

Avaliação imuno-histoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (pcna) e da proteína p53 em ameloblastomas tratados pela técnica da marsupialização I

Proliferating cell nuclear antigen (pcna) and p53 protein immunohistochemical evaluation in ameloblastomas treated by marsupialization technics

Simone Souza Lobão Veras BARROS

Doutoranda – Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal – RN – Brasil

Roseana de Almeida FREITAS

Hébel Cavalcanti GALVÃO

Professora Doutora – Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal – RN – Brasil

Lélia Batista de SOUZA

Professora Doutora e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal – RN – Brasil

RESUMO

OBJETIVO: O propósito deste estudo foi avaliar a proliferação celular de ameloblastomas antes e depois de submetidos à técnica cirúrgica da marsupialização. **MÉTODOS:** quatro casos de ameloblastomas submetidos à marsupialização foram examinados imuno-histoquimicamente para a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína p53, em dois momentos do tratamento: na cirurgia inicial de descompressão e na subsequente enucleação. **RESULTADOS:** Observamos que a reatividade imuno-histoquímica para o PCNA e proteína p53, após a marsupialização, diminuiu em dois casos e aumentou em dois dos espécimes estudados. **CONCLUSÃO:** A marsupialização em ameloblastomas nem sempre é capaz de causar redução na atividade proliferativa das células tumorais.

UNITERMOS

Ameloblastoma; marsupialização, antígeno nuclear de célula em proliferação; proteína p53; célula

INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é a mais freqüente neoplasia benigna odontogênica de origem epitelial e representa cerca de 11% de todos os tumores odontogênicos⁷. Acomete principalmente pacientes entre a terceira e quarta décadas de vida, de ambos os sexos, tendo como localização preferencial o ângulo e o ramo ascendente da mandíbula^{2,20}. Histologicamente, o ameloblastoma pode assumir diversos padrões, incluindo folicular, plexiforme, acantomatoso, de células basais, de células granulosas e desmoplásico⁶. De acordo com suas características clínico-radiográficas, os ameloblastomas são classificados em: sólidos convencionais ou multicísticos (86%); unicísticos (13%) e periféricos (1%)¹¹. Esta neoplasia é caracterizada por exibir comportamento benigno, mas localmente invasivo com alto risco de recorrência^{5,14}. De acordo com Sandra et al.¹⁷ (2001) esta é uma lesão peculiar porque cada tipo de ameloblastoma mostra níveis variados de atividade proliferativa. Esta variabilidade é também percebida

no comportamento biológico, onde o tipo unicístico exibe taxa de recorrência consideravelmente mais baixa que o tipo sólido ou multicístico⁸.

A maioria dos autores preconiza que sejam utilizadas técnicas conservadoras para o tratamento de ameloblastomas unicísticos e periféricos, enquanto para o tipo sólido ou multicístico deveria ser adotado um tratamento mais radical^{3,4,15}, tendo em vista as taxas de recidiva em torno de 55-90% exibidas por este tipo de ameloblastoma após enucleação ou curetagem¹⁵. A cirurgia radical, por sua vez, leva a sérias complicações, incluindo deformidade facial, disfunção mastigatória e movimento anormal dos maxilares⁹. Desta forma, vem-se buscando soluções alternativas para aumentar a efetividade dos tratamentos conservadores, a fim de se minimizar a utilização de técnicas cirúrgicas radicais. Alguns autores têm observado melhores resultados quando se associa à enucleação ou curetagem a crioterapia¹⁵ ou solução de Carnoy^{2,7}.

Uma técnica cirúrgica que vem sendo utilizada é a marsupialização, que causa um alívio da pressão intratumoral, com conseqüente redução do seu volu-

me, minimizando a extensão da cirurgia definitiva⁹⁻¹⁰. Alguns autores têm obtido tanto sucesso com esta técnica em ceratocistos odontogênicos que preconizam sua utilização como único tratamento¹³. Nakamura et al.⁹ (2001) trataram ameloblastomas unicísticos e multicísticos através da marsupialização, seguida de enucleação ou curetagem e esta técnica se mostrou efetiva ou extremamente efetiva em 74,2% dos casos. Bogaro relatou uma redução de 40 a 60% no tamanho de ameloblastomas submetidos a esta técnica. Este autor preconiza que a descompressão seja seguida de enucleação em ameloblastomas unicísticos e de ressecção em bloco nos casos de ameloblastomas unicísticos murais ou ameloblastomas convencionais.

De acordo com Meer et al.⁸ (2003) a avaliação da proliferação celular tem relevância potencial como um indicador do comportamento tumoral, resposta ao tratamento e recidiva. Dentre os métodos utilizados para detectar atividade proliferativa e agressividade de lesões de diversas naturezas, pode-se citar a identificação imuno-histoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína p53. Meer et al.⁸ (2003), Piatelli et al.¹² (1998) e Sandra et al.¹⁶ (2001) avaliaram a imunexpressão de PCNA para comparar diversos tipos de ameloblastoma com o objetivo de melhor entender a sua diversidade de comportamento. Com igual propósito, Kumamoto et al.⁵ (2004) e Sandra et al.¹⁷ (2002) avaliaram a expressão da proteína p53 nos diferentes padrões histológicos do ameloblastoma. Esta metodologia também foi utilizada para comparar o ameloblastoma com outros tumores¹ e com cistos odontogênicos¹⁸.

No presente trabalho, foram analisados casos de ameloblastomas tratados pela técnica da marsupialização, através da avaliação imuno-histoquímica do PCNA e da proteína p53 em fragmentos das lesões obtidos em dois momentos do tratamento: na cirurgia inicial de descompressão e após a redução radiográfica do tumor. Com este estudo, objetivamos verificar se esta manobra cirúrgica propicia uma diminuição na proliferação celular detectável através dos marcadores pesquisados.

MÉTODOS

Para constituir a amostra deste trabalho foram selecionados oito casos de ameloblastoma fixados em formol a 10%, emblocados em parafina e arquivados no laboratório do Serviço de Anatomia Patológica da disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Estes blocos foram obtidos em duas diferentes etapas do tratamento de quatro casos desta neoplasia, realizadas na Clínica de Cirurgia Bucomaxilar do referido departamento, com a utilização da técnica da marsupialização: cirurgia inicial de descompressão e enucleação da lesão após a sua redução radiográfica. Foram obtidos cortes de 3µm de espessura dos blocos em parafina, os quais foram submetidos ao método da imuno-histoquímica pela técnica da estreptavidina-biotina. Os anticorpos monoclonais primários utilizados, fabricante, clone, diluição, tempo de incubação e recuperação antigênica estão especificados no Quadro 1.

Quadro 1 – Anticorpos monoclonais utilizados no estudo imuno-histoquímico dos ameloblastomas

Anticorpo	Clone	Fonte	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Anti-PCNA	PC-10	Dako A/S Denmark	1:50	Steamer, 30 minutos em ácido cítrico	18 horas (overnight)
Anti-p53	DO-7	Dako A/S Denmark	1:25	Steamer, 30 minutos em ácido cítrico	18 horas (overnight)

Após a realização da parte laboratorial da técnica imuno-histoquímica, os cortes foram observados ao microscópio de luz, sendo examinadas mil células em campos consecutivos para contagem e registro das células positivas para o PCNA e para proteína p53. Esta contagem foi realizada por dois observadores independentes e os valores obtidos foram submetidos à análise estatística para verificar se havia diferença significativa entre os resultados dos dois examinadores. Calculou-

se, então, a média aritmética das duas contagens, que passou a ser o valor definitivo de células imunomarcadas a ser trabalhado. Para ambos os marcadores, procedeu-se o cálculo do índice de positividade para cada caso, através da seguinte fórmula:

$$IP = \frac{n^\circ \text{ de células positivas} \times 100}{1000}$$

É importante enfatizar que o trabalho foi realizado em material de arquivo (fragmentos teciduais emblocados em parafina), não havendo, portanto, qualquer alteração no plano de tratamento destes pacientes em virtude desta pesquisa.

RESULTADOS

Através das fichas de requisição de biópsia foram levantados os dados clínicos e radiográficos de cada caso, e pelos laudos histopatológicos, o padrão morfológico predominante (Quadro 1).

Quadro 1 – Características clínicas, radiográficas e histopatológicas dos casos de ameloblastoma estudados.

Paciente	Sexo	Idade	Localização da lesão	Aspecto radiográfico	Padrão histológico predominante
1	F	71	Ângulo e ramo da mandíbula	Multilocular	Folicular
2	M	20	Ângulo e ramo da mandíbula	Unilocular	Unicístico mural
3	F	23	Região de molares mandibulares	Unilocular	Folicular
4	M	44	Região de molares mandibulares	Multilocular	Folicular e plexiforme

Fonte: Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral / UFRN

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53

Os resultados obtidos separadamente pelos dois observadores com relação a imuno-reatividade à proteína p53, foram analisados estatisticamente através do teste T não pareado, não sendo encontrada diferença significativa entre ambos, com $p=0,6183$. Isto permitiu a utilização da média aritmética das

duas contagens como o número de células positivas em cada caso para o cálculo do índice de positividade (IP). Para os fragmentos obtidos na cirurgia de descompressão, o IP para proteína p53 variou de 0,85 a 5,6, enquanto para os fragmentos removidos após a redução radiográfica do tumor, os valores oscilaram entre 0 e 15,65, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Expressão da proteína p53 em ameloblastomas submetidos à técnica de descompressão, em dois momentos do tratamento.

Fase do tratamento	Paciente			
	1 (IP)	2 (IP)	3 (IP)	4 (IP)
Cirurgia por descompressão	0,85	2,35	1,60	5,60
Enucleação após redução radiográfica	1,65	0	1,00	15,65

Fonte: Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral / UFRN

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO PCNA

As duas contagens independentes da imunopositividade para o PCNA não exibiram diferença significativa, de acordo com o teste T não pareado, com $p=0,1662$. Considerou-se, então, a média aritmética

entre ambas como o número de células marcadas, para o cálculo do índice de positividade (IP) ao referido antígeno. O IP (PCNA) nos ameloblastomas estudados variou de 15,1 a 40,95 na primeira cirurgia, e entre 9,35 e 57,6 na segunda, como pode ser evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2 – Expressão do PCNA em ameloblastomas submetidos à técnica de descompressão, em dois momentos do tratamento

Fase do tratamento	Paciente			
	1 (IP)	2 (IP)	3 (IP)	4 (IP)
Cirurgia por descompressão	15,10	37,15	40,95	35,05
Enucleação após redução radiográfica	32,40	9,35	33,65	57,60

Fonte: Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral / UFRN.

DISCUSSÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico de origem epitelial, constituindo aproximadamente 11% de todos os tumores odontogênicos^{6,20}. Ocorre frequentemente em mandíbula, em cerca de 85% dos casos, especialmente na região posterior^{2,15}. No presente trabalho, todos os casos estudados estavam localizados na área de maior incidência, representada por ângulo, ramo e região de molares da mandíbula.

Em nossa amostra, as idades dos pacientes variaram entre vinte e 71 anos, corroborando com a literatura que atesta uma ampla faixa etária de ocorrência deste tumor^{7,15}.

O ameloblastoma frequentemente mostra grande poder de invasividade local e altas taxas de recorrência, o que exige um tratamento cirúrgico radical, que resulta em sérias conseqüências funcionais, estéticas, psicológicas e sociais para o paciente. Em vista disto, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de detectar indicadores de agressividade desta lesão, que permitissem identificar os casos que pudessem ser tratados através de técnicas mais conservadoras. Assim, o comportamento biológico do ameloblastoma tem sido relacionado ao tipo clínico-radiográfico do tumor, padrão histológico predominante, localização da lesão e idade do paciente, além disso, numerosos marcadores imuno-histoquímicos vem sendo utilizados no seu estudo^{4-6,8,12,16-8}.

Um dos principais parâmetros na escolha do tratamento a ser instituído é o aspecto clínico-radiográfico da lesão. Para ameloblastomas unicísticos dos tipos luminal e intraluminal, a maioria dos autores indica como tratamento de escolha enucleação e curetagem, com ou sem associação com a crioterapia pelo nitrogênio líquido ou solução de Carnoy^{2,7}. Para ameloblastomas unicísticos murais e para os tipos sólido ou multicístico, o tratamento mais utilizado é uma intervenção cirúrgica ampla, que dependendo do tamanho e localização da lesão, pode ser uma

resseção marginal ou segmentar ou ainda uma maxilectomia^{2,15}.

Alguns autores preconizam como um tratamento prévio para ameloblastomas, a técnica cirúrgica da marsupialização, que causa uma redução no tamanho da lesão, minimizando a extensão da cirurgia definitiva^{3,9}. Já Sampson & Pogrel¹⁵ (1999) se mostraram contrários a utilização desta técnica, alegando que este procedimento poderia aumentar a taxa de recorrência. Pogrel & Jordan¹³ (2004) ressaltaram a necessidade de se selecionar criteriosamente o grupo apto a receber este tratamento, pois a técnica da marsupialização requer cooperação e assiduidade do paciente.

Os ameloblastomas estudados neste trabalho foram submetidos à marsupialização como primeira etapa do tratamento destas lesões. Repetindo os achados de Bogard*, todos os tumores pesquisados exibiram, após este procedimento, redução de tamanho, detectável radiograficamente.

Para averiguar se a descompressão do ameloblastoma também é capaz de atenuar o ritmo proliferativo das células tumorais, avaliamos com finalidade de comparação, fragmentos removidos na cirurgia inicial e material coletado após a diminuição da lesão, elegendo os marcadores imuno-histoquímicos PCNA e p53 como metodologia de estudo.

A p53 é uma fosfoproteína envolvida nos processos de crescimento celular, reparo e síntese de DNA, diferenciação celular e apoptose, que por ter vida média curta e estar em pequenas quantidades nas células, não pode ser evidenciada imuno-histoquimicamente em condições de normalidade¹. Mutações no gene codificador da p53 ou estabilização da proteína por alterações em seu metabolismo, pode levar a um acúmulo desta nas células¹⁸, evento este que parece estar relacionado ao aumento de proliferação celular em diversas lesões, inclusive em ameloblastomas⁵.

Sandra et al.¹⁸ (2002, estudando ameloblastomas, encontraram índices de positividade para proteína p53, variando de 1,30% a 14,55%, enquanto Barboza¹

(1999) detectou imunomarcagem em 37,2% das células tumorais, em média. Em nossa amostra, os fragmentos provenientes da primeira biópsia exibiram IP (p53) entre 0,85% e 5,6%. A exemplo do que foi observado para o PCNA, a avaliação dos fragmentos obtidos na segunda etapa do tratamento, revelou decréscimo no índice de positividade ao p53 na metade da amostra e aumento do mesmo na outra metade, apesar da redução do tamanho do ameloblastoma em todos os casos. Além disso, este aumento ocorreu precisamente nas lesões com contagens iniciais mais baixas.

O PCNA é uma das várias proteínas nucleares relacionadas ao ciclo celular, que são maximamente elevadas nas fases G1 tardia e S das células proliferantes⁷. Pesquisas têm demonstrado maior índice de marcação positiva ao PCNA em ameloblastoma que em cistos odontogênicos¹² ou em tumor odontogênico adenomatóide¹. Além disso, ameloblastomas recorrentes exibiram maior expressão para este marcador que os tumores não recorrentes¹².

No presente trabalho, o número médio de positividade ao PCNA na primeira biópsia foi de 32,06%. Dois destes casos exibiram diminuição do índice de marcação após a marsupialização, enquanto os outros dois, ao contrário, mostraram maiores contagens de PCNA. Desta forma, verificamos que, na amostra estudada, o número de células expressando PCNA não foi necessariamente reduzido pela descompressão do tumor, nem tampouco, se relacionou com a redução no tamanho da lesão. Curiosamente, os dois casos que expressaram maiores taxas de positividade ao PCNA na primeira fase, foram aqueles que exibiram um arrefecimento no ritmo de proliferação celular, indicado por diminuição no IP (PCNA).

Notável foi o fato de que estes dois índices, PCNA e P53, se comportaram de modo semelhante e coordenado, ou seja, as lesões que mais expressaram PCNA também exibiram maiores índices para a p53. Os casos que mostraram menor marcação para PCNA, também expressaram menos a proteína p53. Compa-

rando as duas etapas do tratamento, observamos que a redução na imunopositividade das lesões ao PCNA, após a descompressão, esteve sempre associada a diminuição da marcação da p53. Quando a expressão da p53 aumentou, também a marcação para o PCNA foi intensificada.

Analisando estes marcadores com relação ao aspecto radiográfico do ameloblastoma, evidenciamos que os dois ameloblastomas uniloculares da amostra tornaram-se menos proliferativos após a descompressão, enquanto nas lesões multiloculares ocorreu o inverso. Este resultado pode ser devido a maior agressividade das lesões multiloculares, atestada na literatura³⁻⁴.

Apesar do tamanho da amostra não permitir conclusões definitivas, acreditamos que os resultados similares exibidos pelos dois marcadores pesquisados indicaram que a atividade proliferativa do ameloblastoma nem sempre pode ser alterada pela diminuição da pressão interna do tumor, obtida pela técnica da marsupialização, e que a redução no tamanho da lesão não parece ser indicativa de arrefecimento da capacidade proliferativa das células tumorais.

Finalmente, considerando-se que os índices de proliferação celular podem ser utilizados para prever o comportamento biológico do ameloblastoma¹⁹, talvez a avaliação do aumento ou redução da expressividade de marcadores como PCNA e p53 possa fornecer indícios sobre tendência a recidiva de determinada lesão e, conseqüentemente, sobre a possibilidade de sucesso ao tratamento instituído. Estas respostas, entretanto, exigem a realização de novas pesquisas.

CONCLUSÕES

Na amostra estudada, a utilização da técnica cirúrgica da marsupialização como tratamento inicial de ameloblastomas, não causou necessariamente redução da capacidade proliferativa das células tumorais, avaliada através da imuno-reatividade ao PCNA e à proteína p53.

ABSTRACT

BACKGROUND: The purpose of this study was to analyze the cellular proliferation of ameloblastomas before and after the marsupialization. **METHODS:** four cases of ameloblastomas treated by marsupialization were examined immunohistochemically for expression of PCNA and p53 protein, in two moments of the treatment: before and after this chirurgical procedure. **RESULTS:** We observed that immunohistochemical reactivity of PCNA and p53 protein decreased after marsupialization in two cases and increased in two of the studied lesions. **CONCLUSIONS:** The marsupialization of ameloblastomas is not always related with the reduction of cellular activity.

UNITERMS

Ameloblastoma; marsupialization, Proliferating cell nuclear antigen; protein p53, cell.

REFERÊNCIAS

- Barboza CAG. Expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína p53 no ameloblastoma e no tumor odontogênico adenomatóide. [dissertação] – Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Odontologia; 1999.
- Chapelle KAOM, Stoelinga PJW, Wilde PCM, Brouns JJA, Voorsmit RACA. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. *Brtt J Oral Maxillofac Surg.* 2004. Available online at www.sciencedirect.com.
- Gomes ACA, Dias E, Gomes DO, Paraíso DP, Nascimento GJF, Cabral RAA. Ameloblastoma: tratamento cirúrgico conservador ou radical? *Rev Cir Traumat Buco-Maxilo-Facial.* 2002; 2: 17-24.
- Kim SG, Jang HS. Ameloblastoma: a clinical, radiographic and histopathologic analysis of 71 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 649-53.
- Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14ARF proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33: 292-9.
- Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical. Detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 114-20.
- Lee PK, Saman N. Unicystic ameloblastoma – use of Carnoy’s solution after enucleation *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33: 263-7.
- Meer S, Galpin JS, Altini M, Coleman H, Ali H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 213-21.
- Nakamura N, Higuchi Y, Mitsuyasu T, Sandra F, Ohishi, M. Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 13-20.
- Nakamura N, Mitsuyasu T, Mitsuyasu Y, Taketomi T, Higuchi Y, Ohishi M. Marsupialization for odontogenic keratocysts: Long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 543-56.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral & maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 565-616.
- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncology.* 1998; 34: 408-12.
- Pogrel MA, Jordan RCK. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62: 651-5.
- Rosenstein T, Pogrel MA, Smith RA, Regezi JA. Cystic Ameloblastoma-behavior and treatment of 21 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59: 1311-6.
- Sampson DE, Pogrel MA. Management of mandibular ameloblastomas: The clinical basis for a treatment algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 57: 1074-7.
- Sandra F, Mitsuyasu T, Nakamura N, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki67 in ameloblastoma. *Oral Oncology.* 2001; 37: 193-8.
- Sandra F, Nakamura N, Kanematsu T, Hirata N, Ohishi M. The role of MDM2 in the proliferative activity of ameloblastoma. *Oral Oncology.* 2002; 38: 153-7.
- Slootweg PJ. p53 protein and Ki67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24: 393-7.
- Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsirivet S. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Diseases.* 2004; 10: 22-6.
- Zwahlen RA, Gratz KW. Maxillary ameloblastomas: a review of the literature and of a 15-year database. *J Cranio-Maxillofac Surg.* 2002; 30: 273-9.

Recebido em: 22/06/05

Aprovado em: 15/09/05

Profa. Dra. Lélia Batista de Souza
Av. Salgado Filho, 1787 – Bairro Lagoa Nova
59056-000 – Natal – RN
Tel. (84) 3215-4132 Fax. (84) 3215-4101
leliasouza@dod.ufrn.br