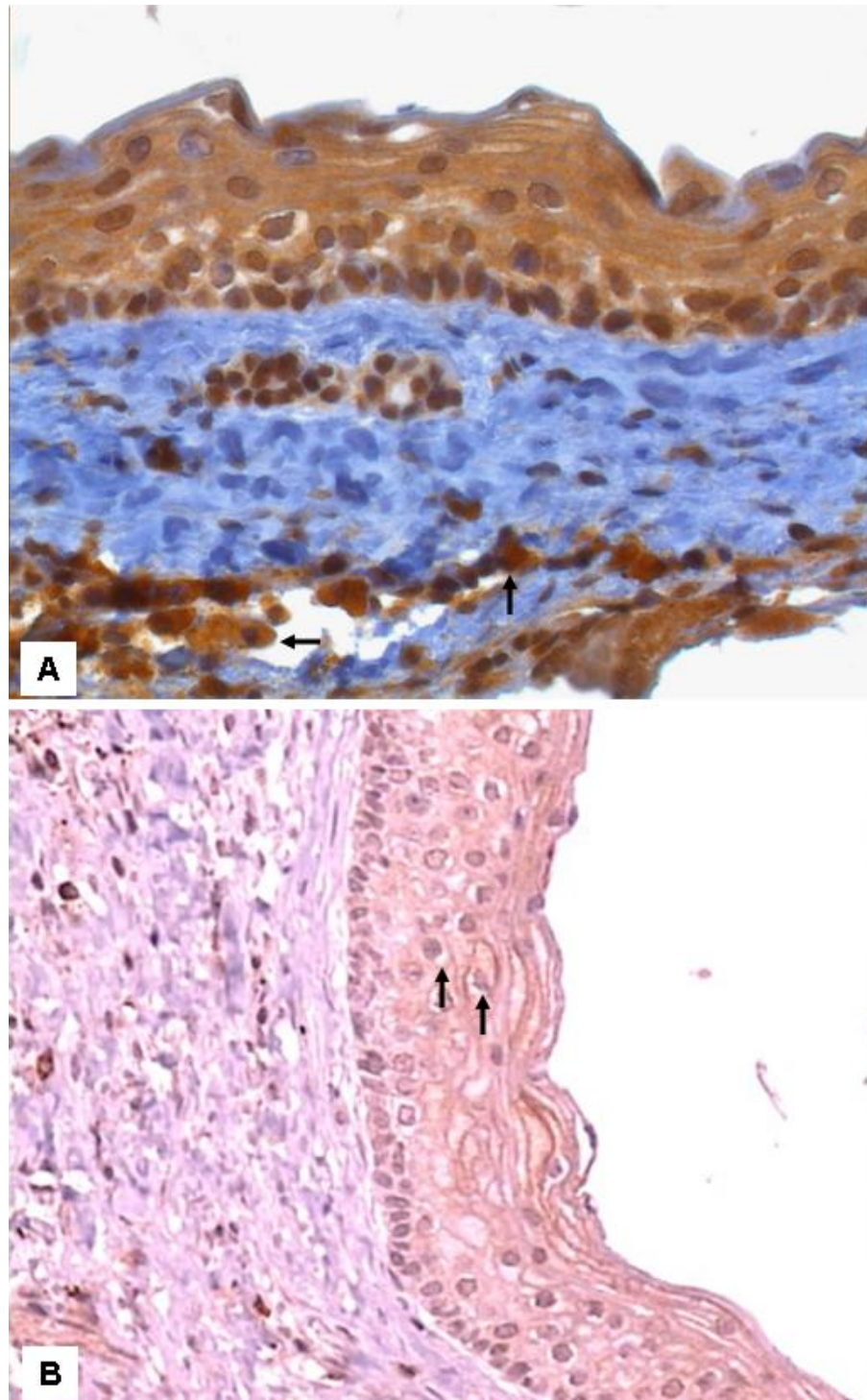


Figura 10 – Expressão imunistoquímica do receptor PTH/PTHrP-1R em tumor odontogênico queratocístico. A - Forte intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R no revestimento epitelial e na cápsula fibrosa (setas) de tumor odontogênico queratocístico. B – Fraca intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R no epitélio (setas) e na cápsula fibrosa de tumor odontogênico queratocístico (estreptavidina-biotina-peroxidase, 200x).

Análise Estatística

Comparando a expressão de PTHrP no epitélio cístico das 3 lesões estudadas, não se observou diferença estatística significativa ($p=0,9$), o mesmo observado quanto a expressão do receptor PTH/PTHrP-1R ($p=0,3$). Entretanto, as intensidades de expressões de PTHrP ($p=0,01$) e receptor PTH/PTHrP-1R ($p=0,007$) no epitélio cístico foram significativamente mais fracas nos cistos radiculares, quando comparadas aos cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos (Tabela III).

Tabela III – Análise comparativa da expressão e intensidade da expressão de PTHrP e do seu receptor PTH/PTHrP-1R no revestimento epitelial de cisto radiculares (CR), cistos dentígeros (CD) e tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ).

Variáveis	Lesões			p
	RC n=35 (%)	CD n=22 (%)	TOQ n=17 (%)	
Expressão de PTHrP				
Negativa	2 (5,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,9
Positiva fraca	2 (5,7)	1 (4,6)	1 (5,9)	
Positiva forte	31 (88,6)	21 (95,4)	16 (94,1)	
Expressão do receptor PTH/PTHrP-1R				
Negativa	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,3
Positiva fraca	2 (5,7)	3 (13,6)	0 (0,0)	
Positiva forte	33 (94,3)	19 (86,4)	17 (100,0)	
Intensidade de expressão de PTHrP				
Fraca	20 (60,6)	5 (22,7)	5 (29,4)	0,01*
Forte	13 (39,4)	17 (77,3)	12 (70,6)	
Intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R				
Fraca	23 (65,7)	8 (36,4)	4 (23,5)	0,007*
Forte	12 (34,3)	14 (63,6)	13 (76,5)	

*Estatisticamente significante

Na cápsula fibrosa, as diferenças na expressão ($p=0,1$) e intensidade da expressão ($p=0,9$) de PTHrP entre as lesões não foram estatisticamente significantes, o mesmo sendo observado na intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP ($p=0,7$). A expressão do receptor PTH/PTHrP na cápsula fibrosa dos cistos radiculares foi significativamente mais forte ($p=0,04$), quando comparada à expressão nos cistos dentígeros e tumores odontogênicos queratocísticos (Tabela IV).

Tabela IV – Análise comparativa da expressão e intensidade da expressão de PTHrP e do seu receptor PTH/PTHrP-1R na cápsula fibrosa de cisto radiculares (CR), cistos dentígeros (CD) e tumores odontogênicos queratocísticos (TOQ).

Variáveis	Lesões			p
	RC n=35 (%)	CD n=22 (%)	TOQ n=17 (%)	
Expressão de PTHrP				
Negativa	1 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,1
Positiva fraca	16 (45,7)	4 (18,2)	5 (29,4)	
Positiva forte	18 (51,4)	18 (81,8)	12 (70,6)	
Expressão do receptor PTH/PTHrP-1R				
Negativa	2 (5,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,04*
Positiva fraca	8 (22,8)	11 (50,0)	10 (58,8)	
Positiva forte	25 (71,4)	11 (50,0)	7 (41,2)	
Intensidade de expressão de PTHrP				
Fraca	12 (35,3)	7 (31,8)	7 (41,2)	0,9
Forte	22 (64,7)	15 (68,2)	10 (58,8)	
Intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP-1R				
Fraca	12 (36,4)	10 (45,4)	6 (35,3)	0,7
Forte	21 (63,6)	12 (54,6)	11 (64,7)	

*Estatisticamente significante

Nos cistos radiculares, observou-se correlação positiva entre a expressão e a intensidade de expressão de PTHrP ($p=0,005$), expressão do receptor PTH/PTHrP no epitélio cístico e na cápsula cística ($p=0,009$), expressão de PTHrP no epitélio e na cápsula cística ($p=0,03$), expressão do receptor PTH/PTHrP no epitélio cístico e expressão ($p=0,03$) e intensidade ($p=0,01$) de PTHrP na cápsula cística e entre a intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP na cápsula cística e expressão ($p=0,02$) e intensidade ($p=0,0003$) do receptor PTH/PTHrP no epitélio cístico.

Nos cistos dentígeros, observou-se correlação positiva entre a expressão de PTHrP e receptor de PTH/PTHrP ($p=0,008$), entre a intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP no revestimento epitelial e na cápsula cística ($p=0,03$) e entre a expressão e intensidade de expressão do receptor PTH/PTHrP na cápsula cística ($p=0,008$). Nos tumores odontogênicos queratocísticos foi observada correlação positiva entre a intensidade de expressão de PTHrP no epitélio cístico e expressão ($p=0,001$) e intensidade de expressão ($p=0,03$) de PTHrP na cápsula cística.



Discussão

Lesões císticas odontogênicas são formadas a partir de remanescentes embrionários de epitélio odontogênico, entretanto, apresentam características clínicas, histológicas, radiográficas e comportamento biológico distintos. Essa diferença pode ser atribuída às características específicas que o tecido epitelial adquire nas diferentes lesões císticas odontogênicas, provavelmente devido a diferentes taxas de proliferação celular e expressão normal ou alterada de proteínas envolvidas na diferenciação e ciclo celular, além de fatores associados ao potencial de reabsorção óssea. Esses mesmos fatores podem também ser diferencialmente expressos na cápsula cística dessas lesões, além de citocinas inflamatórias importantes na indução de reabsorção óssea, o que pode contribuir para origem e progressão das lesões. Entre as lesões císticas odontogênicas, destacam-se o cisto radicular, de origem inflamatória, os de desenvolvimento o cisto dentígero e o tumor odontogênico queratocístico, este recentemente foi classificado como uma neoplasia cística benigna (AGARAM et al., 2004; BARNES et al., 2005; KICHI et al., 2005; MALCIC et al., 2008).

Um arquivo bem conservado de tecidos embebidos em parafina é uma fonte importante de material biológico para o desenvolvimento de estudos morfológicos, imunoistoquímicos e eventualmente moleculares, das mais diversas patologias, de diferentes locais, neoplásicas ou não-neoplásicas, inflamatórias ou de desenvolvimento. Achados importantes podem ser obtidos de tais estudos, como determinar as características histopatológicas usuais e não usuais de uma determinada lesão, compreender eventos biológicos, determinar fatores prognósticos

ou instituir novas terapias. O fato da Universidade de Ribeirão Preto manter o Laboratório de Patologia Bucal por vários anos e propiciar o adequado arquivamento dos espécimes recebidos ao longo do tempo, permitiu a realização deste estudo, o qual analisou 74 lesões císticas odontogênicas, utilizando a imunoistoquímica como ferramenta principal de investigação.

A técnica de imunoistoquímica baseia-se no princípio da reação antígeno-anticorpo, realizada em cortes histológicos, associada a métodos de coloração para evidenciar tal reação. Essa técnica detecta os antígenos (proteínas) localizados no núcleo, citoplasma ou membrana da célula a ser estudada, constituindo numa ferramenta extremamente útil e importante no diagnóstico histopatológico, sobretudo nas neoplasias indiferenciadas e fusocelulares, e na investigação científica (LI et al., 1997; PIATTELLI et al., 2004; MENEZES et al., 2006; SILVA et al., 2008; NADALIN, 2008), como foi realizado neste estudo. Atualmente, vários anticorpos são disponíveis para serem utilizados em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, o que representa uma grande vantagem, visto que é possível utilizar essa técnica importante em material biológico (tecidos) arquivado, como foi executado neste experimento. Especificamente na Endodontia, em especial no cisto radicular e no granuloma periapical, em estudos diversos foram utilizados a imunoistoquímica para investigar o papel de citocinas, fatores de crescimento, fatores de diferenciação celular, genes supressores de tumor e oncogenes no início, desenvolvimento e progressão dessas lesões (LI et al., 1997; PIATTELLI et al., 2004; MENEZES et al., 2006; NADALIN, 2008).

Neste estudo, praticamente metade dos casos apresentou revestimento cístico hiperplásico e em todos os cistos radiculares havia reação inflamatória crônica na cápsula de tecido conjuntivo, onde em 65,7% dos casos ela era intensa. Esses achados se justificam, visto que o cisto radicular se origina a partir de uma inflamação e consequente necrose do tecido pulpar, que estimula restos epiteliais odontogênicos localizados no ligamento periodontal apical, denominados restos de Malassez (SHEAR; SPEIGHT, 2007). Após a formação cística, a persistência de agentes irritantes no periápice contribui para a manutenção de uma cápsula fibrosa com reação inflamatória de intensidade variável predominantemente formada por linfócitos, embora plasmócitos, macrófagos, neutrófilos e raramente eosinófilos e mastócitos possam também ser observados (TAKEDA et al., 2005). Além disso, a inflamação presente na cápsula cística estimula o epitélio cístico a proliferar, tornando-o hiperplásico (TAKEDA et al., 2005; SHEAR; SPEIGHT, 2007).

Histopatologicamente, embora o cisto radicular seja revestido por um tecido epitelial estratificado escamoso na maioria dos casos, há relatos prévios de cistos radiculares revestidos parcialmente ou predominantemente por um tecido epitelial cilíndrico ciliado ou apresentando células mucosas (NAIR et al., 2002; TAKEDA et al., 2005). A presença de tais células no epitélio cístico é considerada metaplásica, mas as causas desse fenômeno e sua importância biológica ainda não foram determinadas (TAKEDA et al., 2005). TAKEDA et al. (2005) observaram, no revestimento epitelial de cistos radiculares células mucosas e ciliadas em 18% e 10,7%, respectivamente, diferente da prevalência encontrada no presente estudo, com 5,7% dos casos

apresentando células mucosas e apenas 1 caso (2,8%) tinha células ciliadas no seu epitélio cístico. Essas diferenças podem ser devido ao número de casos analisados e à técnica utilizada para identificar as células mucosas. Ao contrário do realizado por TAKEDA et al. (2005), no presente estudo a coloração de PAS foi utilizada para identificar e confirmar a presença de células mucosas no revestimento epitelial.

No cisto radicular, cristais de colesterol presentes na cápsula fibrosa ou formando o líquido cístico são freqüentes, podendo desencadear uma reação inflamatória granulomatosa de corpo estranho (SHEAR; SPEIGHT, 2007), como observado em 28,6% dos casos analisados neste estudo. Os cristais de colesterol podem ter significado clínico importante. A formação de reações inflamatórias granulomatosas de corpo estranho associadas a cristais de colesterol pode perpetuar as lesões periapicais crônicas, incluindo cistos radiculares, mesmo após tratamento endodôntico (NAIR et al., 1998; NAIR et al., 2004). Ainda em relação às características microscópicas, eventualmente o revestimento epitelial do cisto radicular pode apresentar calcificações lineares ou em forma de arco, denominadas corpúsculos de Rushton (TAKEDA et al., 2005), como foi observado em 5,7% dos casos da presente série.

A maioria das lesões císticas odontogênicas é intra-óssea, caracterizando-se como uma alteração osteolítica, de localização e características distintas de acordo com a origem e tipo de lesão. Desta forma, a reabsorção óssea é um fenômeno importante na progressão dessas lesões e a capacidade de cada uma delas em induzir a destruição óssea pode explicar seus comportamentos biológicos e

características radiográficas próprias. Várias citocinas, receptores e complexos protéicos têm sido estudados em lesões odontogênicas intra-ósseas (TAY et al., 2004; FORMIGLI et al., 1995; MEGHJI et al., 1996; MENEZES et al., 2006; SILVA et al., 2008). Atualmente, o complexo RANK-RANKL/ OPG (osteoprotegerina) é reconhecido como uma importante via de reabsorção óssea. RANK está presente na superfície de osteoclastos em áreas de reabsorção óssea e é ativado pelo seu ligante, RANKL. A OPG inibe essa ativação, unindo diretamente à RANKL. Esse complexo foi identificado em várias lesões maxilo-faciais, inflamatórias, neoplásicas e do desenvolvimento, sugerindo papel fundamental na reabsorção óssea induzida por essas lesões (TAY et al., 2004; MENEZES et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Outra proteína, a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), foi identificada como fator importante na indução de reabsorção óssea, regulando a expressão de RANKL. A PTHrP foi identificada há cerca de 20 anos, como um produto de células tumorais capaz de ativar receptores de paratormônio, causando hipercalemia. Apresenta estrutura e função semelhantes ao paratormônio nativo e ambos são potentes agentes osteoclastogênicos. PTHrP estimula os osteoblastos a expressarem RANKL, o qual atua em pró-osteoclastos, diferenciando-os em osteoclastos maduros (LIAO; McCAULEY, 2006). Está envolvida em processos fisiológicos, como a erupção dentária e o desenvolvimento mandibular, e patológicos, como metástases ósseas e no mieloma múltiplo (DOWNEY et al., 1997; KITAHARA et al., 2002; KITAZAWA et al., 2002; ZHAO et al., 2002; YAO et al., 2007). Assim, essa proteína também poderia eventualmente desempenhar função fundamental na

progressão de lesões odontogênicas intra-ósseas. Entretanto, poucos estudos têm pesquisado a expressão de PTHrP nessas lesões (LI et al., 1997; ABDELSAYED et al., 2004; OHTSURO, 2005).

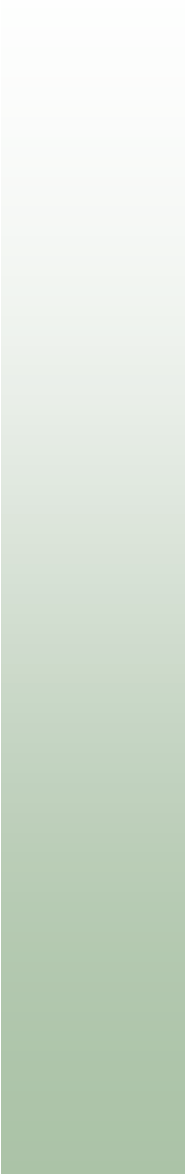
No presente estudo, praticamente todos os casos, exceto dois cistos radiculares, expressaram PTHrP em graus variados de intensidade no epitélio e na cápsula cística, reforçando que essa proteína pode ter papel importante no desenvolvimento e progressão das lesões císticas odontogênicas, como também foi observado por LI et al. (1997). A expressão de PTHrP também foi observada em ameloblastomas (ABDELSAYED et al., 2004; OHTSURO, 2005). Curiosamente, analisando a intensidade de expressão da PTHrP, o cisto radicular apresentou uma intensidade de expressão significativamente mais fraca que o tumor odontogênico queratocístico e o cisto dentígero, explicando pelo menos em parte, o crescimento menos destrutivo e infiltrativo do cisto radicular, quando comparado às outras duas lesões (KICHI et al., 2005; SHEAR; SPEIGHT, 2007). Resultados semelhantes foram também observados por LI et al. (1997).

Embora haja inequívoca presença de PTHrP nas lesões císticas estudadas, é difícil determinar se a produção dessa proteína é local, sistêmica ou uma combinação de ambas (LI et al., 1997). KRAMER et al. (1991) observaram que queratinócitos em cultura produzem PTHrP. Estudos *in vitro* mostraram que PTHrP pode estimular a síntese de DNA em diferentes tipos de células mesenquimais na presença de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante (TGF)- β . Como os cistos odontogênicos apresentam imunoexpressão de TGF- β e EGF na cápsula

fibrosa e no revestimento epitelial (LI et al., 1997; PIATTELLI et al., 2004), a produção local de PTHrP pelas células epiteliais do revestimento cístico e mesenquimais da cápsula fibrosa pode ser melhor compreendida.

A co-expressão de PTHrP e seu receptor do tipo I (PTH/PTHrP-1R) é frequentemente observada em neoplasias malignas. A expressão do receptor PTH/PTHrP-1R é mais evidente em carcinomas de mama com metástases ósseas quando comparados aos carcinomas iniciais (LINFORTH et al., 2002). Observação semelhante foi evidenciada em carcinomas de próstata (IDDON et al., 2000). Assim, com a expressão do receptor de PTH/PTHrP-1R em vários tumores, PTHrP pode estimular a proliferação celular, adesão e sobrevida dos pacientes por ação direta nas células que expressam o receptor I (LIAO; McCAULEY, 2006). Embora sejam lesões predominantemente intra-ósseas, não há estudos prévios avaliando a imunoexpressão do receptor PTH/PTHrP-1R em lesões císticas odontogênicas. No presente estudo, todas as lesões expressaram o receptor PTH/PTHrP-1R no revestimento epitelial e cápsula cística em diferentes intensidades. A co-expressão de PTHrP e seu receptor nas lesões estudadas, sugere um mecanismo autócrino e/ou parácrino que pode contribuir para a progressão das lesões. Como foi observado na expressão isolada de PTHrP, o cisto radicular apresentou intensidade de expressão significativamente mais fraca de PTH/PTHrP-1R que o tumor odontogênico queratocístico e cisto dentígero, situação na qual podemos compreender parcialmente o comportamento biológico mais brando dos cistos radiculares, com menor grau de infiltração e destruição óssea.

O presente estudo traz novas informações com relação à biologia das lesões císticas odontogênicas mais comuns. A co-expressão de PTHrP e seu receptor, não relatada anteriormente em lesões císticas odontogênicas, sugere que além do possível papel de PTHrP na indução de reabsorção óssea, pode haver um estímulo autócrino e/ou parácrino nas células epiteliais e mesenquimais dessas lesões, induzindo à proliferação, e conseqüentemente contribuindo também para a sua progressão. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados, sobretudo aqueles *in vitro*, utilizando cultura de células e biologia molecular, para confirmar esses achados e determinar realmente qual o papel da co-expressão nessas lesões.



Conclusões

Nas condições experimentais deste estudo, e com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Reação inflamatória crônica intensa associada a revestimento epitelial hiperplásico é um achado comum em cistos radiculares.

2. Células mucosas e ciliadas são raramente observadas no revestimento epitelial de cistos radiculares.

3. Cristais de colesterol são achados frequentes nos cistos radiculares.

4. O epitélio do tumor odontogênico queratocístico pode perder sua arquitetura convencional na presença de inflamação na cápsula cística.

5. O cisto radicular apresenta menor intensidade de expressão de PTHrP e do seu receptor PTH/PTHrP-1R, quando comparado ao cisto dentífero e tumor odontogênico queratocístico.

6. A co-expressão de PTHrP e seu receptor PTH/PTHrP-1R pode ter importante papel na progressão dessas lesões, pois pode agir estimulando a proliferação de células epiteliais e mesenquimais.



Referências Bibliográficas

ABDELSAYED, R. A.; VARTANIAN, R. K.; SMITH, K. K.; IBRAHIM, N. A.; GA, A. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) expression in ameloblastoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n. 2, p. 208-219, 2004.

AGARAM, N. P.; COLLINS, B. M.; BARNES, L.; LOMAGO, D.; ALDEEB, D.; SWALSKY, P.; FINKELSTEIN, S.; HUNT, J. L. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 128, n. 3, p. 313-317, 2004.

AMIZUKA, N.; DAVIDSON, D.; LIU, H.; VALVERDE-FRANCO, G.; CHAI, S.; MAEDA, T.; OZAWA, D.; HENDERSON, J. E. Signalling by fibroblast growth factor receptor 3 and parathyroid hormone-related peptide coordinate cartilage and bone development. **Bone**, v. 34, n. 1, p.13-25, 2004.

BARNES, L.; EVERSON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours- World Health Organization Classification of Tumours**, Lyon: IARC Press, p. 430, 2005.

BROWNE, R. M. The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. **J. Oral Pathol.**, v. 4, n.1, p. 31-46, 1975.

DOWNEY, S. E.; HOYLAND, J.; FREEMONT, A. J.; KNOX, F.; WALLS, J.; BUNDRED, N. J. Expression of the receptor for parathyroid hormone-related protein in normal and malignant breast tissue. **J. Pathol.**, v. 183, n. 2, p. 212-217, 1997.

FORMIGLI, L.; ORLANDINI, S. Z.; TONELLI, P.; GIANNELLI, M.; MARTINI, M.; BRANDI, M. L.; BERGAMINI, M.; ORLANDINI, G. E. Osteolytic processes in human

radicular cysts: morphological and biochemical results. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 216-220, 1995.

GERVÁSIO, A. M.; SILVA, D. A.; TAKETOMI, E. A.; SOUZA, C. J.; SUNG, S. S.; LOYOLA, A. M. Levels of GM-CSF, IL-3, and IL-6 in fluid and tissue from human radicular cysts. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 1, p. 64-68, 2002.

GROSSMANN, S. M.; MACHADO, V. C.; XAVIER, G. M.; MOURA, M. D.; GOMEZ, R. S.; AGUIAR, M. C. F.; MESQUITA, R. A. Demographic profile of odontogenic and selected nonodontogenic cysts in a Brazilian population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 104, n. 1, p. 35-41, 2007.

IDDON, J.; BUNDRED, N. J.; HOYLAND, J.; DOWNEY, S. E.; BAIRD, P.; SALTER, D.; McMAHON, R.; FREEMONT A. J. Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in bone metastases from prostate cancer. **J. Pathol.**, v. 191, n. 2, p. 170-174, 2000.

ISHIZUYA, T.; YOKOSE, S.; HORI, M.; NODA, T.; SUDA, T.; YOSHIKI, S. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 12, p. 2961-2970, 1997.

KICHI, E.; ENOKIYA, Y.; MURAMATSU, T.; HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; ABIKO, Y.; SHIMONO, M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 5, p. 280-286, 2005.

KITAHARA, Y.; SUDA, N.; KURODA, T.; BECK, F.; HAMMOND, V. E.; TAKANO, Y. Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 48-56, 2002.

KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; KAJIMOTO, K.; SOWA, H.; SUGIMOTO, T.; MATSUI, T.; CHIHARA, K.; MAEDA, S. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in multiple myeloma. **Pathol. Int.**, v. 52, n. 1, p. 63-68, 2002.

KRAMER, S.; REYNOLDS, F. H. Jr; CASTILLO, M.; VALENZUELA, D. M.; THORIKAY, M.; SORVILLO, J. M. Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1927-1937, 1991.

LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 23, n. 4, p. 184-189, 1994.

LI, T. J.; BROWNE, R. M.; MATTHEWS, J. B. Immunocytochemical expression of parathyroid hormone related protein (PTHrP) in odontogenic jaw cysts. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, n. 4, p. 275-279, 1997.

LI, H.; SEITZ, P. K.; THOMAS, M. L.; SELVANAYAGAM, P.; RAJARAMAN, S.; COOPER, C. W. Widespread expression of the parathyroid hormone-related peptide and PTH/PTHrP receptor genes in intestinal epithelial cells. **Lab. Invest.**, v. 73, n. 6, p. 864-870, 1995.

LIAO, J.; McCAULEY, L. K. Skeletal metastasis: Established and emerging roles of parathyroid hormone related protein (PTHrP). **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 4, p. 559-571, 2006.

LINFORTH, R.; ANDERSON, N.; HOEY, R.; NOLAN, T.; DOWNEY, S.; BRADY, G.; ASHCROFT, L.; BUNDRED, N. Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 10, p. 3172-3177, 2002.

LOZANO, D.; de CASTRO, L. F.; DAPIÁ, S.; ANDRADE-ZAPATA, I.; MANZARBEITIA, F.; ALVAREZ-ARROYO, M. V.; GÓMEZ-BARRENA, E.; ESBRIT, P. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2027-2035, 2009.

LUNDGREN, T.; STENPORT, V.; WETTER, A.; LINDE, A. Parathyroid hormone (1-34) receptor-binding and second-messenger response in rat incisor odontoblasts. **Calcif. Tissue Int.**, v. 62, n. 3, p. 255-259, 1998.

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

MALCIĆ, A.; JUKIĆ, S.; ANIĆ, I.; PAVELIĆ, B.; KAPITANOVIĆ, S.; KRUSLIN, B.; PAVELIĆ, K. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 5, p. 294-301, 2008.

MEGHJI, S.; QURESHI, W.; HENDERSON, B.; HARRIS, M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch. Oral Biol.**, v. 41, n. 6, p. 523-531, 1996.

MENEZES, R.; BRAMANTE, C. M.; PAIVA, K. B. S.; LETRA, A.; CARNEIRO, E.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.**, v. 102, n. 3, p. 404-409, 2006.

NAIR, P. N. R.; SJÖGREN, U.; SUNDQVIST, G. Cholesterol crystals as an etiological factor in non-resolving chronic inflammation: an experimental study in guinea pigs. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, n. 102 Pt 1, p. 644-650, 1998.

NAIR, P. N. R.; PAJAROLA, G.; LUDER, H. U. Ciliated epithelium-lined radicular cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 94, n. 4, p. 485-493, 2002.

NAIR, P. N. R. Pathogenesis of periapical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 348-381, 2004.

OHTSURO, M. Expression of parathyroid hormone-related protein in ameloblastomas. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v. 30, n. 4, p. 233-239, 2005.

PHILBRICK, W. M.; DREYER, B. E.; NAKCHBANDI, I. A.; KARAPLIS, A. C. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. **Medical Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11846-11851, 1998.

PIATTELLI, A.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; FAVERO, L.; STROCCHI, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in odontogenic cysts. **Int. J. Endod.**, v. 37, n. 1, p. 7-11, 2004.

SHEAR, M.; SPEIGHT, P. M. **Cysts of the Maxillofacial Regions**, Oxford: Blackwell Munksgaard, p. 222, 2007.

SILVA, T. A.; BATISTA, A. C.; MENDONÇA, E. F.; LELES, C. R.; FUKADA, S.; CUNHA, F. Q. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 105, n. 3, p. 333-341, 2008.

STOLL, C.; STOLLENWERK, C.; RIEDIGER, D.; MITTERMAYER, C.; ALFER, J. Cytokeratin expression patterns for distinction of odontogenic keratocysts from dentigerous and radicular cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 9, p. 558-564, 2005.

TAKEDA, Y.; OIKAWA, Y.; FURUYA, I.; SATOH, M.; YAMAMOTO, H. Mucous and ciliated cell metaplasia in epithelial linings of odontogenic inflammatory and developmental cysts. **J. Oral Sci.**, v. 47, n. 2, p. 77-81, 2005.

TAY, J. Y.; BAY, B. H.; YEO, J. F.; HARRIS, M.; MEGHJI, S.; DHEEN, S. T. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 4, p. 349-353, 2004.

TSUKAMOTO, G.; SASAKI, A.; AKIYAMA, T.; ISHIKAWA, T.; KISHIMOTO, K.; NISHIYAMA, A.; MATSUMURA, T. A radiologic analysis of dentigerous cysts and

odontogenic keratocysts associated with a mandibular third molar. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 91, n. 6, p. 743-747, 2002.

VARINAUSKAS, V.; GERVICKAS, A.; KAVOLIŪNIENE, O. Analysis of odontogenic cysts of the jaws. **Medicina (Kaunas)**., v.42, n. 3, p. 201-207, 2006.

YAMAZAKI, K.; SUDA, N.; KURODA, T. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in developing mouse meckel's cartilage and mandible. **Arch. Oral Biol.**, v. 42, n. 12, p. 787-794, 1997.

YAMAZAKI, Y.; SUDA, N.; KURODA, T. Distribution of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and type I parathyroid hormone (PTH) PTHrP receptor in developing mouse mandibular condylar cartilage. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 10, p. 853-860, 1999.

YAO, S.; PAN, F.; WISE, G. E. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat- Implications for tooth eruption. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, n. 3, p. 228-232, 2007.

ZHAO, Q., BRAUER, P. R., XIAO, L., MCGUIRE, M. H., YEE, J. A. Expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and its receptor (PTH1R) during the histogenesis of cartilage and bone in the chicken mandibular process. **J. Anat.**, v. 201, n. 2, p.137-151, 2002.



Anexo

Ribeirão Preto, 18 de dezembro de 2006

Prezado Senhor,

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

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

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

Atenciosamente,



Prof. Dr.ª Luciana Rezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da UNAERP
Universidade de Ribeirão Preto

