

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE
FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) EM FOLÍCULOS
PERICORONÁRIOS**

Cristina da Silva Baumgart

PORTO ALEGRE
DEZEMBRO DE 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Linha de Pesquisa: Cistos e Tumores Odontogênicos

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) EM FOLÍCULOS
PERICORONÁRIOS**

Cristina da Silva Baumgart

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE DOS REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ODONTOLOGIA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
PATOLOGIA BUCAL

Orientador:

Prof. Dr. Onofre Francisco de Quadros

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B348a Baumgart, Cristina da Silva
Análise da expressão de receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) em folículos pericoronários / Cristina da Silva Baumgart; Orientação de Onofre Francisco de Quadros. – Porto Alegre, 2003.
127 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Patologia Bucal.

1. Receptor de fator de crescimento epidérmico 2. EGFR 3. Folículo pericoronário 4. Cistos odontogênicos 5. Tumores odontogênicos
I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia
II. Título

CDU 616.31

“ A prova mais clara da sabedoria
é a alegria contínua.”

Montaigne

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação e meu empenho a uma pessoa que custei a entender;
mas, sempre respeitei e admirei.
Àquele que, além de Mestre, sabe ser Amigo
sem fazer da vida um jogo, procurando tirar vantagem de tudo.

Aprendi muito contigo, Bagé... Muito além dos “*books*.”

Conheci o professor,

Descobri o Mestre e

Hoje tenho um AMIGO.

A ti, Meu Orientador, dedico este trabalho

Este trabalho teve como
idealizador o Prof. Dr.
Manoel Sant'Ana Filho

“ A cooperação
é a convicção plena
de que ninguém pode chegar a meta
se todos não chegam junto.”
Virginia Burden

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **minha família** pelo incondicional apoio. Amo Vocês.

Em especial, ao meu orientador, **Prof. Dr. Onofre Francisco de Quadros**. Que cada página deste trabalho represente a gratidão que tenho por ti, pelo apoio, confiança e compreensão a mim dedicados.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pela minha formação profissional e por possibilitar a continuidade da mesma.

À **CAPES** por acreditar na formação acadêmica em nosso país.

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho** pelo profissional e Mestre que és e pela admirável dedicação à pesquisa. Agradeço as muitas “horas de ciência” juntos e o acréscimo de conhecimento que me proporcionaste.

À **Isabel da Silva Lauxen**. Isa, obrigada por tudo. Pelo apoio, carinho e dedicação, pela confiança, pela torcida; enfim, por tua amizade. Esse trabalho é nosso.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Patologia Bucal, **Profs. Drs. João Jorge Diniz Barbachan, Onofre Francisco de Quadros, Pantelis Varvaki Rados e Manoel Sant'Ana Filho**, pelo amor e dedicação à Patologia e pela oportunidade.

Ao **Dep. de Cirurgia** desta faculdade, na pessoa da **Profa. Dra. Edela Puricelli**, pela disposição na obtenção da amostra. Em especial à **Profa. Dra. Deise Ponzoni** pela cooperação, dedicação e cuidado. Obrigada.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Odontologia pelos conhecimentos ministrados. Em especial aos **Profs. Drs. Cassiano Rosing, Heloísa da Silveira e José Artur Chies**, exemplos a serem seguidos.

À **Profa. Dra. Anna Christina Fossati** pela oportunidade do convívio, pelo apoio e incentivo. És uma pessoa admirável.

A todos os colegas de mestrado. Em especial à turma da Patologia, **Ricardo Paiva, Vinicius Carrard, Cristiano Badauy, Cristiane Danesi e Paula Bohrer**.

Aos colegas **Cristiano Badauy e Alex Hass** pelos ensinamentos de estatística.

À doutoranda e amiga **Márcia Gaiger Oliveira**. Obrigada pela ajuda, pelo companheirismo e credibilidade.

À **Bianca Barbieri**, pela amizade e colaboração na realização da técnica.

À **“Dona Marina”**. O que seria de nós sem a presteza com que nos trata. Obrigada pelos cafezinhos e pelo bom humor constante. A Sra. é uma pessoa iluminada.

A minhas AMIGAS **Eliser Gonzalez Silva e Patricia Siemionko Alminhana** pela amizade verdadeira, pelo apoio e companheirismo.

Ao meu colega de consultório **C.D. Rafael Vicari** pela compreensão e apoio.

Aos meus pacientes, por entenderem estes dois anos de ausência.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pela idéia do trabalho e pela paciência durante estes anos.

Há pessoas que marcam nossa vida... és uma delas.

Guardo uma profunda admiração e respeito por ti e invejo tua inteligência e capacidade criativa.

Agradeço, com carinho, toda a tua atenção.

Obrigada.

“ Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.”
Fernando Pessoa

AGRADECIMENTO ESPECIAL

**“Tenho a impressão de ter sido
apenas uma criança a brincar na praia
e a encontrar, de vez em quando,
uma pedrinha ou pequenina concha mais linda,
Enquanto o imenso oceano da verdade inexplorado,
se estendia na minha frente.”**

Newton

“ Se tivesse mais tempo,
escreveria uma carta mais curta.”

Blaise Pascal

RESUMO

RESUMO

Proposição: Avaliar a expressão de Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) nos remanescentes do epitélio odontogênico em folículos pericoronários e em amostras de mucosa bucal normal e sua relação com a gênese de cistos e tumores odontogênicos. **Materiais e Métodos:** 20 folículos pericoronários de terceiros molares inferiores, completamente retidos, de pacientes com idade média de 18 anos e 16 amostras de mucosa bucal destes pacientes foram selecionadas e analisadas pelo método da imunohistoquímica com mAb anti-EGFR. Nos folículos pericoronários, os campos que apresentaram remanescentes do epitélio odontogênico em forma de ilhas ou epitélio reduzido do órgão do esmalte foram capturados e analisados qualitativamente quanto à distribuição da localização do receptor e, comparados à mucosa bucal normal. Foram utilizados, para comparação, os testes não paramétricos de Friedman e Kruskal- Wallis ($p < 0,05$). **Resultados:** As mucosas bucais apresentaram 100% de marcação de membrana e citoplasma nas camadas proliferativas. Nos folículos pericoronários, os campos de epitélio reduzido do órgão do esmalte apresentaram 63,3% de marcação concomitante de membrana e citoplasma e 36,7% de marcação citoplasmática. Nas ilhas dos remanescentes epiteliais da odontogênese a distribuição se deu 52% na porção citoplasmática das células, 47,3% na membrana e citoplasma e 0,7% das ilhas apresentaram marcação de membrana. **Conclusões:** A expressão de EGFR, observada na membrana e no citoplasma das células epiteliais das camadas proliferativas de todas as mucosas bucais normais, pode ser considerada como padrão fisiológico. Todas as células remanescentes epiteliais da odontogênese apresentaram imunoreatividade para o mAb anti-EGFR, havendo variações na expressão do EGFR, podendo estas diferenças estar relacionadas ao desenvolvimento de cistos e tumores odontogênicos. A distribuição da localização celular da expressão do EGFR é importante na análise da imunoreação; pois, representam diferentes estados de responsividade celular.

PALAVRAS- CHAVE:

Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico; EGFR; Folículo Pericoronário; Cistos e Tumores Odontogênicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Proposition: To evaluate the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression in the pericoronary follicle and in normal oral mucosa and its relationship in genesis of Cysts and Odontogenic Tumours. **Materials and Methods:** Twenty pericoronary follicles of impacted third inferior molars and 16 samples of normal oral mucosa were selected of patients with mean age of 18 years. The pericoronary follicles and normal oral mucosa samples were analyzed by the immunohistochemistry method with mAb anti-EGFR. All the fields of the pericoronary follicles with rests of the odontogenic epithelium like islands or reduced epithelium of the enamel organ were captured and analyzed. It was considered the distribution of the receptor location that was compared to the normal oral mucosa. Friedman and Kruskal - Wallis tests were used for statistical analyses, at a 5% significance level. **Results:** The normal oral mucosa showed 100% of membrane and cytoplasm staining in the proliferatives layers . In the pericoronary follicles, the fields with reduced epithelium of the enamel organ showed 63,3% of both membrane and cytoplasm staining and 36,7% of citoplasmatic staining. In the islands of the epithelial rests of the odontogenese, the distribution of the receptor location in the cells was 52% in the cytoplasm, 47,3% in both membrane and cytoplasm and 0,7% only in membrane. **Conclusions:** The anti-EGFR expression in the membrane and cytoplasm of the epithelial cells of the proliferative layers of normal oral mucosa suggests a physiologic pattern. All odontogenic epithelial rests showed immunohistochemistry detection of mAb anti-EGFR. The EGFR expression differed in the odontogenic epithelial rests. The EGFR expression difference can be related to the development of cysts and odontogenic tumors. The distribution of cellular location of the EGFR expression is important in the immunohistochemistry analysis, because suggests different degree of cellular excitability.

KEYWORDS

Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR; Pericoronary Follicle; Odontogenic Cysts and Tumours

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** CARCINOMA ESPINOCELULAR - **A:** Células epiteliais neoplásicas. Marcação de membrana com mAb anti-EGFR. **B:** Tecido conjuntivo fibroso (100X).....69
- FIGURA 2** CARCINOMA ESPINOCELULAR – **A:** Núcleo da célula epitelial neoplásica, azulado pela contracoloração. **Seta:** Marcação de membrana com mAb anti-EGFR. (400X).....69
- FIGURA 3** MUCOSA BUCAL – **A:** Epitélio estratificado, evidencia-se maior intensidade de marcação com mAb anti-EGFR nas camadas proliferativas (**seta**). **B:** Tecido conjuntivo fibroso (100X).....69
- FIGURA 4** MUCOSA BUCAL – **A:** Epitélio estratificado. **B:** Tecido conjuntivo fibroso. **Seta Preta:** Marcação de membrana e citoplasma do mAb anti-EGFR na camada parabasal. **Seta Branca:** Marcação de membrana e citoplasma do mAb anti-EGFR na camada basal (400X).....69
- FIGURA 5** FOLÍCULO PERICORONÁRIO – **A:** Tecido conjuntivo fibroso. **Setas:** Remanescentes do epitélio odontogênico em forma de ilhas. Nota-se a especificidade do mAb anti-EGFR pelas células epiteliais (100X).....70
- FIGURA 6** FOLÍCULO PERICORONÁRIO – **A:** Tecido conjuntivo fibroso. **B:** Remanescente do epitélio odontogênico em forma de ilha. **Seta:** Marcação de membrana e citoplasma do mAb anti-EGFR (400X).....70
- FIGURA 7** FOLÍCULO PERICORONÁRIO – **A:** Tecido conjuntivo fibroso. **B:** Remanescente do epitélio odontogênico em forma de ilha. **Seta:** Marcação de citoplasma do mAb anti-EGFR (400X).....70

FIGURA 8	FOLÍCULO PERICORONÁRIO – A: Tecido conjuntivo fibroso. B: Remanescente do epitélio odontogênico em forma de ilha. Seta: Marcação de membrana do mAb anti-EGFR (400X).....	70
FIGURA 9	FOLÍCULO PERICORONÁRIO – A: Epitélio reduzido do órgão do esmalte com evidente marcação com mAb anti-EGFR. B: Tecido conjuntivo fibroso (100X).....	71
FIGURA 10	FOLÍCULO PERICORONÁRIO – A: Epitélio reduzido do órgão do esmalte. Seta: Marcação de membrana e citoplasma. B: Tecido conjuntivo fibroso (400X).....	71
FIGURA 11	FOLÍCULO PERICORONÁRIO – A: Epitélio reduzido do órgão do esmalte. Seta: Marcação de citoplasma. B: Tecido conjuntivo fibroso (400X).....	71

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

LISTA DE GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

GRÁFICO 1	Distribuição da expressão de anti-EGFR quanto à localização por grupo.....64
GRÁFICO 2	Distribuição da localização da expressão de anti-EGFR no epitélio reduzido do órgão do esmalte nos folículos pericoronários.....65
GRÁFICO 3	Distribuição da localização da expressão de anti-EGFR nas ilhas de células epiteliais remanescentes nos folículos pericoronários.....66
TABELA 1	Distribuição em números absolutos e porcentagem da distribuição da marcação por anti-EGFR. Avaliação intra e inter-grupos e seu respectivo grau de significância.....67
QUADRO 1	Características dos pacientes.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Expressa um valor em percentual
µm	Micrômetros
°C	Graus Centígrados (Celsius)
ABC	Complexo Avidina-Biotina
AgNO_r	Região Organizadora Nucleolar marcadas por Prata
AMP	<i>Adenosine MonoPhosphate</i>
Ca⁺²	Íon Cálcio
c-erb-1	Gen codificador da proteína erb-1
DAB	Di-amino Benzidina Tetrahydroclorideo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Di-amino Tetracético
EGF/h EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR/ ErbB-1	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
et al.	<i>et alli</i> (e colaboradores)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGF-1	<i>Fibroblast Growth Factor - 1</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor - 2</i>
FGFR-1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor - 1</i>
FO	Faculdade de Odontologia
HCL	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina- Eosina
HER – 2/ ErbB-2	<i>Human Epidermal Receptor -2</i>
HER – 3/ ErbB-3	<i>Human Epidermal Receptor -3</i>

HER – 4/ ErbB-4 <i>Human Epidermal Receptor -4</i>
JPEG <i>Joint Photographic Experts Group</i>
KdaKilodalton
Ki 67 <i>Protein 67 KDa</i>
Ltd.Limitada
mAbAnticorpo Monoclonal
MAP <i>Mitogen-activated Protein</i>
MAPKs <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
Mem./cito <i>Membrana e Citoplasma</i>
MMP₃ <i>Matrix Metalloproteinase 3</i>
NNormal
n.Número
n^oNúmero
NaSódio
pValor da probabilidade estatística
p.Página
p-53 <i>Protein 53 KDa</i>
PBS <i>Fosphate Buffered Saline</i>
PCNAAntígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
pH <i>Hydrogen-ion Concentration</i>
POAPorto Alegre
RAM <i>Random Access Memory</i>

RasFamília de Proteínas Relacionadas à Sinalização Intracelular
RNA_mAcido Ribonucleico Mensageiro
RSRio Grande do Sul
TGF-α <i>Transforming Growth Factor alpha</i>
UFRGSUniversidade Federal do Rio Grande do Sul
VGF <i>Viral Growth Factor</i>
XVezes

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
1. REVISÃO DE LITERATURA	30
2. PROPOSIÇÃO	51
2.1 OBJETIVO GERAL	52
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 DELINEAMENTO	54
3.2 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E SELAÇÃO DA AMOSTRA	54
3.3 CARACTERÍSTICAS DA TÉCNICA	56
3.4 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA	56
3.5 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	57
3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	60
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4. RESULTADOS	62
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	82
REFERENCIAS	84
ANEXOS	100
ANEXO 1	Técnica imunohistoquímica.....101
ANEXO 2	Planilha de captura e tabulação de dados (Folículos).....105
ANEXO 3	Planilha de captura e tabulação de dados (Mucosas).....106
ANEXO 4	Calibração intra-examinador inicial.....107

ANEXO 5	Calibração inter-examinadores inicial.....	108
ANEXO 6	Calibração intra-examinador durante levantamento de dados.....	109
ANEXO 7	Calibração inter-examinadores final.....	110
ANEXO 8	Parecer ético.....	111
ANEXO 9	Termo de consentimento informado.....	112
ANEXO 10	Análise estatística.....	114
ANEXO 11	Tabela de dados.....	123
ANEXO 12	Características amostrais	125

“ Surpreender- nos por algo
é o primeiro passo da mente
até o descobrimento.”

Louis Pasteur

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O folículo pericoronário é uma cobertura orgânica formada por tecido conjuntivo fibroso e remanescentes do epitélio odontogênico em forma de ilhas ou cordões, além do epitélio reduzido do órgão do esmalte. Esta estrutura permanece sobre a coroa dentária até a erupção dos dentes.

Os remanescentes epiteliais da odontogênese têm relação direta com a formação de cistos e tumores de origem odontogênica. A eventual proliferação destes restos epiteliais pode resultar na formação de patologias como o Cisto Dentífero, Ceratocisto e Ameloblastomas.

Em pacientes que apresentam dentes inclusos, o folículo pericoronário é mantido por mais tempo, isso ocorre, na maioria das vezes, em terceiros molares. Apesar da permanência dos remanescentes do epitélio odontogênico sobre a coroa destes dentes, a minoria dos pacientes desenvolverão cistos ou tumores.

A proliferação das células epiteliais tem sido relacionada à presença de fatores de crescimento como o EGF e o TGF- α . Proteínas presentes na matriz, estes fatores só são capazes de ativar uma célula quiescente na presença do receptor específico, o Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR).

A ativação do EGFR promove o desencadeamento de uma cascata de fosforilação de proteínas, que permite que a sinalização recebida seja transduzida e

transmitida até o núcleo, resultando na proliferação celular. Mais recentemente, a expressão de receptores de fator de crescimento tem sido verificada e associada a várias neoplasias de origem epitelial.

Com base nestas informações, o objetivo deste estudo é avaliar a expressão de Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) nos remanescentes epiteliais de Folículos Pericoronários comparados a amostras de mucosa bucal normal, verificar sua distribuição e relacionar a possível formação de cistos e tumores odontogênicos.

“ Se vi mais longe do que outros,
é porque estava apoiado
nos ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO DE LITERATURA

O processo fisiológico da odontogênese resulta na permanência de uma cobertura orgânica pericoronária (fóliculo pericoronário) sobre a superfície do esmalte até a erupção do dente na cavidade bucal (BRITO, 1998; Mc DONALD, AVERY, 2001).

Os fóliculos pericoronários representam a estruturação final dos remanescentes celulares participantes da formação do esmalte: epitélio reduzido do órgão do esmalte, periféricamente localizado em relação à coroa dentária, membrana de tecido conjuntivo fibroso, que o suporta e nutre, e remanescentes da lâmina dentária em forma de cordões e ilhas epiteliais (SMALL, 1955; EISENMAN, 1988; KRAMER et al., 1992; KIN, ELLIS, 1993; RAKPRASITKUL, 2001).

Quando a formação da coroa dentária ocorre, o número de ameloblastos diminui e contata o estrato intermediário e o epitélio externo do órgão do esmalte, os quais se fusionam para formar o epitélio reduzido do órgão do esmalte (Mc DONALD, AVERY, 2001).

Os fóliculos pericoronários têm papel central no processo de erupção dentária (MARKS, CAHILL, 1984; WISE, MARKS, CAHILL, 1985; WISE et al., 2002) influenciando, se não, coordenando o processo (CAHILL, MARKS JR., 1980; PAIVA, CIAMPONI, 1998).

Nos dentes que não erupcionaram, principalmente terceiros molares (LICHT, 1977; SHAFER, HINE, LEVY, 1987; ZANINI, 1990; GRAZIANI, 1995), os folículos pericoronários permanecem por um período maior de tempo. Estes, segundo alguns autores, apresentam altos índices de degenerações císticas no órgão do esmalte (EBLING et al., 1977; MATTOU, RACHLIN, 1978; SHEAR, 1994; BRITO, 1998), podendo, a partir destas degenerações, desenvolverem uma neoplasia (STANLEY, DIEHL, 1965; ANGEPOULOS et al., 1966; STOELINGA, 1976; LICHT, 1977; GÜVEN, KESKIN, AKAL, 2000).

Os remanescentes epiteliais da odontogênese, presentes nos folículos pericoronários; variam em quantidade, dependendo da localização anatômica (DIAZ, ALFONSO, ALONSO, 1986) e do tempo de retenção (STANLEY et al., 1965; CONSOLARO, 1987; MORESCO, 1997). Apesar disso, mantêm-se capazes de, quando estimulados, proliferar (YAMASAKI, PINERO, 1989; HOU et al., 1999) podendo dar origem a cistos e tumores odontogênicos.

Malassez (1885) é descrito na literatura como o primeiro autor a estudar e relacionar o papel dos remanescentes do epitélio odontogênico, presentes no folículo pericoronário, na etiopatogenia dos cistos e tumores odontogênicos.

A participação dos restos epiteliais na gênese de neoplasmas (STANLEY et al., 1965; LUCAS, 1984; HOLMLUND et al., 1991; GÜVEN, KESKIN, AKAL, 2000) ocorre, porque estas células conservam em latência toda sua potencialidade tecidual, sendo capazes de originar tumores frente a fatores desconhecidos, geralmente em presença de inflamação crônica (CONKLIN, STAFNE, 1949; ANGEPOULOS et al., 1966; BRADY et al., 1970; NICKOLAYCHUK et al., 2002); passando a uma atividade proliferativa semelhante a que apresentavam na época de formação da lâmina dentária e do órgão do

esmalte (STOELINGA, 1976; EBLING et al., 1977; MJÖR, FEJERSKOV, 1990; SHEAR, 1994; HAMAMOTO et al., 1998).

Barbachan (1991) relata que o terceiro molar mandibular é o dente mais freqüentemente envolvido na formação de Cistos Dentígeros (RAKPRASITKUL, 2001). Laskin (1971) cita que há registros de Ameloblastomas e de Carcinomas originados das paredes destes cistos. A faixa etária de maior ocorrência dos Cistos Dentígeros e do Ameloblastoma encontra-se entre os 20 e 30 anos (EBLING et al., 1977), não apresentando diferença na incidência quanto ao sexo e a raça (SMALL, 1955; STANLEY, DIEHL, 1965).

Ebling et al. (1977) e Hamamoto et al. (1998), induziram experimentalmente a formação de tumores odontogênicos a partir dos restos epiteliais de Malassez, sob o efeito de substâncias carcinógenas, comprovando a capacidade de tais remanescentes se diferenciarem quando estimulados. A partir da estimulação, os remanescentes, apresentaram potencial na formação de ductos, estruturas do órgão do esmalte, deposição de material eosinofílico e presença de metaplasia escamosa.

Estudando histologicamente 150 membranas pericoronárias de terceiros molares não irrompidos, Barroso et al. (1985) verificaram maiores alterações inflamatórias em folículos de indivíduos concentrados na segunda e terceira décadas de vida (82%) e que tais alterações aumentam com o passar do tempo. Relataram também a diminuição da membrana pericoronária normal à medida que a idade aumenta.

Shafer, Hine e Levy (1987) relatam que os cistos e tumores odontogênicos são derivados dos tecidos odontogênicos e constituem um grupo de lesões extremamente variado. Isto reflete o desenvolvimento complexo das estruturas dentárias, uma vez que tais lesões são derivadas do epitélio associado ao desenvolvimento do órgão dentário, ou seja, de uma das seguintes fontes: epitélio reduzido do órgão do esmalte, restos epiteliais de

Malassez, remanescentes da lâmina dentária ou da camada basal do epitélio bucal (GRUPE, TEN CATE, ZANDER, 1967; BRADY et al., 1970; TEN CATE, 1972; YAMASAKI, PINERO, 1989; NICKOLAYCHUK et al., 2002).

Para que se compreenda melhor o processo fisiológico e a participação da odontogênese em situações patológicas como cistos e tumores, tem se estudado a diferenciação e a proliferação celular, o envolvimento genético, os produtos secretados e os componentes da matriz extracelular durante as fases que a compõem. (MAIN, 1970; ARAÚJO, ARAÚJO, 1984; BIDWELL et al., 1995; WALDRON, 1995; BRITO, 1998; TOMMASI et al., 2000; WISE et al. 2002).

Interações entre o epitélio e o conjuntivo adjacente estão envolvidas na regulação do crescimento e da diferenciação celular durante o desenvolvimento normal do dente (CAHILL, MARKS, 1980; THOMAS, KOLLAR, 1989; WISE, LIN, ZHAO, 1995; COLETTA et al., 1997; THESLEFF, ABERG, 1999; PETERS, BALLING, 1999) e na gênese de cistos e tumores odontogênicos (HEIKINHEIMO et al., 1991; NICKOLAYCHUK et al., 2002).

Os complexos comportamentos celulares, como a homeostase ou a proliferação, são geralmente estimulados por combinações específicas de sinais e não por um único sinal atuando sozinho. A célula deve integrar a informação proveniente de sinais a fim de construir uma resposta apropriada – viver ou morrer, proliferar ou permanecer em repouso. As células respondem seletivamente aos estímulos que chegam até elas, esta especificidade é adquirida através da especialização celular progressiva durante o desenvolvimento. Sendo assim, uma célula pode ser programada a responder a um grupo de sinais através da diferenciação, a outro grupo através da proliferação, a outro exercendo uma função especializada ou à morte programada (Apoptose) quando não estiver recebendo a sinalização de que necessita para a sobrevivência (ALBERTS et al., 1997).

A biologia molecular incluída na bioquímica, na citologia ultraestrutural, na fisiologia e na genética, nos fornece instrumentos para estudar os sinais envolvidos em situações biológicas normais e patológicas da cavidade bucal (GAO et al., 1989; COLETTA et al., 1997; PAIVA, CIAMPONI, 1998; PETERS, BALLING, 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000). Buscando entender os processos moleculares relacionados com o metabolismo, desenvolvimento e proliferação tecidual, obtém-se conhecimentos mais detalhados da etiopatogenia de tais tumores.

As técnicas de imunohistoquímica, utilizadas no estudo da biologia celular, se baseiam na marcação de estruturas pela ação de anticorpos específicos, permitindo a identificação de componentes protéicos de células ou tecidos, representando um valioso método auxiliar no diagnóstico em histopatologia, permitindo uma melhor caracterização das células, agentes infecciosos e outras moléculas em relação à histoquímica convencional (TRUE, 1990).

Estudos imunohistoquímicos com PCNA, Ki-67, p-53, FGF-1, FGF-2 e histoquímicos com AgNOR foram utilizados para analisar e comprovar a capacidade proliferativa do epitélio em cistos e tumores odontogênicos (T-J LI, BROWNE, MATTHEWS, 1994; SLOOTWEG, 1995; MUNERATO et al., 2000; DE PAULA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; SO et al., 2001).

A proliferação e o desenvolvimento celular, na grande maioria das vezes, ocorre quando um sinal chega até a célula e encontra um receptor específico em sua membrana, que permite a tradução e transdução deste sinal para o interior do citoplasma, resultando em alterações nucleares (gênicas) ou comportamentais da célula. Receptores são, na maioria das vezes, proteínas transmembrana da superfície da célula alvo. O modo como cada célula responde ao seu ambiente externo varia, dependendo do grupo de proteínas receptoras e de toda a maquinaria celular que deve responder a este sinal. Cada

tipo celular tem grupos característicos de proteínas alvo, o que permite à célula efetuar respostas próprias aos mediadores intracelulares, que podem ativar cascatas sinalizadoras e potencializar estes sinais recebidos (ALBERTS et al., 1997).

Várias das substâncias identificáveis, implicadas no processo de proliferação e crescimento celular normal, estão também relacionadas à gênese de cistos (GAO et al., 1989; SO et al., 2001; NICKOLAYCHUK et al., 2002) e neoplasias humanas (IBRAHIM et al., 1999; O-CHAROENRAT et al., 2002^b), entre elas os fatores de crescimento (COHEN, 1965; WAKULICH et al., 2002) e seus receptores (GREEN et al., 1983; TUCCI et al., 1998; SRIVASTAVA et al., 2001; O-CHAROENRAT et al., 2002^a; JORISSEN et al., 2003).

Em geral, ligações entre sinalizadores extra-celulares (mitógenos, hormônios, citocinas, neurotransmissores e fatores de crescimento) e os seus receptores de membrana ativam uma série de reações dentro da célula como a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso, mudanças na concentração de AMP cíclico, metabolismo de lipídios e fosforilação de proteínas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000). Ativadores mitogênicos proteinoquinases, capazes de ativar as proteínas a partir da adição de grupamentos fosfato, desencadeiam cascatas sinalizadoras intracelulares (MAP quinases) (SEAMAN, BURD, EMR, 1996; JOSEPH et al., 2001; BRUGGEMAN et al., 2002; NICKOLAYCHUK et al., 2002) que amplificam os sinais e estimulam células quiescentes a entrarem no ciclo celular (RAFFERTY, FENTON, JONES, 2001).

As MAP quinases (MAPKs) são responsáveis pela manutenção da homeostase das células em condições normais. Uma vez interrompido este equilíbrio, devido a instabilidade genética, que usualmente ocorre nas células tumorais, o balanço entre a proliferação e a morte celular é mudado. Como resultado as células perdem sua função normal (MISHIMA, INOUE, HAYASHI, 2002).

Os fatores de crescimento regulam a proliferação celular através de uma rede complexa de cascatas bioquímicas que, induz a transcrição gênica pela ativação de cascatas de fosforilação. São conhecidas diversas proteínas que atuam como fatores de crescimento, liberadas por vários tipos celulares (ALBERTS et al., 1997; MURRAY et al., 1999). Para cada tipo de fator de crescimento há um receptor específico (RAFFERTY, FENTON, JONES, 2001), o qual algumas células expressam em sua superfície e outras não.

Dentre os fatores de crescimento relacionados com a proliferação, crescimento e diferenciação das células epiteliais, os melhores caracterizados e mais estudados são o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e o Fator de Crescimento Transformador α (TGF- α). Segundo Balaram et al. (2001), tanto um, quanto o outro, são capazes de alterar a progressão tumoral na presença do receptor específico.

O EGF e o TGF- α pertencem a uma família de quatro proteínas: EGF, TGF- α , anfíregulina e EGF-*heparin-binding* que têm estruturas semelhantes, ligam-se aos mesmos receptores e possuem efeitos similares (GORLA Jr. et al., 2001; SHIMIZU et al., 2001; SRIVASTAVA et al., 2001). Uma quinta proteína, o Fator de Crescimento Viral (VGF) também é citada por Rusch, Mendelsohn e Dmitrovsky (1996) como membro desta família.

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF/ hEGF) é um polipeptídeo de 53 aminoácidos com 6045 Daltons, isolado pela primeira vez por Cohen em 1962 (STEIDLER, READE, 1980; KRONMILLER, UPHOLT, KOLLAR, 1992; COIMBRA, 1997) em glândulas salivares de ratos. Denominado também de urogastrona (CARPENTER e COHEN, 1979), é encontrado em vários tecidos e exerce uma ampla variedade de efeitos biológicos, incluindo a indução da diferenciação e proliferação de células epiteliais e mesenquimais (STEIDLER, READE, 1980; ALBERTS et al., 1997; GORLA Jr. et al., 2001; IWASE et al., 2002). Além disso, tem um importante papel no

desenvolvimento embrionário, na manutenção da integridade, reparação e cicatrização tecidual (WANG et al., 1990; NORDLUND et al., 1991; NEXO, JORGENSEN, HANSEN, 1992; ÉGÉA et al., 2002) e também na carcinogênese (BOONSTRA et al., 1995).

Cohen em 1965 constatou um marcado aumento da proliferação e ceratinização das células epiteliais em cultura de tecidos quando em presença do EGF (COIMBRA, 1997).

Em 1980, Steidler e Reade estudaram os efeitos histomorfológicos do Fator de Crescimento Epidérmico em pele e mucosa bucal de ratos recém-nascidos. Foi injetado EGF, em dosagens crescentes, durante 14 dias. Dos resultados observados, ressalta-se o pouco ganho de peso e de pelo dos ratos do grupo em que foi administrado o EGF, a erupção e a separação prematura dos dentes e a maior ceratinização do epitélio e da mucosa quando comparados ao grupo controle.

Kronmiller, Upholt e Kollar (1991) analisaram a expressão do RNAm do EGF no desenvolvimento do processo mandibular de ratos pela técnica do PCR (*polymerase chain reaction*) e constataram sua presença tanto no epitélio quanto nas células mesenquimais sugerindo que a possível ação do EGF na proliferação epitelial seja resultante de um mecanismo parácrino ou autócrino (REYNOLDS, LAVER, MOJTAHEDI, 2001), sendo que o fator presente no mesênquima atuaria de forma parácrina, na presença do receptor.

O Fator de Crescimento Transformador α (TGF- α), em sua forma ativa, é um polipeptídeo com 50 aminoácidos produzido pela clivagem proteolítica de um componente extracelular na sua forma precursora (pro-TGF- α), que inclui um domínio transmembrana (RUSCH, MENDELSON, DMITROVSKY, 1996), apresenta seqüências homólogas ao EGF e se liga ao mesmo receptor de superfície celular. O TGF- α , presente também nos

tecidos normais, tem sido diretamente relacionado com diversos casos de neoplasias (SRIVASTAVA et al., 2001), sua produção por tumores humanos tem um importante papel no crescimento celular do tumor (PARTRIDGE et al., 1988; FAN et al., 2001).

Em modelos com super-expressão de TGF- α , a proliferação celular exagerada é uma característica comumente observada. Evidências como o aumento no índice mitótico e reduções na taxa de apoptose, resultaram na hiperplasia da pele, glândulas mamárias e fígado. Com isto, o TGF- α mostra ser capaz de alterar o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte. A estimulação do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), pela presença do TGF- α , pode aumentar os danos no DNA resultando na redução da apoptose e no acúmulo de mutações secundárias (JORISSEN et al., 2003).

Vários estudos mostram a importância dos fatores de crescimento no processo de proliferação celular (COHEN, 1965; CARPENTER, COHEN, 1979; STEIDLER, READE, 1980; COIMBRA, 1997; GORLA Jr. et al., 2001; IWASE et al., 2002). Entretanto, sabe-se que não basta a presença do fator para que haja a proliferação, para isso, é imprescindível a presença do receptor específico na célula a ser ativada (GREEN et al., 1983; WATERMAN et al., 1998; SRIVASTAVA et al., 2001; REYNOLDS, LAVER, MOJTAHEDI, 2001; WILEY, 2003; JORISSEN et al., 2003).

Tanto o EGF, quanto o TGF- α , exercem seus efeitos ligando-se à membrana citoplasmática das células que possuem o receptor específico, o Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). O EGFR ou ErbB-1 é uma glicoproteína tirosinoquinase, identificada por volta dos anos 70, membro de uma família de quatro receptores (EGFR/ErbB-1, HER-2/ErbB-2, HER-3/ErbB-3 e HER-4/ErbB-4). A proteína é codificada pelo oncogene c-erb-1 localizado no cromossomo 7, apresenta aproximadamente 170Kda e é formada por 1.186 aminoácidos (SRIVASTAVA et al., 2001). Localizado na membrana citoplasmática da célula, o EGFR apresenta um domínio

externo e um interno (transmembrana). O EGFR tem papel crucial na regulação da morfogênese de diferentes organismos e também é mediador de uma variedade de processos celulares, incluindo a proliferação, migração, sobrevivência e adesão celular (YARDEN, 2001).

A ligação do fator de crescimento ao receptor ocorre no domínio externo pela dimerização (homo ou hetero-dimerização) induzida do ligante e internalização do mesmo, que leva à ativação da tirosinoquinase e subseqüentemente à autofosforilação do receptor (COHEN et al., 1982; JOST, KARI, RODECK, 2000; SRIVASTAVA et al., 2001; JORISSEN et al., 2003; CIARDIELLO, TORTORA, 2003), que é essencial na interação entre o receptor e seu substrato e na transmissão do sinal (PARTRIDGE et al., 1988; BOONSTRA et al., 1995; GE et al., 2002).

Após a ativação e internalização do complexo ligante-receptor, este pode ser reciclado e retornar à membrana citoplasmática (WILEY, 2003) ou ser degradado nos lisossomos (CARPENTER, COHEN, 1976; SEAMAN, BURG, EMR, 1996).

Receptores específicos de membrana são cruciais na determinação da capacidade de resposta celular a um sinal extracelular particular. Todos os receptores tirosinoquinases, inclusive os da família ErbB, são sintetizados e encaminhados para sua localização específica, mesmo na ausência dos ligantes, caracterizando um *turnover* metabólico (WILEY, 2003). Estudos nesta área têm investigado os mecanismos de controle dos índices de receptores na membrana citoplasmática (CARPENTER, COHEN, 1979; JORISSEN et al., 2003).

Estudos com culturas de células, encontrados na literatura, apresentam resultados contraditórios. Alguns demonstram que, na presença do fator de crescimento, ocorre a redução do número de receptores de membrana, achados estes que vêm ao encontro da possível internalização do complexo receptor- fator (CARPENTER, COHEN,

1976; GREEN et al., 1983). Outros mostram que, com o aumento da concentração do fator, há um aumento no número de receptores (REYNOLDS, LAVER, MOJTAHEDI, 2001).

Carpenter e Cohen (1976) pressupõem que, após a ligação inicial do EGF ao receptor específico na membrana citoplasmática, o complexo EGF-receptor é internalizado e, no final do processo, degradado pelos lisossomos (SRIVASTAVA et al., 2001; WILEY, 2003). Fibroblastos expostos à presença do fator tiveram uma aparente redução em seus receptores de membrana, sugerindo que o receptor também é internalizado. Os autores demonstraram ainda que a remoção do fator de crescimento e posterior adição de soro fez com que, em nove horas, houvesse a recuperação destes receptores de membrana, sugerindo que tenha havido um novo processo de síntese destas moléculas frente a presença do fator, além de uma possível reciclagem destes receptores (WATERMANN et al., 1998) presentes no citoplasma da célula em “vesículas pinocitóticas” (CARPENTER, 2003).

O processo de internalização do complexo EGF-EGFR depende de vários passos (CARPENTER, 2003) e pode ser controlado pela concentração ótima local do ligante biologicamente ativo e pela expressão do receptor específico na superfície da célula (GREEN et al., 1983). A quantidade de ligante ativo é resultante da ação de vários genes produtores (DAMJANOV, MILDNER, KNOWLES, 1986; SPARROW, HEENAN, 1999). A neutralização dos genes relacionados à proliferação e diferenciação celular pode resultar no bloqueio do ciclo-celular, mesmo frente à ação dos fatores de crescimento (ENDO et al., 2000).

Com a internalização do complexo receptor-fator, há a ativação da tirosinoquinase e a fosforilação do receptor, desencadeando uma cascata de transdução de sinais, pela ativação de outras proteínas, permitindo que o sinal recebido seja transmitido e traduzido no núcleo (CARPENTER, COHEN, 1979; BRUGGEMAN et al., 2002). Uma

estruturação celular apropriada (SCHLESSINGER, GEIGER, 1981, De FILLIPO, ATALA, 2002), a presença de mensageiros secundários, a manutenção de um pH adequado e, principalmente, o aumento na concentração de Cálcio intracelular (Ca^{2+}), são imprescindíveis para a resposta à sinalização (CARPENTER, COHEN, 1979; rev. p/ BOONSTRA et al., 1995; PERALTA- ZARAGOZA et. al., 1997; IWASE et al., 2002).

Até o presente momento, sugere-se que, além da estruturação celular, outros processos são necessários para que a ativação pelo EGF induza a síntese de DNA e a divisão celular. Entre estes processos está a presença de sítios de ligações para EGF localizados no núcleo (HOLT et al., 1994; BOONSTRA et al., 1995; CARPENTER, 2003). Holt et al. (1994) verificaram a presença de EGFR no núcleo das células de carcinomas escamosos e acrescentaram que este receptor tirosinoquinase pode ser ativado no núcleo.

A afinidade do ligante pelo receptor, a sua concentração local (ÉGÉA et al., 2002), o tipo de estímulo e o tempo de estimulação devem ser levados em conta na análise da sinalização, nos diferentes tipos celulares (JORISSEN et al., 2003). Nas células malignas, vários mecanismos, incluindo a superexpressão do receptor, o aumento da concentração dos ligantes, a diminuição do *turnover* do receptor ou a presença de mutações podem contribuir para a sinalização pelo EGFR (MUKOHARA et al., 2003).

Autores destacam que a presença concomitante de fatores de crescimento, associada a um aumento da expressão dos seus receptores, pode ser interpretada como um elemento prognóstico desfavorável em se tratando de neoplasias (MUKOHARA et al., 2003).

Jorissen et al., em 2003, revisando os mecanismos de ativação e sinalização do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico, lembram que, apesar dos resultados obtidos nos trabalhos *in vitro*, a superexpressão dos ligantes e/ou do receptor, bem como sua

ativação independente do fator, ocorre geralmente em neoplasias epiteliais malignas, principalmente em gliomas, tumores de mama, pâncreas e fígado.

Wiley (2003) salienta que os fatores que recrutam o EGFR, provavelmente, estão presentes em níveis baixos, uma vez que, quando expressos em altos níveis, os receptores são saturados e a endocitose é facilitada. Ciardiello e Tortora (2003) acrescentam que o aumento nos níveis dos ligantes EGFR-específicos como o EGF, a anfi-regulina e o TGF- α podem ter impacto na sinalização celular.

Alberts et al. (1997), Epstein et al. (1997), Murray et al., (1999), Raw e Ho (2000) e Balaram et al. (2001) enfatizam que os fatores de crescimento ligam-se ao receptor (EGFR) nas células epiteliais e estimulam a proteína tirosinoquinase que promove a fosforilação do receptor com subsequente produção de um sinal que altera a regulação gênica resultando na proliferação destas células.

O mais importante sinal transduzido a partir da ativação do EGFR é o caminho regulado pelas proteínas da família Ras. As proteínas Ras são reguladoras da mitogênese e atuam como intermediárias entre o receptor tirosinoquinase da membrana citoplasmática e a cascata serino/tirosino quinases intracelulares (rev. p/ BOONSTRA et al., 1995; PERALTA-ZARAGOZA et. al., 1997; JOSEPH et al., 2001; MISHIMA, INOUE, HAYASHI, 2002; CARPENTER, 2003) resultando na proliferação celular.

A expressão do EGFR tem sido observada no epitélio normal, bem como na mucosa bucal (STEIDLER, READE, 1980; DAMJANOV, MILDNER, KNOWLES, 1986; NORDLUND et al., 1991), além de ter sido detectada durante o desenvolvimento dentário (THESLEFF, 1987; CAM, NEUMANN, RUCH, 1990; WISE et al., 1990; COBO et al., 1992; TANIKAWA, BAWDEN, 1999) e em patologias relacionadas à odontogênese (SHRESTHA et al., 1992; VERED, SHOHAT, BUCHNER, 2002). O EGFR está presente em sítios de proliferação rápida, incluindo pele, epitélio gástrico, mama e útero, mas

também pode estar presente em células epiteliais sem capacidade proliferativa (CARPENTER, COHEN, 1979; DAMJANOV, MILDER, KNOWLES, 1986), sugerindo que o receptor tem papel também na diferenciação celular.

Damjanov, Mildner e Knowles em 1986 avaliaram a distribuição do EGFR em tecidos normais humanos e verificaram que em alguns tecidos o receptor está localizado em áreas de proliferação celular e a marcação se estabelece na superfície da membrana celular. Entretanto, em outros, todas as células apresentam o receptor localizado em seu interior (marcação granular citoplasmática). Em todos os tecidos, as células do estroma foram negativas para o EGFR e, provavelmente, dependam de outros fatores de estimulação. Os autores concluem que a localização do receptor indicaria sua capacidade de resposta. As células com receptores na membrana responderiam rapidamente à presença do ligante circulante, enquanto que, as que apresentaram marcação citoplasmática, contendo os receptores internalizados, poderiam representar um mecanismo pelo qual as células manteriam a capacidade de responder frente a um estímulo fisiológico do ligante (GULKESEN et al., 2001).

Através da imunofluorescência e da eletroforese, Thomson, Mason e Moore (2001) estudaram a regulação da expressão do EGFR em melanócitos humanos. Os autores concluíram que a adição de TGF- α às culturas induziu um rápido aumento na fosforilação da proteína de 170Kda, aumentando o número de receptores. Após o período de 24 – 48 horas aumentou a intensidade do sinal do EGFR, sugerindo uma autoregulação dos receptores. Por sua vez, a inclusão de TGF- α não resultou no aumento do número de células quando comparado ao controle. Estas observações são evidências da ação do fator em melanócitos com potencial de transformação *in vivo*.

Vários estudos verificaram a presença de EGFR e seus ligantes durante a odontogênese. Thesleff (1987), observou a presença de EGFR nos estágios iniciais do

desenvolvimento dentário. Cam, Neumann e Ruch (1990) identificaram a expressão do EGFR somente no retículo estrelado durante os eventos que orientam a odontogênese. Em 1990, Wise et. al. não evidenciaram a presença de EGFR nas células do retículo estrelado do órgão do esmalte. Segundo os autores, embora o EGF seja sintetizado no retículo estrelado, o receptor poderia estar localizado em outra parte, talvez no folículo dental.

Thesleff em 1987 avaliou a presença do receptor do EGF em um folículo dental de um segundo pré- molar retido. Usando a autoradiografia, verificou uma intensa marcação nos restos epiteliais de Malassez, quando comparados ao controle, sugerindo que a expressão deste receptor nos remanescentes epiteliais, aparentemente, indica que estas células são capazes de responder à ação do EGF. A autora acrescenta que o EGF presente na saliva pode ter efeitos diretos na mucosa bucal e que, uma ativação dos restos epiteliais de Malassez, envolveria ou um aumento do EGF no meio (resultado de um aumento local da síntese do fator pela inflamação) ou uma injúria tecidual que expusesse as células epiteliais remanescentes à ação do EGF salivar.

A localização imunohistoquímica do EGFR no epitélio gengival humano foi avaliada por Nordlund et al. em 1991. Três tipos de situações clínicas foram analisadas: Gengiva saudável, Periodontite de adulto e Periodontite juvenil, além do ligamento periodontal de dois dentes, para avaliação do receptor nos restos epiteliais de Malassez. A presença do receptor foi evidente na membrana das células das camadas basal e suprabasal (proliferativas), sendo que a intensidade de marcação diminuía em direção às camadas mais superficiais do epitélio, onde era completamente negativa. No grupo da Periodontite de adulto houve uma expressão mais intensa da marcação nas células basais do epitélio hiperplásico, devido à inflamação. A inflamação pode tornar mais permissiva a atuação de fatores originários da saliva ou de células epiteliais e macrófagos locais, estando associada

ao mecanismo de proliferação. Os remanescentes epiteliais do ligamento periodontal, de ambos os dentes, apresentaram marcação de membrana para EGFR.

Kronmiller, Upholt e Kollar em 1992 avaliaram a alteração causada pelo retinol, que é um estimulador da proliferação celular, sobre a expressão de EGFmRNA, durante as fases da odontogênese e relataram que o retinol (Vitamina A) é capaz de alterar a odontogênese “*in vivo*” e estimular a proliferação epitelial. A histodiferenciação do esmalte é afetada, sugerindo alterações nas glicoproteínas da superfície celular e na membrana basal que tem importância na interação epitélio- mesênquima durante a odontogênese. Citaram ainda que, durante o desenvolvimento dentário normal, a produção de EGF é um potente estimulador da proliferação do epitélio mandibular na formação da lâmina dental e que o aumento da proliferação celular pode ser em decorrência de efeitos do retinol sobre fatores de crescimento ou pela expressão de EGFR.

Cobo et al. (1992) localizaram, pelo método da imunohistoquímica, o EGF e seu receptor em odontoblastos e ameloblastos pré-secretores. Lin, Fan, Wise (1992) e Wise, Lin, Zhao (1995), estudando células do folículo dental e do retículo estrelado do órgão do esmalte descrevem o EGF como um ativador da odontogênese. Paiva, Ciamponi (1998) relatam que o EGF está presente no folículo dental e em vários tecidos circundantes, sugerindo uma origem endógena que talvez inicie o processo de erupção dentária. Tanikawa e Bawden, em 1999, verificaram a colocalização dos receptores para EGF, PDGF e FGF nos pré-ameloblastos, ameloblastos secretores e células “supra-ameloblastos”, sugerindo que os mesmos participam da diferenciação dos ameloblastos e do controle das funções destas células.

Estudos demonstram que a superexpressão do EGFR tem sido associada à progressão tumoral em vários neoplasmas epiteliais das mais diferentes localizações (RABEN et al., 2003), como cabeça e pescoço (PARTRIDGE et al., 1988; KUSUKAWA

et al., 1996; MISHIMA, INOUE, HAYASHI, 2002; PUTTI et al., 2002; O-CHAROENRAT et al., 2002^a; O-CHAROENRAT et al., 2002^b), trato gastro-intestinal (Mc KAY et al., 2002), cérebro, pele (YUSPA, 1988; SPARROW, HEENAN, 1999; SHOLES et al., 2001), vias respiratórias (IBRAHIN et al., 1999; SMITH et al., 2001; RAFFERTY, FENTON, JONES, 2001; MUKOHARA et al., 2003) e mama (JIMENEZ et al., 2000; De JONG et al., 2001; TSUTSUI et al., 2002); mas há muitas divergências entre seus achados na literatura. Segundo Rusch, Mendelsohn e Dmitrovsky (1996) a superexpressão do receptor ocorre frente a altos níveis de EGF ou TGF- α . Mutações do EGFR são raras, o mais comum é a amplificação do gene (DNA), a superexpressão é resultante do aumento da síntese de RNAm (Mc KAY et al., 2002).

Partridge et al., em 1988, estudaram a expressão de EGFR em carcinomas espinocelulares, comparados com papilomas e mucosa bucal normal. Os resultados encontrados mostraram que no grupo controle e nos papilomas a distribuição da marcação para o EGFR foi semelhante, ressaltando que em áreas não ceratinizadas do epitélio a marcação restringiu-se às camadas basal e suprabasal, enquanto que, no epitélio paraceratinizado e em áreas de acantose nos papilomas, o receptor foi encontrado nas camadas basal e espinhosa. Todos os casos do tumor maligno foram positivos para o EGFR em maior ou menor grau apresentando uma marcação de membrana (intensidade X porcentagem). Apesar dos achados, os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a presença do receptor e o prognóstico clínico da doença.

A relação imunohistoquímica entre a expressão de EGFR e MMP3 e sua significância clínica foi verificada por Kusukawa et al., em 1996, em 65 casos de carcinomas espinocelulares de boca. A imunoreatividade para EGFR foi observada na membrana citoplasmática e no citoplasma das células do tumor, exceto na porção ceratinizada. No epitélio normal, utilizado como controle, a marcação foi insignificante. Os

autores encontraram uma relação direta significativa entre a expressão de EGFR e MMP3 e concluíram que isso influencia no potencial de malignidade do carcinoma espinocelular da cavidade bucal.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tucci et al., em 1998, ao investigarem as interações entre a transformação maligna dos ceratinocitos e a presença de oncoproteínas em um levantamento imunohistoquímico de casos de carcinoma espinocelular e ceratose actínica, comparados à pele normal. No carcinoma a marcação dos EGFRs foi mais intensa e em maior número que na ceratose actínica e na pele normal, contribuindo para o aumento da atividade proliferativa encontrada nestes casos.

A expressão de biomarcadores foi avaliada por Ibrahim et al. (1999) em 26 casos de carcinoma de orofaringe. Entre os achados foi constatado o aumento da expressão de TGF- α em áreas com infiltrado inflamatório associado. O EGFR foi observado, pela marcação citoplasmática das células tumorais, em 92% dos carcinomas quando comparados com a mucosa normal que evidenciou marcação de membrana nas células das camadas basal e intermediária do epitélio.

Shimizu et al., 2001 avaliaram a expressão de EGFR e as alterações genéticas em carcinomas espinocelulares metastáticos de pele. O receptor para EGF estava expresso em 9 dos 10 casos estudados. O EGFR não foi imunohistoquimicamente detectado na pele normal que foi o grupo controle. A partir da discussão dos resultados, concluíram que a existência de caso com EGFR-negativo revelava que a carcinogênese em pele não exigia a expressão do receptor para EGF, mas a expressão do EGFR conferia potencial metastático aos carcinomas espinocelulares.

Em um estudo multicêntrico, imunohistoquímico, Putti et al. (2002), verificaram a expressão do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em cânceres de cabeça e pescoço. Um total de 172 pacientes com diagnóstico de carcinoma

espinocelular em boca, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe e laringe, participaram do estudo. O epitélio normal foi utilizado como controle. As células tumorais mostraram uma marcação difusa e mais intensa quando comparadas às células do epitélio normal, onde a marcação se restringiu às camadas basal e suprabasal, indicando que a presença de fator de crescimento é necessária nas células com potencial proliferativo (WAKULICH et al., 2002).

Shrestha et al. (1992) investigaram a expressão de EGFR em 67 casos de cistos odontogênicos e 35 casos de tumores odontogênicos, usando mAb anti-EGFR. As células epiteliais de nenhum dos tumores odontogênicos apresentaram marcação positiva para EGFR, enquanto que o epitélio dos cistos odontogênicos estudados e o epitélio normal da mucosa, utilizado como controle, expressaram a presença do EGFR. A partir dos resultados, os autores sugerem que os tumores odontogênicos dependem de outros fatores para o seu crescimento, enquanto que o epitélio dos cistos de origem odontogênica são capazes de proliferar pela presença do EGFR.

Bovée et al. (1998), ao avaliarem a expressão dos fatores de crescimento (EGF e FGF-2) e seus respectivos receptores (EGFR e FGFR-1) em Adamantinomas de ossos longos, pela técnica da imunohistoquímica, encontraram EGF nas células epiteliais de 14 das 19 amostras analisadas, a porção fibrosa não apresentou o fator. Quanto à presença do receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico foi identificado, somente nas membranas das células epiteliais dos Adamantinomas, em 20 dos 25 casos analisados.

Vered, Shohat e Buchner (2002), verificaram a expressão do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em Ameloblastomas. Utilizando-se do método imunohistoquímico com mAb anti-EGFR, foram estudados 58 casos do tumor odontogênico. Todos os casos expressaram o EGFR e, segundo os autores, são passíveis do

tratamento com a terapia anti-EGFR, especialmente em casos onde o acesso cirúrgico é limitado (como a maxila) ou na falha do controle da doença.

Atualmente, se tem estudado e avaliado a ação de bloqueadores dos receptores de fator de crescimento (receptores tirosinoquinases) no tratamento de várias neoplasias (RUSCH, MENDELSON, DMITROVSKY, 1996; MISHIMA, INOUE, HAYASHI, 2002; CIARDIELLO, TORTORA, 2003). São utilizadas drogas (anti-EGFR) que previnem a homo e/ ou hetero-dimerização do receptor, diminuindo ou impossibilitando sua ativação. Como consequência há uma parada no ciclo celular (LEONARD et al., 2002), reduzindo a proliferação e aumentando os índices de apoptose (RABEN et al., 2003).

“ Qualquer coisa que possas fazer
ou que sonhes poder fazer,
Comece.
A audácia leva em seu seio
o genial, o poder e a magia.”
Goethe

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar expressão de Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em folículos pericoronários e amostras de mucosa bucal normal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o padrão de expressão de EGFR na mucosa bucal normal.

- Definir o padrão de expressão de EGFR nos remanescentes do epitélio odontogênico, sob a forma de ilhas e epitélio reduzido do órgão do esmalte, em folículos pericoronários.

“ Um problema só surge
quando estão presentes
todas as condições para solucioná-lo.”
Karl Marx

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo experimental analítico qualitativo, com utilização de grupo de comparação.

3.2 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

O material utilizado para o estudo foi enviado por Cirurgiões Dentistas que se dispuseram a utilizar a técnica cirúrgica preconizada por Zanini (1990) e Marzola (1995) na remoção de terceiros molares inferiores inclusos, obtendo com a remoção do dente uma cunha de mucosa do mesmo local.

A remoção de uma cunha, em forma de “V”, da fibromucosa localizada acima dos dentes retidos é comumente empregada em cirurgias. Zanini (1990) entende que este acesso oferece um bom campo operatório, além de evitar os excessos de mucosa que permanecem nesta região após as osteotomias e remoção do dente retido. Marzola (1995) orienta que se faça a incisão em forma de triângulo sobre a região do molar retido, triângulo este que deverá ser eliminado; a base desta cunha triangular deverá estar voltada para a face distal do segundo molar inferior. Para obtenção do retalho outra incisão é

realizada na face vestibular do segundo molar inferior, partindo de sua papila disto-vestibular, descendo obliquamente até o fundo de sulco vestibular, dependendo do tipo de retenção, entre o segundo e o primeiro molar inferior.

O material coletado deu entrada no laboratório de Patologia Buco-Dentária da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de junho de 2002 a junho de 2003 e foi distribuído em dois grupos:

Grupo I - 33 folículos pericoronários de terceiros molares mandibulares, completamente retidos, sem história de sintomatologia clínica, de pacientes de 15 a 30 anos.

Grupo II - 24 amostras de mucosa bucal normal, obtidas do mesmo local da remoção do dente incluso do grupo I. Os espécimes deste grupo constituem o grupo controle.

Os espécimes foram fixados em formalina neutra tamponada a 10%, processados e incluídos em parafina. Os folículos foram incluídos com seu longo eixo como superfície de corte e as mucosas de forma a se ter epitélio e conjuntivo na superfície de corte.

Dos 57 espécimes, foram obtidos cortes de 3 μ m, corados em HE e analisados em microscópio ótico binocular marca Zeiss-Standart 20, primeiramente num aumento de 100X e após em 400X. Após esta análise foram incluídos no estudo os folículos que apresentaram remanescentes epiteliais da odontogênese e/ou epitélio reduzido do órgão do esmalte, livres de processo inflamatório ao exame histopatológico, e as mucosas que não apresentassem infiltrado inflamatório associado ao tecido ou alguma área de ulceração.

Após este critério de seleção 5 mucosas e 9 folículos foram excluídos do estudo. Compuseram a amostra para a análise imunohistoquímica, portanto, 19 casos de mucosa bucal normal e 24 folículos pericoronários.

3.3 CARACTERÍSTICAS DA TÉCNICA

De cada um dos 43 casos selecionados obtiveram-se novos cortes de 3 µm que foram submetidos à técnica imunohistoquímica (ANEXO 1) com anticorpo anti- Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (NCL-EGFR[®] - NOVOCASTRA laboratories Ltd. Newcastle - UK), diluição 1:10. Foi usado como sistema de detecção o complexo streptoavidina-biotina imunoperoxidase. Cada bateria imunohistoquímica comportou, no máximo, 20 lâminas sendo um controle negativo, um controle positivo e as demais casos teste.

Os controles foram realizados a partir de um caso de carcinoma espinocelular, como recomendado pelo fabricante do anticorpo utilizado. No controle negativo foi omitido o anticorpo primário.

3.4 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA

As baterias iniciais foram realizadas segundo protocolo estabelecido pelo laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para trabalhos imunohistoquímicos.

Na análise das lâminas notou-se a especificidade do marcador (mAb anti-EGFR) pelas células epiteliais, apesar disso, não foi possível distinguir a localização da marcação (membrana, citoplasma, núcleo), nem mesmo no controle. A marcação mostrou-se específica, mas difusa.

Uma série de baterias foram realizadas alterando-se a temperatura, o tempo e o tipo de recuperação antigênica. Os melhores resultados na marcação (FIGURAS 1 e 2)

foram os obtidos a partir da técnica que utilizou a recuperação antigênica feita com a panela a vapor (*Aqua Timer*- ARNO®), à temperatura de 92°C/93°C, por um período de 20 minutos, com a temperatura ambiente em 22°C (ANEXO 1).

É importante salientar que nos dias de temperaturas extremas o ambiente e as soluções utilizadas eram previamente climatizadas.

3.5 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas coradas pelo método imunohistoquímico (ANEXO 1) com anti-EGFR (NCL-EGFR® - NOVOCASTRA laboratories Ltd. Newcastle - UK), foram reenumeradas e novamente examinadas em um aumento de 400X, com auxílio de microscópio ótico binocular marca Zeiss-Standart 20, com o objetivo de reavaliar a presença de epitélio odontogênico nos folículos e selecionar qual o corte da lâmina apresentava menos artefatos de técnica (debris, rasgos, sujeiras) e melhores condições para ser analisado.

Com a otimização da técnica e após o critério de seleção descrito acima, a amostra ficou composta de 20 folículos pericoronários e 16 amostras de mucosa bucal normal.

Com a lâmina posicionada no microscópio com a parte fosca para a esquerda, num aumento inicial de 100X (microscópio ótico binocular marca Zeiss-Standart 20), sempre no sentido da esquerda para a direita, de cima para baixo, procedeu-se a localização da extremidade da peça. A partir disto, num aumento de 400X, os cortes selecionados dos folículos pericoronários de cada lâmina foram percorridos em toda sua extensão e todos os campos onde foi verificada a presença de remanescentes do epitélio odontogênico e/ou epitélio reduzido do órgão do esmalte foram capturados.

Para os cortes selecionados das mucosas normais também foi realizada a localização da extremidade da peça, inicialmente num aumento de 100X no mesmo microscópio, da esquerda para a direita, de cima para baixo, com a lâmina posicionada horizontalmente no microscópio com a parte fosca para a esquerda. A partir disto, num aumento de 400X, foram capturados três campos contíguos e sucessivos (SANT'ANA FILHO, 1995), no sentido longitudinal da peça, excluindo-se os campos das bordas do tecido.

A captura dos campos foi realizada por uma câmara de vídeo (JVC® modelo TK-C620U, colorida) acoplada a um computador marca UNISYS® modelo Aquanta DX (Processador Pentium® MMX 200 MHz, 64 Mb memória RAM – Sistema operacional Microsoft Windows® 98 – Monitor TCE, 17 polegadas, colorido, dot pitch 0.28, placa de vídeo MATROX® 3D), através do programa VidCap Windows 95 (Microsoft Corp. – USA) na dimensão de 440x330 pixels.

As imagens microscópicas dos campos obtidos, salvas em formato JPEG, foram analisadas com o auxílio do programa de análise de imagens (Photoshop® 7.0) instalado no mesmo computador da captura.

O foco dos campos foram padronizados a partir da nítida visualização do núcleo das células a serem analisadas. Campos que apresentaram artefato sobreposto à área de contagem não foram tabulados.

Os critérios estabelecidos para a tabulação e interpretação dos dados foram os seguintes:

Negativas – células que não apresentassem coloração marrom (DAB).

Positivas – células que apresentassem coloração marrom (DAB).

Marcação de membrana – quando a coloração marrom distribuía-se estritamente pela membrana plasmática das células epiteliais (FIGURA 8).

Marcação de citoplasma – quando a coloração marrom distribuía-se de forma granular estritamente pelo citoplasma das células epiteliais (FIGURA 7).

Marcação de membrana e citoplasma – quando a coloração marrom além de evidenciar a membrana plasmática também distribuía-se de forma granular pelo citoplasma das células epiteliais (FIGURA 6).

Foram tabulados qualitativamente, nos campos obtidos dos folículos pericoronários, o número de ilhas de epitélio odontogênico encontradas, com mais de uma célula por ilha e os campos que evidenciaram a presença do epitélio reduzido do órgão do esmalte. Na mucosa normal foram analisadas e tabuladas as células epiteliais das camadas basal e parabasal do epitélio. As planilhas utilizadas para tabulação seguem nos ANEXOS 2 e 3.

Após serem estipulados os critérios de interpretação, para a realização da calibragem inicial intra e inter-examinador foram selecionados 25 campos de uma lâmina, escolhidos aleatoriamente, capturados e analisados nas mesmas condições do experimento.

A calibragem intra-examinador foi realizada através da avaliação dos campos selecionados e da análise qualitativa das 25 ilhas epiteliais encontradas, a análise foi repetida duas vezes, a primeira após dois dias da análise inicial e a segunda duas semanas após a análise inicial. Foram comparados os resultados da primeira e da última análise pelo cálculo do Kappa, obtendo-se um Kappa de 0,86 (ANEXO 4).

A calibragem inter-examinador foi realizada a partir da comparação dos resultados encontrados na última avaliação do pesquisador com uma avaliação individual de um profissional (*gold standard*) da área de patologia bucal. Foi observado e aceito um índice de concordância com um Kappa igual a 0,65 (ANEXO 5).

Com os valores de concordância apresentados o pesquisador foi considerado calibrado. Os campos onde os examinadores haviam discordado na calibragem foram

reavaliados, agora em conjunto, e a partir dos critérios estipulados, foi estabelecido um “gabarito” utilizado para a calibragem intra-examinador durante o levantamento dos dados. Para a verificação da manutenção do coeficiente de reprodutibilidade, a cada 100 campos analisados, era novamente feita uma calibragem pelo pesquisador. Os campos selecionados para a calibragem inicial eram reavaliados e um novo Kappa obtido, sendo aceitos valores de Kappa num intervalo de : 0,61 a 1 (bom, excelente e perfeito).

Os valores do Kappa das calibrações realizadas durante o levantamento dos dados encontram-se na tabela do ANEXO 6, o valor médio da calibragem intra-examinador durante a análise dos dados foi de 0,76. Ao término do estudo foi realizada uma calibragem inter-examinadores final e obtido um Kappa de 0,72 (ANEXO 7).

3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

Este estudo foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado sob protocolo número 90/02 em 24/06/2002 (ANEXO 8).

Os pacientes, que participaram do estudo, foram informados verbalmente e por escrito, concordaram com os procedimentos e assinaram o termo de consentimento informado (ANEXO 9).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística do estudo foi realizada através da utilização de testes não paramétricos. Na comparação dos dados num mesmo grupo os testes estatísticos empregados foram o *Friedman Test* e *Wilcoxon Signed Ranks Test*. Na análise entre os

grupos foram utilizados *Kruskal-Wallis Test* e *Mann-Whitney Test*. Os valores obtidos encontram-se no ANEXO 10.

“ As vezes cremos que o que temos feito
é somente uma gota no oceano.
Mas sem ela,
o oceano estaria incompleto...”
Madre Teresa de Calcutá

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A expressão de EGFR foi analisada em 20 folículos pericoronários de terceiros molares mandibulares com indicação de extração, completamente retidos, sem sintomatologia clínica e em 16 amostras de mucosa bucal normal, obtidos de 26 pacientes caracterizados no QUADRO 1.

As tabelas 1, 2 e 3 do ANEXO 11 apresentam os valores resultantes da tabulação dos dados encontrados e os respectivos valores percentuais em cada lâmina analisada.

QUADRO 1- Características dos pacientes

	<i>Número total de pacientes</i>	26
Idade		
Média		18 anos
Limites		(15 – 27)
Gênero		
Feminino		17 (65%)
Masculino		09 (35%)
Localização do dente		
Terceiro molar inferior esquerdo (38)		16 (61%)
Terceiro molar inferior direito (48)		10 (39%)

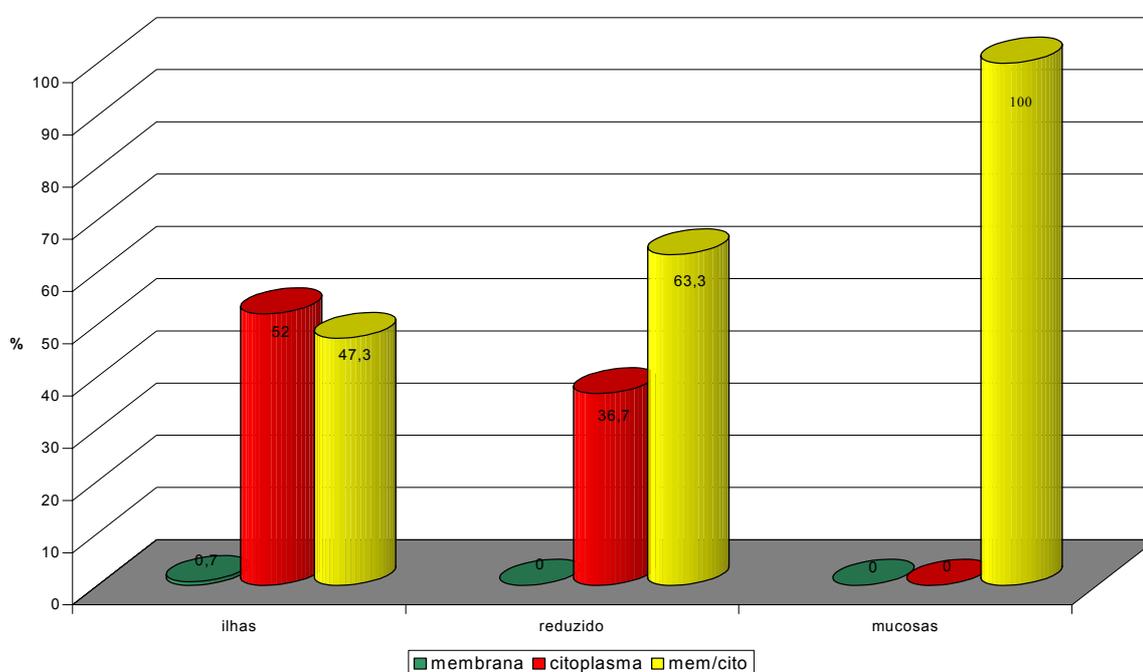
A maioria (61%) dos folículos pericoronários e mucosas bucais normais utilizadas nesta pesquisa foram removidos da região de terceiro molar inferior esquerdo de pacientes do gênero feminino (65%) com idade média de 18 anos.

Houve perda na amostra inicial devido aos critérios de seleção e à otimização da técnica imunohistoquímica. Medidas de tendência central foram aplicadas para garantir a representatividade da amostra utilizada com a inicialmente selecionada. Os valores encontrados foram equivalentes (ANEXO 12).

Foram analisados um total de 1296 campos em 36 lâminas. Das mucosas bucais foram verificados 48 campos de 16 lâminas. Dos folículos pericoronários 1248 campos foram analisados, sendo 1008 na forma de ilhas de células epiteliais e 240 na forma de epitélio reduzido do órgão do esmalte.

Nas mucosas bucais verificou-se a expressão do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico nas células epiteliais das camadas proliferativas (basal e parabasal). A marcação com anti-EGFR, nas células epiteliais das mucosas, diminuía em intensidade e quantidade nas camadas intermediárias e superficiais (FIGURA 3).

GRÁFICO 1- Distribuição da expressão de anti- EGFR quanto a localização por grupo.



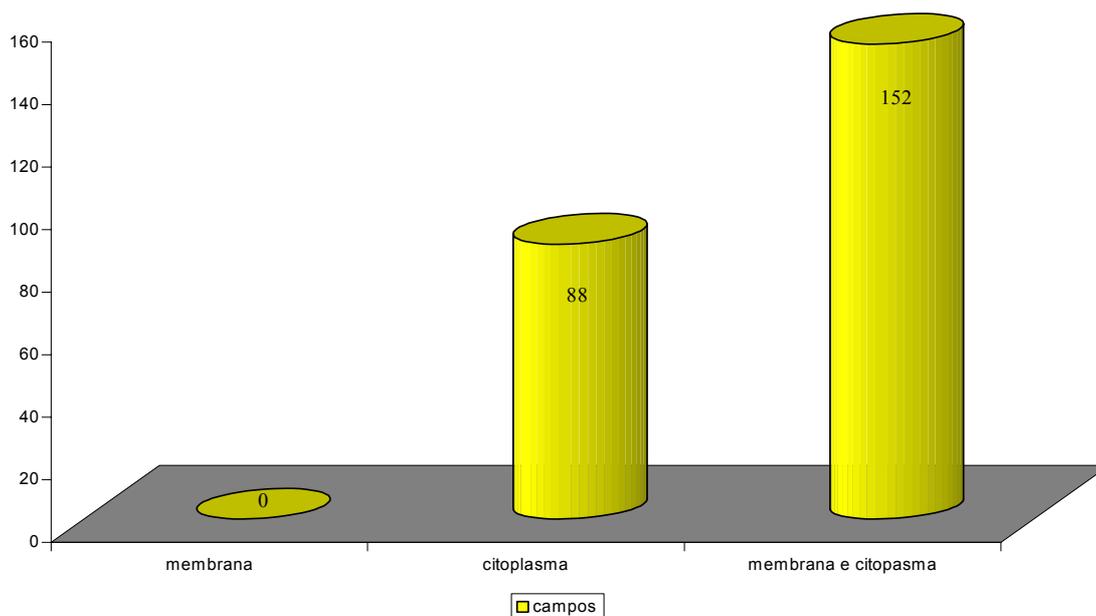
Fonte: Laboratório Patologia Bucal, FO/UFGRS – POA/ RS

A totalidade dos casos de mucosas bucais normais observadas apresentaram marcação de membrana e citoplasma (FIGURA 4) nas camadas proliferativas em todos os campos examinados (GRÁFICO 1 , Tabela 1 do ANEXO 12).

A imunoreatividade com anti-EGFR foi observada em todas as células dos remanescentes epiteliais da odontogênese presentes nos 20 folículos pericoronários analisados (FIGURA 5 e 9). A marcação diferiu na distribuição da localização do anticorpo (GRÁFICO 1).

Nos folículos pericoronários, 52% (524) das ilhas dos remanescentes epiteliais da odontogênese estudadas apresentaram marcação de citoplasma (FIGURA 7), 47,3% (477) marcação de membrana e citoplasma (FIGURA 6), enquanto que 0,7% (7) das ilhas expressaram a presença do EGFR somente na membrana (FIGURA 8) das suas células (GRÁFICO 3, Tabela 2 do ANEXO 11).

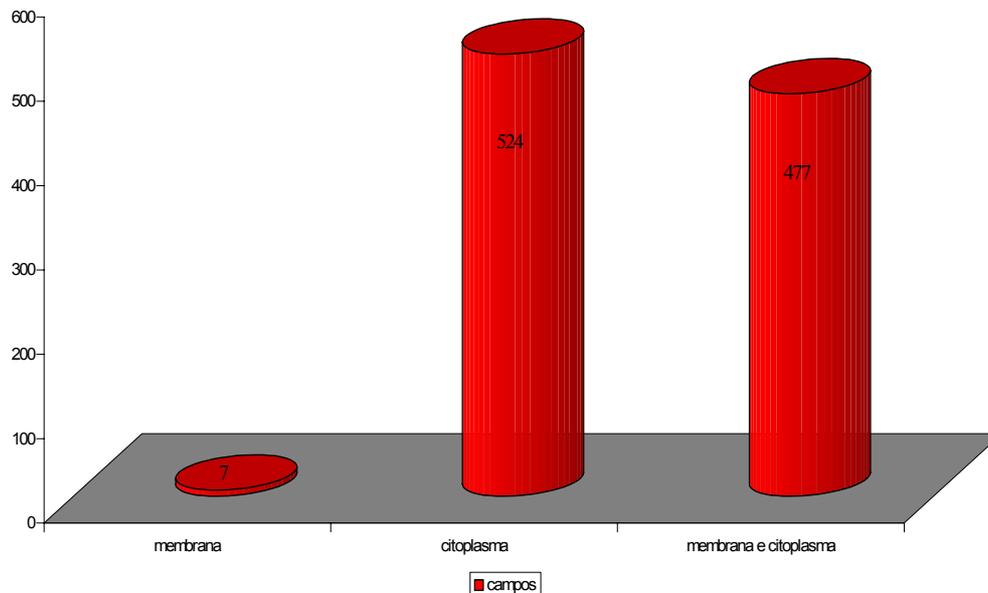
GRÁFICO 2 - Distribuição da localização da expressão de anti- EGFR no epitélio reduzido do órgão do esmalte nos folículos pericoronários



Dos 240 campos de epitélio reduzido do órgão do esmalte, observados em 16 lâminas, em 152 (63,3%) a localização da marcação com anti-EGFR ocorreu concomitantemente na membrana e no citoplasma das células (FIGURA 10). Oitenta e oito campos (36,7%) mostraram marcação citoplasmática do anticorpo monoclonal (FIGURA 11) utilizado e nenhum campo observado apresentou apenas marcação de membrana nas células epiteliais do epitélio reduzido do órgão do esmalte (GRÁFICO 2, Tabela 3 do ANEXO 11).

Não houve diferença significativa ($p= 0,078$) na distribuição da localização da expressão do receptor no epitélio reduzido do órgão do esmalte entre a expressão citoplasmática e de membrana e citoplasma, mas ambas localizações diferiram significativamente da marcação apenas de membrana ($p<0,05$) (GRÁFICO 2, TABELA 1).

GRÁFICO 3 - Distribuição da localização da expressão de anti-EGFR nas ilhas de células epiteliais remanescentes nos folículos pericoronários



Fonte: Laboratório Patologia Bucal, FO/UFGRS – POA/ RS

Nas ilhas de remanescentes epiteliais da odontogênese dos folículos pericoronários 52% apresentaram expressão citoplasmática do anticorpo anti-EGFR, não mostrando diferença significativa ($p=0,268$) com a marcação mista de membrana e citoplasma, verificada em 47,3% das ilhas. Foi verificada a presença do receptor na membrana de 7 ilhas (0,7%) dos remanescentes epiteliais, verificando-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tipos de marcação (GRÁFICO 3, TABELA 1).

TABELA 1 – Distribuição em números absolutos e porcentagem da distribuição da marcação por anti-EGFR. Avaliação intra e inter-grupos e seu respectivo grau de significância.

	Membrana		Citoplasma		Mem/ cito	
	n	%	n	%	n	%
Mucosa	0	0 ^{Aa}	0	0 ^{Aa}	48	100 ^{Ab}
Ilhas epiteliais	7	0,7 ^{Aa}	524	52 ^{Bb}	477	47,3 ^{Bb}
Epitélio reduzido	0	0 ^{Aa}	88	36,7 ^{Cb}	152	63,3 ^{Bb}

A, B, C - Teste: Kruskal-Wallis – comparação entre grupos (letras diferentes apresentam diferença significativa para $p < 0,05$)

a, b - Teste: Friedman – comparação intra-grupos (letras diferentes apresentam diferença significativa para $p < 0,05$)

A marcação de membrana e citoplasma esteve presente em todos os grupos, reduzindo significativamente ($p < 0,05$) entre o grupo da mucosa normal e os dois grupos analisados (GRÁFICO 1, TABELA 1). Não houve diferença significativa ($p=0,208$), na expressão de EGFR, quanto à marcação de membrana e citoplasma, entre as ilhas epiteliais dos folículos pericoronários (47,3%) e as áreas de epitélio reduzido do órgão do esmalte (63,3%) (TABELA 1).

Na comparação entre os grupos, quanto à marcação de citoplasma, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os campos do epitélio reduzido do órgão do esmalte (36,7%) e as ilhas de remanescentes epiteliais dos folículos pericoronários (52%). Ambos os grupos também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle, demonstrando um nítido aumento da marcação citoplasmática nas células dos remanescentes epiteliais dos folículos pericoronários (GRÁFICO 1, TABELA 1).

Sete ilhas de células epiteliais dos folículos pericoronários apresentaram marcação de membrana do anticorpo anti-EGFR, mas não foi verificada diferença significativa em relação ao epitélio reduzido do órgão do esmalte ($p=0,062$) e ao grupo da mucosa bucal ($p=0,062$) (GRÁFICO 1, TABELA 1).

“ A capacidade de perceber
e pensar de maneira diferente
é mais importante que o
conhecimento adquirido.”

David Bohm

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O EGFR é uma glicoproteína tirosinoquinase localizada na membrana citoplasmática das células epiteliais, relacionada com a proliferação celular (CARPENTER, COHEN, 1979; PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997; JORISSEN et al., 2003).

A expressão do EGFR tem sido observada no epitélio normal, na mucosa bucal (STEIDLER, READE, 1980; DAMJANOV, MILDNER, KNOWLES, 1986; NORDLUND et al., 1991), na odontogênese (CAM, NEUMANN, RUCH, 1990; WISE et al., 1990; COBO et al., 1992; TONIKAWA, BAWDEN, 1999), em patologias de origem odontogênica (SHRESTHA et al., 1992; VERED, SHOHAT, BUCHNER, 2002), e, mais amplamente, no estudo de neoplasias epiteliais (YUSPA, 1988; IBRAHIN et al., 1999; de JONG et al., 2001; SHOLES et al., 2001; RABEN et al., 2003).

Nossos achados nas mucosas bucais, concordam com a literatura, apresentando marcação com anti-EGFR nas células epiteliais das camadas proliferativas (basal e parabasal) (PARTRIDGE et al., 1988, SHRESTHA et al., 1992; PUTTI et al., 2002), e diminuindo em intensidade e quantidade nas camadas intermediárias e superficiais (NORDLUND et al., 1991).

Há divergências entre os autores na distribuição da localização da expressão do receptor (membrana, citoplasma ou ambas) nas células epiteliais das camadas

proliferativas da mucosa ou pele normal (PARTRIDGE et al., 1988; NORDLUND et al., 1991; KUSUKAWA et al., 1996; SHIMIZU et al. 2001).

Nordlund et al. (1991) verificaram a presença do EGFR na membrana citoplasmática das células das camadas proliferativas da mucosa gengival saudável. Ibrahim et al. (1999) relataram ainda a mesma localização da marcação nas células epiteliais das camadas basal e intermediárias da mucosa. Em nosso estudo, a localização da expressão de anti-EGFR, nas células epiteliais das camadas proliferativas da mucosa bucal, foi concomitantemente na membrana e no citoplasma.

Kusukawa et al. (1996) e Shimizu et al. (2001) não evidenciaram a marcação com anti-EGFR pela técnica imunohistoquímica, respectivamente na mucosa bucal e na pele normal, discordando de nossos achados. Nos dois estudos imunohistoquímicos a diluição do anticorpo primário utilizado foi maior que a utilizada por nós. Kusukawa et al. (1996) utilizaram anticorpo policlonal anti-EGFR. A recuperação antigênica utilizada por Shimizu et al. em 2001 foi a digestão enzimática, enquanto que nós usamos a panela a vapor. Além disso, nos dois trabalhos, o critério para obtenção dos resultados foi baseado na intensidade e não na localização da distribuição da marcação como em nosso estudo.

Como em todas as técnicas, há limites na imunohistoquímica. A comparação de resultados de estudos realizados com diferentes protocolos torna-se subjetiva (CIARDIELLO, TORTORA, 2003). Visto as preocupações e dificuldades que tivemos na otimização da técnica utilizada em nosso estudo, lembramos que resultados fidedignos são obtidos com uma adequada metodologia e um rígido controle da técnica.

Pequenas alterações na temperatura, no tempo, no tipo de recuperação antigênica e no tempo de exposição ao DAB, mostraram resultados completamente diferentes durante a otimização de nossa técnica. Acreditamos que é imprescindível seguir as recomendações e indicações do fabricante do anticorpo, mas, para nós, testar e adaptar o

protocolo imunohistoquímico ao anticorpo a ser utilizado, se mostrou tão importante quanto tais recomendações. Acima de tudo, salientamos a necessidade do pesquisador e da equipe obterem o máximo de conhecimento a respeito do trabalho a ser executado.

As diferenças encontradas na literatura quanto à distribuição da localização da expressão do receptor podem ser explicadas, portanto, por diversos fatores, desde o estabelecimento de critérios para a obtenção da amostra, diferentes tipos e tempos de fixação, variações nos protocolos utilizados na técnica imunohistoquímica (recuperação antigênica, tipo, clone e diluição do anticorpo primário) além dos diferentes critérios estabelecidos para a interpretação dos resultados obtidos.

Enfatizamos que, ao nosso ver, ao se fazer a análise qualitativa de um estudo imunohistoquímico utilizando mAb anti-EGFR, para a interpretação dos resultados é mais preciso e mais importante a localização da distribuição da marcação encontrada (membrana, citoplasma ou membrana e citoplasma) do que a intensidade de marcação, visto que esta pode variar de bateria para bateria, dentro de um mesmo protocolo; tornando mais subjetiva a análise dos dados e dificultando a comparação de metodologias.

A marcação concomitante de membrana e citoplasma, encontrada na totalidade dos campos das mucosas bucais por nós analisadas, foi considerada padrão de normalidade quando comparada aos demais grupos.

As células das camadas basal e parabasal do epitélio bucal estão em nítida proliferação para a manutenção da homeostase tecidual, o que nos leva a acreditar que a presença do EGFR na membrana e no citoplasma das células epiteliais das camadas proliferativas da mucosa bucal ocorre, durante o *turnover* celular, em condições normais. As células estariam em síntese constante do receptor, possivelmente frente à presença de uma concentração local (CARPENTER, COHEN, 1979; ÉGÉA et al., 2002) baixa de

algum fator estimulante como o EGF ou TGF- α (GREEN et al., 1983; WATERMANN et al., 1998; WILEY, 2003).

Outro aspecto que nos leva a pensar que a marcação de membrana e citoplasma pode ocorrer em situações de equilíbrio tecidual é o fato de, frente a uma concentração maior de fatores estimulantes, como a que ocorre nas neoplasias malignas (JORISSEN et al., 2003; MUKOHARA et al., 2003, CIARDIELO, TORTORA, 2003), a localização da marcação com anti-EGFR se dar preferencialmente na membrana citoplasmática das células com alto potencial proliferativo (PARTRIDGE et al., 1988; SRIVASTAVA et al.; 2001; PUTTI et al., 2002). O espécime de carcinoma espinocelular, utilizado como controle positivo em nossa técnica, sustenta esta hipótese.

Concordamos com Damjanov, Mildner e Knowles (1986) que concluíram que a localização do receptor indicaria sua capacidade de resposta. As células com receptores na membrana respondem mais rapidamente à presença do ligante circulante, enquanto que, as que apresentaram marcação granular citoplasmática, contendo os receptores internalizados, mantêm uma capacidade mais lenta de resposta, frente a um estímulo fisiológico do ligante (GULKESEN et al., 2001).

Encontramos na literatura evidências da presença de remanescentes do epitélio odontogênico nos folículos pericoronários de dentes inclusos (SMALL, 1955; KRAMER et al., 1992; RAKPRASITKUL, 2001), do potencial de proliferação destas células na formação de cistos e tumores odontogênicos (STANLEY et al., 1965; TEN CATE, 1972; EBLING et al., 1977; SHEAR, 1994; NICKOLAYCHUK et al., 2002) e da possível participação de fatores de crescimento como o EGF e o TGF- α e seu receptor em diversas patologias (PARTRIDGE et al., 1988; SHRESTHA et al., 1992; BOONSTRA et al., 1995; FAN et al., 2001; VERED, SHOHAT, BUCHNER, 2002).

Apesar disso, até o presente momento, nenhum estudo verificou a expressão imunohistoquímica do EGFR nas células dos remanescentes epiteliais dos folículos pericoronários de dentes completamente retidos e sua relação com a formação de cistos e tumores de origem odontogênica.

Para tanto, utilizamos em nossa amostra folículos pericoronários de terceiros molares inferiores; pois, estes dentes apresentam maior incidência de retenção (LICHT, 1977; SHAFER, HINE, LEVY, 1987; ZANINI, 1990; GRAZIANI, 1995) e maior participação nos casos de cistos e tumores odontogênicos (BARBACHAN, 1977; RAKPRASITKUL, 2001).

Segundo Ebling et al. (1977), a faixa etária de maior ocorrência de cistos dentígeros e ameloblastomas está entre os 20 e 30 anos. Além disso, a localização anatômica (DIAZ, ALFONSO, ALONSO, 1986), a idade e o tempo de retenção (STANLEY et al., 1965; CONSOLARO, 1987; MORESCO, 1997) influem na redução do número de remanescentes epiteliais da odontogênese nos folículos pericoronários de dentes inclusos. Nossa amostra foi então selecionada de terceiros molares inferiores, completamente retidos, de pacientes com idade média de 18 anos. Não foi encontrada na literatura relação entre a expressão do EGFR e o gênero dos pacientes.

Em nosso estudo a imunoreatividade com mAb anti-EGFR foi observada em todas as células dos remanescentes epiteliais da odontogênese, presentes nos 20 folículos pericoronários analisados, confirmando o potencial proliferativo destas células (STOELINGA, 1976; EBLING et al., 1977; MJÖR, FEJERSKOV, 1990; SHEAR, 1994; HAMAMOTO et al., 1998) e, sugerindo o envolvimento das mesmas na formação de cistos e tumores de origem odontogênica (STANLEY et al., 1965; LUCAS, 1984; SHAFER, HINE E LEVY, 1987; HOLMLUND et al., 1991; GÜVEN, KESKIN, AKAL, 2000; NICKOLAYCHUK et al., 2002).

Quando comparados à mucosa bucal, tanto o grupo das ilhas de remanescentes do epitélio odontogênico, quanto os campos de epitélio reduzido do órgão do esmalte, apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na marcação de membrana e citoplasma e um nítido aumento da marcação de citoplasma para o mAb anti-EGFR. Este achado, que demonstra a internalização do receptor (CARPENTER, COHEN, 1976; COHEN et al., 1982; JOST, KARI, RODECK, 2000; SRIVASTAVA et al., 2001; JORISSEN et al., 2003; CIARDIELLO, TORTORA, 2003; CARPENTER, 2003; WILEY, 2003), vem ao encontro da quiescência das células epiteliais remanescentes nos folículos pericoronários e justificaria porque a maioria das pessoas com dentes inclusos não desenvolvem cistos ou tumores odontogênicos.

A marcação de membrana e citoplasma reduziu provavelmente em razão da utilização dos receptores frente a ação de fatores de crescimento presentes durante as fases de proliferação e diferenciação da odontogênese (COBO et al., 1992; LIN, FAN, WISE, 1992; WISE, LIN, ZHAO, 1995; PAIVA, CIAMPONI, 1998; TANIKAWA, BAWDEN, 1999). Os receptores teriam sido ativados, internalizados e degradados nos lisossomos (CARPENTER, COHEN, 1976; SEAMAN, BURG, EMR, 1996, WILEY, 2003), não retornando à membrana celular .

O aumento da localização citoplasmática da expressão do EGFR nos folículos pericoronários pode ser sustentada em virtude da diminuição da marcação de membrana e citoplasma como explicado acima ou pela síntese e não utilização do receptor. As células dos remanescentes do epitélio odontogênico sintetizariam o receptor; mas, pela ausência do fator ativador, o EGFR não está expresso na membrana destas células.

Outra hipótese que pode ser levantada é a possível redução na atividade funcional destas células epiteliais, que são células lábeis com ciclo de vida pré-determinado, o que evidenciaria uma alteração de ordem fisiológica e estrutural,

acarretando um acúmulo citoplasmático do complexo receptor-fator pela diminuição do metabolismo celular.

Novos estudos, relacionados à proliferação celular, verificando a presença e a ação de fatores de crescimento em folículos pericoronários, além da análise ultraestrutural destas células remanescentes do epitélio odontogênico, podem esclarecer a razão da diminuição da expressão de membrana e citoplasma do EGFR, por nós encontrada.

Estas situações, encontradas nos folículos pericoronários, sugerem que, apesar da presença do EGFR em todas as células epiteliais dos remanescentes odontogênicos, a capacidade de proliferação, quando comparada à mucosa bucal normal, está reduzida. A diminuição da marcação de membrana e citoplasma e o aumento da marcação de citoplasma conferem uma menor responsividade a estas células.

Ao analisarmos comparativamente as ilhas de epitélio odontogênico remanescentes e os campos de epitélio reduzido do órgão do esmalte, nota-se que as ilhas apresentam um potencial menor de proliferação que o epitélio reduzido. A diferença significativamente maior na expressão citoplasmática do receptor nas ilhas epiteliais demonstra, pela internalização do receptor, uma resposta mais lenta frente à ação de um fator ativador local (DAMJANOV, MILDNER, KNOWLES, 1986).

As células do epitélio reduzido do órgão do esmalte que, além de proliferarem, durante a odontogênese, ainda se diferenciaram para a formação da coroa dentária, contraditoriamente, apresentam potencial maior de proliferação que as ilhas epiteliais nos folículos pericoronários. Relacionamos este fato à permanência de fatores de crescimento, que durante a odontogênese estavam presentes no retículo estrelado, no folículo dental, em odontoblastos e pré-ameloblastos (THESLEFF et al., 1987; WISE et al., 1990, COBO et al., 1992; LIN FAN, WISE, 1992; WISE, LIN, ZAO, 1995; PAIVA, CIAMPONI, 1998), e que estariam agora atuando nas células do epitélio reduzido do órgão do esmalte.

Podemos inferir ainda que, para a ativação dos remanescentes epiteliais em forma de ilhas, presentes nos folículos pericoronários, haveria a necessidade de uma maior exposição a fatores ativadores do EGFR quando comparados ao epitélio reduzido do órgão do esmalte. Frente a mesma agressão, teríamos uma resposta mais rápida das células do epitélio reduzido do órgão do esmalte, sugerindo que lesões odontogênicas mais comuns, como o cisto dentífero, estejam relacionadas à proliferação destes remanescentes.

Apesar desta constatação verificamos a presença de 7 ilhas de remanescentes epiteliais da odontogênese, presentes nos folículos pericoronários, com marcação estritamente de membrana para o mAb anti-EGFR. A marcação de membrana é encontrada em áreas e tecidos de maior proliferação (PARTRIDGE et al., 1988; SRIVASTAVA et al.; 2001; PUTTI et al.,2002) possibilitando uma suposta “imortalidade” a estas células. Estas ilhas apresentam um alto potencial de proliferação em presença de fatores como o EGF e o TGF- α . Sugerimos, pelo índice encontrado em nosso estudo, que as mesmas estejam relacionadas mais diretamente com a formação de tumores de origem odontogênica, explicando a raridade destas lesões.

Frente à diferença na localização da expressão da marcação imunohistoquímica do anti-EGFR, encontrada em nosso estudo, traduzida como potenciais diferentes de proliferação, sugerimos ainda que a origem de alguns dos remanescentes em forma de ilhas difere dos remanescentes do epitélio reduzido do órgão do esmalte.

Sugerimos que as ilhas que apresentaram marcação estritamente de membrana e que mantêm, ao nosso entender, potencial proliferativo semelhante a células neoplásicas (como as 7 encontradas em nosso estudo nos folículos pericoronários) possam ser originárias de remanescentes da lâmina dentária; que, quando ativadas dariam origem a tumores epiteliais mais agressivos e/ou raros, como Ameloblastomas, Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante e o Tumor Odontogênico Escamoso

Lesões ecto-mesenquimais, como o Fibroma Ameloblástico, Fibro-odontoma-ameloblástico, o Tumor odontogênico adenomatóide e os Odontomas, com um menor grau de proliferação e que apresentam um padrão menos agressivo, provavelmente sejam originárias de células com marcação mista de membrana e citoplasma. Estas lesões aproximariam-se mais da normalidade e manteriam, pela memória celular, características da diferenciação alcançada na odontogênese.

A partir dos resultados obtidos em nosso estudo e das inferências em relação ao diferente grau de proliferação celular encontrado (definido pela localização da expressão do EGFR), sugerimos a realização de futuros estudos, com a utilização de diferentes técnicas, para que se compreenda melhor os fenômenos que regulam a formação e a proliferação dos cistos e tumores odontogênicos.

“ No fim tudo dá certo
se não deu certo
é porque ainda não chegou o fim.”
Fernando Pessoa

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A expressão de EGFR foi observada na membrana e no citoplasma das células epiteliais das camadas proliferativas (basal e parabasal) da mucosa bucal, podendo ser considerada como padrão fisiológico.

- Todas as células remanescentes epiteliais da odontogênese apresentaram imunoreatividade para o mAb anti-EGFR, havendo variações na expressão do EGFR , podendo estas diferenças estarem relacionadas ao desenvolvimento de cistos e tumores odontogênicos.

- A distribuição da localização celular da expressão do EGFR é importante na análise da imunoreação, pois representam diferentes estados de responsividade celular.

“ Quem não lê
não pensa.
E quem não pensa
Será para sempre um servo.”
Paulo Francis

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. Sinalização celular. In: **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 1997. 1362p., p.721-787.

ANGELOPOULOS, A. et al. Malignant transformation of the epithelial lining of the odontogenic cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 22, no. 4, p. 415-428, 1966.

ARAÚJO, N.; ARAÚJO, V. Tumores odontogênicos. In: _____. **Patologia bucal**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 1984. cap. 8, p. 143-167.

BALARAM, P. et al. Demonstration of TGF- α -EGFR and EGF-EGFR autocrine loops and their relation to proliferation in complete hydatidiform moles (CHM). **IGCS**, v. 11, p. 397-402, 2001.

BARBACHAN, J. Cisto dentífero. In: Ebling, H. et al.. **Cistos e Tumores Odontogênicos** 3.ed. atual. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Nov. 1991. 183p., p.47-48.

BARROSO, J. et al. Relação entre imagem radiográfica e aspectos histopatológicos de membranas pericoronárias em terceiros molares não irrompidos. **Ars Cvrandi Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 13-20, 1985.

BIDWELL, J. et al. Nuclear matrix-intermediate filament proteins of the dental follicle/enamel epithelium and their changes during tooth eruption in dogs. **Archs Oral Biol**, v. 40, no. 11, p. 1047-1051, 1995.

BOONSTRA, J. et al. The epidermal growth factor. **Cell Biology International**, v. 19, no. 5, p. 413-430, 1995.

BOVÉE, J. et al. Expression of growth factors and their receptors in adamantinoma of long bones and the implication for its histogenesis. **Journal of Pathol.**, v. 184 , no. 1, p. 24-30, 1998.

BRADY, C. et al. Symposium on odontogenic epithelium. **British J. Oral Surg**, v. 8, no. 2, p. 01-15, 1970.

BRITO, J. **Fundamentos de Embriologia Buco-dentária** Porto Alegre: Ed. da PUC, 1998. 117p.

BRUGGEMAN, F. et al. Modular response analysis of cellular regulatory networks. **J. Theor. Biol.**, v. 218, p. 507-520, 2002.

CAHILL, D.; MARKS JR., S. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. **Journal of Oral Pathology** , v. 9, p. 189-200, 1980.

CAM, Y.; NEUMANN, R.; RUCH, J. Immunolocalization of transforming growth factor β -1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of *in vitro* production of transforming activity. **Archs Oral Biol**, v. 35, no. 10, p. 813-822, 1990.

CARPENTER, G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinase. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 143-148, 2003.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Ann Rev Biochem**, v. 48, p. 193-216, 1979.

CARPENTER, G.; COHEN, S. I- labeled human epidermal growth factor. **The Journal of Cell Biology**, v. 71, p. 159-171, 1976.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 1348-1354, 2003.

COBO, J. et al. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and its receptor during odontogenesis in the rat. **Eur J Orthod.**, v. 14, no. 5, p. 333-338, 1992.

COHEN, S. et al. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. **J Biol Chem.**, v. 257, no. 3, p. 1523-1531, 1982.

COHEN, S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). **Developmental Biology**, v. 12, p. 394-407, 1965.

COIMBRA, T. Participação de fatores de crescimento na regeneração celular pos- necrose tubular aguda. **J. Bras. Nefrol.**, v. 19, n. 2, p. 169-175, 1997.

COLETTA, R. et al. Expressão de laminina no germe dental do primeiro molar de ratos em desenvolvimento. **Revista do Pós-graduação**, v. 4, n. 2, p. 87-92, 1997.

CONKLIN, W.; STAFNE, E. A study of odontogenic epithelium in the dental follicle. **J. Amer. Dental Ass**, v. 39, 1949.

CONSOLARO, A. **Caracterização microscópica de folículos pericoronários de dentes não-irrompidos e parcialmente irrompidos, sua relação com a idade**. Bauru, 1987. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

DAMJANOV, I.; MILDNER, B.; KNOWLES, B. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. **Laboratory Investigation**, v. 55, no 5, p. 588-592, 1986.

DE FILLIPO, R.; ATALA, A. Stretch and growth: The molecular and physiologic influences of tissue expansion. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 109, no. 7, p. 2450-2462, 2002.

De JONG et al. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 66, no. 3, p. 201- 208, 2001.

DE PAULA, A. et al. Cell proliferation marks in odontogenic keratocyst: effect of inflammation. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, p. 477-482, 2000.

DIAZ, M.; ALFONSO, J.; ALONSO, L. Efectos e interacciones reciprocas de la retencion dental, la localizacion anatomica y la celularidad epitelial en el saco pericoronario de los dientes retenidos. **Rev. Cub. Est.**, v. 23, n. 3, p. 205-210, 1986.

EBLING, H. et al. **Cistos e Tumores Odontogênicos**. Ed. da UFRGS, Porto Alegre, 1977. 192p.

ÉGÉA, J. et al. Le facteur de croissance épidermique: un gardien potentiel de la santé oro-digestive. **Pathologie Biologie**, v. 50, p. 608-612, 2002.

EISENMAN, D. R. Amelogênese. In: TEN CATE, A.R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 434p.

ENDO et al. TGF- alpha antisense gene therapy inhibits head and neck squamous cell carcinoma growth in vivo. **Gene Ther.**, v. 7, p. 1906 – 1914, 2000.

EPSTEIN, J. et al. Assessment of epidermal growth factor in oral secretion of patients receiving radiation therapy for cancer. **Oral Oncology**, v. 33, no. 5, p. 359-363, 1997.

FAN, W. et al. Expression of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in salivary duct carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 127, no. 9, p. 1075-1079, 2001.

GAO, Z. et al. Cytokeratin expression of the odontogenic epithelia in dental follicles and developmental cysts. **J Oral Pathology Med**, v. 18, p. 63-67, 1989.

GE, G. et al. Activation mechanism of solubilized epidermal growth factor tyrosine kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 914-920, 2002.

GORLA Jr., J. et. al. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte II: Fatores de Crescimento. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 4, 2001.

GRAZIANI, M. Cirurgia dos Ameloblastomas. In: **Cirurgia Bucomaxilofacial**, 8.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995. p. 309-318.

GREEN, M. et al. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. **Developmental Biology**, v. 100, p. 506-512, 1983.

GRUPE, H.; TEN CATE, A.; ZANDER, H. A histochemical and radiobiological study of in vitro and in vivo human epithelial cell rest proliferation. **Arch Oral Biol**. v. 12, no. 12, p. 1321-1229, 1967.

GULKESEN, K. et al. EGFR and p53 expression and proliferative activity in parathyroid adenomas; an immunohistochemical study. **APMIS**, v. 109, p. 870-874, 2001.

GÜVEN, O.; KESKIN, A.; AKAL, Ü. The incidence of cysts and tumours around impacted third molars. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 29, p. 131- 135, 2000.

HAMAMOTO, Y. et. al Morphological change of epithelial rests of Malassez in rat molars induced by local administration of N-metilnitrosurea. **Archs Oral Biology**, v. 43, no. 11, p. 899-906, 1998.

HEIKINHEIMO, K. et al. Distribution of extracellular matrix proteins in odontogenic tumours and developing teeth. **Virchow Arch. B**, v. 61, p. 101-109, 1991.

HOLMLUND, A. et al. Ameloblastomas originating from odontogenic cysts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 20, p. 318-321, 1991.

HOLT, S. et al. Epidermal growth factor induced tyrosine phosphorylation of nuclear proteins associated with translocation of epidermal growth factor receptor into the nucleus. **Biochem Pharmacol.** v. 47, no. 1, p. 117-126, 1994.

HOU, L. et al. Characterization of dental follicle cells in developing mouse molar. **Archives of Oral Biology**, v.44, p. 759-770, 1999.

IBRAHIN, S. et al. Expression of biomarkers (p-53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erbB-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 35, p. 302-313, 1999.

IWASE, N. et al. Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 132, p. 307-319, 2002.

JIMENEZ, R. et al. Determination of Her-2/neu status in breast carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. **Modern Pathology**, v. 13, no. 1, p. 37-45, 2000.

JORISSEN, R. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Experimental Cell Research**, v. 284, p. 31-53, 2003.

JOSEPH, T. et al. Transformation of cells overexpressing a tyrosine kinase by phospholipase D1 and D2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 1019-1024, 2001.

JOST, M.; KARI, C.; RODECK, U. The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. **Eur J Dermatol.** v. 10, no. 7, p. 505-510, 2000.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular** 7.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, 339p.

KIN, J.; ELLIS, G. Dental follicular tissue: misinterpretation as odontogenic tumors. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, no. 7, p. 762-767, 1993.

KRAMER, I. et al. The WHO histological typing of odontogenic tumours. **Cancer**, v. 70, no. 12, p. 2988-2994, 1992.

KRONMILLER, J.; UPHOLT, W.; KOLLAR, E. Alteration of murine odontogenic patterning and prolongation of expression of epidermal growth factor mRNA by retinol *in vitro*. **Archs Oral Biol.**, v. 37, no. 2, p. 129-138, 1992.

KRONMILLER, J.; UPHOLT, W.; KOLLAR, E. Expression of epidermal growth factor mRNA in the developing mouse mandibular process. **Archs. Oral Biology**, v. 36, no. 6, p. 405-410, 1991.

KUSUKAWA, J. et al. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oral Oncol, Eur. Journal Cancer**, v. 32B, no. 4, p. 217-221, 1996.

LASKIN, D. Evaluation of the third molar problem. **J. Amer. Dental Ass.**, v. 82, p. 824-828, 1971.

LEONARD, D. et al. Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody therapy for breast cancer. **British Journal of Surgery**, v. 89, p. 262-271, 2002.

LICHT, W. Terceiros molares inferiores inclusos. **Quintessencia**, v. 4, no. 1, p. 9-14, 1977.

LIN, F.; FAN, W.; WISE, G. Granule proteins of dental follicle and stellate reticulum inhibit tooth eruption and eyelid opening in postnatal rats. **Archs. Oral Biol.**, v. 37, no. 10, p. 841-847, 1992.

LUCAS, R. **Pathology of tumours of the oral tissues**. Edimburg: Churchill Livingstone, 1984, p. 41-88

MAIN, D. Epithelial jaw cysts: a clinicopathological reappraisal. **Br. J. Oral Surg.**, v. 8, no. 2, p. 114-125, 1970.

MARKS, S.; CAHILL, D. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. **Archs Oral Biology**, v. 29, no. 4, p. 311-322, 1984.

MARZOLA, C. **Retenção dental**, 2.ed. São Paulo: Pancast, 1995, 286p.

MATTOUT, P. RACHLIN, G. Les modifications histologiques de la zone d'émergence au moment de l'éruption de la molaire chez le rat. **Actuales Odonto-Stomatologiques**, v. 124, p. 691-696, 1978.

Mc DONALD, R.; AVERY, D. **Odontopediatria.**, Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2001. 599 p.

Mc KAY, J. et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2258-2264, 2002.

MISHIMA, K.; INOUE, K.; HAYASHI, Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 38, p. 468-474, 2002.

MJÖR, I, FEJERSKOV, O. Odontogênese . In: **___ Embriologia e Histologia Oral Humana.** São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 1990. Cap. 2, p. 31-49.

MORESCO, F. **Comparação dos aspectos microscópicos dos folículos pericoronários de terceiros molares inferiores, terceiros molares superiores e caninos superiores retidos em diferentes tempos de retenção.** Porto Alegre, 1997. Tese de Mestrado. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MUKOHARA, T. et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Lung Cancer**, v. 41, p. 123-130, 2003.

MUNERATO, C. J. et al. Avaliação Quantitativa da Expressão da Proteína PCNA e das AgNORs em Ameloblastomas. **Rev. Fac. Odontol.**, v. 41, n. 1, p. 39-43, jul. 2000.

MURRAY et al. Cancer, Cancer Genes and Growth factors. In: **Harper's Biochemistry**, 25.ed. : Mc Graw Hill –EUA, cap. 62, 1999.

NEXO, E.; JORGENSEN, P.; HANSEN, M. Human epidermal growth factor-on molecular forms present in urine and blood. **Regulatory Peptides**, v. 42, p. 75-84, 1992.

NICKOLAYCHUK, B. et al. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinases in proliferating and differentiating odontogenic epithelia of inflammatory and developmental cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, p. 720-729, 2002.

NORDLUND, L. et al. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors in human gingival epithelia. **Journal Periodont. Research**, v. 26, p. 333-338, 1991.

O- CHAROENRAT, P. et al. ^a C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. **Oral Oncology**, v. 38, p. 73-80, 2002.

O- CHAROENRAT, P. et al. ^b The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 38, p. 627-640, 2002.

OLIVEIRA, M. et al. Quantificação de AgNORs e expressão do PCNA em ceratocisto odontogênico. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre.**, v. 42 n. 2, p. 51-56, 2001.

PAIVA, S.; CIAMPONI, A. Aspectos de biologia molecular envolvidos no processo de erupção dentária. **Revista do Pós-Graduação**, v. 5, n. 1, p. 13-16, 1998.

PARTRIDGE, M. et al. Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, p. 381-389, 1988.

PERALTA- ZARAGOZA, O. et al. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. **Salud Pública de México**, v. 39, n. 5, p. 451-462, 1997.

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth where and how to make them. **TIG**, v. 15, no. 2, p. 59-65, 1999.

PUTTI, T. et al. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. **Histopathology**, v. 41, p. 144-151, 2002.

RABEN, D. et al. Understanding the mechanisms of action of EGFR inhibitors in NSCLC: what we know and we do not know. **Lung Cancer**, v. 41, p. 515-522, 2003.

RAFFERTY, M.; FENTON, J.; JONES, A. An overview of the role and inter-relationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein on the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx. **Clin. Otolaryngol.**, v. 26, p. 317-320, 2001.

RAKPRASITKUL, S. Pathologic changes in the pericoronal tissues of unerupted third molars. **Quintessence International**, v. 32, no. 8, p. 633-638, 2001.

RAW, I.; HO, P. Sinais dos fatores de crescimento celular. In: **Interação e Seus Sinais**, Ed. UNESP, São Paulo, 2000, cap. 5.

REYNOLDS, L.; LAVER, H.; MOJTAHEDI, H. Evidence for the expression of the EGF receptor on human monocytic cells. **Cytokine**, v. 16, no. 5, p. 169-172, 2001.

RUSCH, V.; MENDELSON, J.; DMITROVSKY, E. The epidermal growth factor receptor and its ligands as therapeutic targets in human tumors. **Cytokine & Growth Factor Reviews** v. 7, no. 2, p. 133-141, 1996.

SANT'ANA FILHO, M. **Avaliação quantitativa das células de Langerhans no papiloma, displasia epitelial e carcinoma espinocelular.** Porto Alegre, 1995. 47f. Tese Doutorado-Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica.

SCHLESSINGER, J.; GEIGER, B. Epidermal growth factor induces redistribution of actin and alpha-actinin in human epidermal carcinoma cells. **Exp Cell Res.** v. 134, no. 2, p. 273-279, 1981.

SEAMAN, M.; BURD, C.; EMR, S. Receptor signalling and regulation of endocytic membrane transport. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 549-558, 1996.

SHAFER, W.; HINE, M.; LEVY, B. **Tratado de Patologia Bucal**, 4.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1987. 728 p., p. 61-63, 239-294.

SHEAR, M. Developmental odontogenic cysts. na update. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 23, no. 1, p 1-11, 1994.

SHIMIZU, T. et al. Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. **Dermatology**, v. 202, p. 203-206, 2001.

SHOLES, A. et al. Overexpression of epidermal growth factor restricted to macrophages in uveal melanoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 119, no. 3 p. 373-377, 2001.

SHRESTHA, P. et al. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 21, p. 314-317, 1992.

SLOOTWEG, P. P53 protein and Ki67 reativity in epithelial odontogenic lesions. An Immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 393-397, 1995.

SMALL, I. A. Ameloblastomas of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 8, p. 281-297, 1955.

SMITH, B. et al. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 127, no. 7, p. 780- 785, 2001.

SO, F. et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2 and receptor FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumours. **J. Oral Pathol. Med.** , v. 30, p. 428-433, 2001.

SPARROW, L. HEENAN, P. Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and m RNA *in situ* hybridization. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 40, p. 19-24, 1999.

SRIVASTAVA, A. et al. Immunohistochemical expression of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumors. **Human Pathology**, v. 32, no. 11, p. 1184-1189, 2001.

STANLEY, H. et al. Age changes in the epithelial components of follicle (dental sacs) associated with impacted third molars. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 19, no. 1, p. 128-140, 1965.

STANLEY, H.; DIEHL, D. Ameloblastoma potential of follicular cysts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 20, no. 2, p. 260-268, 1965.

STEIDLER, N.; READE, P. Histomorphological effects of epidermal growth factor on skin and oral mucosa in neonatal mice. **Archs Oral Biol.**, v. 25, p. 37-43, 1980.

STOELINGA, P. Studies on the dental lamina as related to its role in the etiology of cysts and tumors. **J. Oral Path.**, v. 5, no. 2, p. 65-73, 1976.

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

TANIKAWA, Y.; BAWDEN, J. The immunohistochemical localization of phospholipase C γ and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. **Archives of Oral Biology**, v. 44, p. 771-778, 1999.

TEN CATE, A. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 34, no. 6, p. 956-964, 1972.

THESLEFF, I. Epithelial cell rests of malassez bind epidermal growth factor intensely. **Journal of Periodontal Research**, v. 22, p. 419-421, 1987.

THESLEFF, I.; ABERG, T. Molecular regulation of tooth development. **Bone**, v. 25, no. 1, p. 123-125, 1999.

THOMAS, H.; KOLLAR, E. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. **Archs Oral Biol**, v. 34, no. 1, p. 27-35, 1989.

THOMSON, C.; MASON, R.; MOORE, G. Regulation of epidermal growth factor receptor expression in human melanocytes. **Exp. Dermatol.**, v. 10, p. 321-328, 2001.

TOMMASI, A. **Diagnóstico em Patologia Bucal**. 2.ed. São Paulo: Pancast, 2000, cap. 16

TRUE, L. Principles of immunohistochemistry. In **Atlas of diagnostic immunohistochemistry.**, Philadelphia: J. B. Lippincott, 1990 , cap. 1, p. 1-34.

TSUTSUI, S. et al. Comparison of the immunohistochemical expression of EGFR, c-erbB2 and p53 protein between primary and recurrent breast cancer. **Breast Cancer.**, v. 9, no. 2, p. 111-117, 2002.

TUCCI, M. et al. Advances in the understanding of malignant transformation of keratinocytes: an immunohistochemical study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 10, p. 118-124, 1998.

VERED, M.; SHOHAT, I.; BUCHNER, A. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma. **Oral Oncology**, v. 39, n. 2, p. 138- 143, 2002.

WAKULICH, C. et al. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, p. 573-579, 2002.

WALDRON, C. Cistos e Tumores Odontogenicos. In: NEVILLE, B. et al. **Oral and Maxillofacial pathology**, Philadelphia: Saunders, cap. 15, p. 481-527, 1995.

WANG, S. et al. Identification of epidermal growth factor receptor in human bucal mucosa. **Archs Oral Biology**, v. 35, no. 10, p. 823-828, 1990.

*WATERMAN, H. et al. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, no. 22, p. 13819-13827, 1998.*

WILEY, H. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. **Experimental Cell Research**, v. 284, p. 78-88, 2003.

WISE, G. et al. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by follicle cells and its implications for tooth eruption. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 247-254, 2002.

WISE, G. et al. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of cultured cells from rat molar stellate reticulum. **Archs Oral Biol.**, v. 35, no. 8, p. 603-613, 1990.

WISE, G.; LIN, L.; ZHAO, L. Transcription and translation of CSF-1 in dental follicle. **Dent. Res.**, v. 74, no. 9, p. 1551-1557, 1995.

WISE, G.; MARKS JR., S.; CAHILL, D. Ultrastructural features of the dental follicle associated with formation of the tooth eruption pathway in the dog. **J. Oral Pathol.**, v.14, no. 1, p. 15-26, 1985.

YAMASAKI, A.; PINERO, G. An ultrastructural study of human epithelial rests of malassez maintained in a differentiated state *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v. 34, no. 6, p. 443-451, 1989.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S3-S8, 2001.

YUSPA, S. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. **Journal of Dermatological Science**, v. 17, p. 1-7, 1988.

ZANINI, S. A. **Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.**, 2.ed. : Revinter, 1990, cap.16

“ Escrever não é como pintar, onde se acrescenta.
Não é o que se põe na tela que o leitor vê.
Escrever é mais como a escultura, onde se remove,
se elimina para tornar o trabalho mais visível.
Até as páginas removidas de certa forma permanecem ”
Elie Wiesel

ANEXOS

ANEXO - 1

TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas devem ser previamente silanizadas ou carregadas com carga positiva.

Desparafinar na estufa a 58°C por 2 horas.

Xilol, 10min.

Xilol, 10min.

Álcool absoluto, 5 min.

Álcool absoluto, 5 min.

Água destilada, 2 min.

Recuperação antigênica: colocar as lâminas em um frasco de Coplin e cobri-las com o tampão adequado. O frasco de Coplin deve ficar em banho-maria e não estar com tampa. Panela a vapor, temperatura de 92°C/93°C, por 20 minutos. Deixar voltar naturalmente à temperatura ambiente (22°C). As lâminas não devem secar nunca.

Lavar em água destilada, PBS.

Bloqueio da peroxidase endógena: água oxigenada 10 volumes, 2x de 15 minutos; ou 2x de 15 minutos de metanol 100ml + 3,0ml de peridrol(água oxigenada 30 volumes).

Lavar em água destilada, PBS.

Bloqueio de proteínas, prevenção de ligações inespecíficas: feita com soro normal não imune, do mesmo animal do anticorpo secundário, em alta concentração. O soro é pingado sobre os cortes já na câmara úmida. Deixar o soro por 15 minutos.

Quando é usado o Antibody Diluent with Background Reducing Componentes não é preciso fazer a passagem pelo soro normal.

Escorrer o soro normal e incubar com anticorpo primário, em câmara úmida, por cerca de 1 hora. Quando forem usados diferentes anticorpos em uma única bateria de lâminas, lavá-las separadamente antes de colocar no PBS.

Lavar 3x em tampão PBS, escorrer bem para não diluir o anticorpo secundário.

Incubar com anti-corpo secundário em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C. Pingar com o próprio frasco.

Lavar 3x em tampão PBS.

Incubar com ABC, que deve ser preparado 15 minutos antes do uso.

Incubar em câmara úmida, a 37°C, por 30 minutos.

Lavar 2x em PBS.

Revelação com DAB(cancerígeno). Quanto mais frio, mais fraca a reação. A reação deve ser processada no escuro, por cerca de 5 minutos.

Lavar em água destilada.

Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer por 10 minutos ou Hematoxilina de Harris por 30 segundos.

Lavagem em água corrente por 10 minutos – quando Hematoxilina de Mayer, água destilada.

Álcool absoluto, 1min.

Álcool absoluto, 1min.

Álcool absoluto, 1min.

Xilol, 10min.

Xilol, 10min., montagem em Permount.

Soluções Utilizadas

Lâminas silanizadas da Dako, Code S3003

Solução Tampão de EDTA(recuperação antigênica)

1000ml de água destilada + 0,3722g EDTA + Hidróxido de Na 2N até
calibrar o
pH em 8,03

Tampão Citrato

Solução A: Citrato de Sódio 3,47g em 100ml de água destilada

Solução B: Ácido Cítrico 2,1g em 100ml de água destilada

pH 6,0: 39,0ml de A + 11,0ml de B + 50,0ml de água destilada

ou

1,95g de Citrato de Sódio + 2ml de HCl 1N + 1lt de água destilada, pH6,0

ou

Target Retrieval Solution pH6,1 , Dako S1699

Tampão Tris pH 9,9

Target Retrieval Solution pH 9,9 , Dako S3307

PBS (Phosphate Buffered Saline)

1 frasco para 1 litro de água destilada, pH 7,2

Anticorpo primário

Estes anticorpos estão sendo usados com incubação de 1hora em câmara

úmida

com água morna. O anticorpo primário pode ser diluído em tampão ou no **Dako Antibody**

Diluent with Background Reducing Components Code no.S3022

A concentração ideal é descoberta através de diluição seriada:

1:25 1:50 1:100 1:200 1:400 ...

Anticorpo secundário biotilado (HRP Duet, Mouse/Rabbit Dako Code no.K0492)

Para 20 lâminas: 1000µl PBS + 10µl anticorpo secundário(reagente C)

Incubar por 30 minutos a 37°C, com LSAB 10 minutos.

ABC (StreptABCComplex Dako Code no.K0492)

Para 20 lâminas: 1000µl PBS + 10µl reagente A + 10µl reagente B

DAB (3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride)

Dab Chromogen Dako Code no.S3000

PBS 100ml + DAB 2 taletes + Água Oxigenada 10vol. 3ml

Dab Chromogen Dako Code no.K3466 (líquido)

Liquid Dab Buffered Substrate, 2ml + 1gota de Dab

ANEXO 4

CALIBRAÇÃO INTRA-EXAMINADOR INICIAL

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ANALISE * ANALISE2	25	100,0%	0	,0%	25	100,0%

ANALISE * ANALISE2 Crosstabulation

Count

	ANALISE2			Total
	0	1	2	
ANALISE 0	2			2
1		11	1	12
2		1	10	11
Total	2	12	11	25

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,860	,097	5,183	,000
N of Valid Cases		25			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ANEXO 5

CALIBRAÇÃO INTER-EXAMINADOR INICIAL

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PESQUIS * GOLD	25	100,0%	0	,0%	25	100,0%

PESQUIS * GOLD Crosstabulation

Count

		GOLD			Total
		0	1	2	
PESQUIS	0	2			2
	1		8	4	12
	2		1	10	11
Total		2	9	14	25

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,652	,142	4,045	,000
N of Valid Cases		25			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ANEXO 6**CALIBRAÇÃO INTRA-EXAMINADOR
DURANTE LEVANTAMENTO DOS DADOS**

CALIBRAÇÃO	VALOR DO <i>KAPPA</i>
01	0,644
02	0,648
03	0,644
04	0,788
05	0,788
06	0,650
07	0,859
08	0,789
09	0,860
10	0,789
11	0,718
12	0,860
13	0,859
14	0,859
15	0,788
16	0,716
17	0,716
18	0,716

ANEXO 7

CALIBRAÇÃO INTER-EXAMINADOR FINAL

Crosstabs

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PESQUIS * GOLD	25	100,0%	0	,0%	25	100,0%

PESQUIS * GOLD Crosstabulation

Count

		GOLD			Total
		0	1	2	
PESQUIS	0	2			2
	1		7	4	11
	2			12	12
Total		2	7	16	25

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,716	,128	4,579	,000
N of Valid Cases		25			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ANEXO 9

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Você será submetido a uma cirurgia para remoção de um dente incluso. A técnica de acesso cirúrgico preconiza a remoção e o exame microscópico do tecido que recobre o dente. Além deste procedimento o Sr. (a) autoriza a remoção de um fragmento de mucosa normal do mesmo local. Este procedimento é uma técnica cirúrgica conhecida e que facilita a costura da gengiva.

O material coletado fará parte do acervo de peças do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e será utilizado em um trabalho realizado pela CD Cristina da Silva Baumgart, na linha de pesquisa de Cistos e Tumores Odontogênicos, sob orientação do Prof. Dr. Onofre Francisco de Quadros para obtenção do título de Mestre em Patologia Bucal pelo programa de pós-graduação desta universidade.

O objetivo da presente pesquisa é o de analisar quantitativamente a expressão de receptores de Fator de Crescimento Epidérmico em Folículos Pericoronários, Mucosa e Ameloblastomas e relacionar com a formação de Tumores Odontogênicos.

A decisão de permitir que o tecido que sobrar da remoção do seu dente seja utilizado para esta pesquisa é sua e em nada influenciará na atenção e no tratamento proposto por seu dentista.

Não haverá nenhum tipo de desconforto além do resultante do procedimento cirúrgico.

Caso seja de sua vontade, poderá em qualquer momento, mesmo após ter concordado (em primeiro instante), desistir da participação no trabalho sem qualquer comprometimento no seu tratamento ou acompanhamento.

Garantimos que informações como nome, endereço, telefone não serão reveladas. No caso de qualquer descoberta que venha a influenciar no seu tratamento, você será informado.

Qualquer dúvida quanto a utilização do material doado, tanto por parte do paciente, quanto de qualquer familiar, será prontamente esclarecida por um dos membros da equipe envolvida.

Leia atentamente as observações abaixo:

Aceito que um triângulo de mucosa e o folículo pericoronário obtidos a partir da técnica de extração do meu dente incluso façam parte da presente pesquisa.

Declaro que recebi cópia do presente termo de consentimento informado e que estou de acordo com as informações nele contidas.

Paciente

Cristina S. Baumgart

Onofre Francisco de Quadros

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__

Pesquisador Responsável:
Cristina da Silva Baumgart
R. Ramiro Barcelos, 2492
FONE: (051) 3316-5023
(051) 9911- 8807

ANEXO 10

ANÁLISE ESTATÍSTICA

ANÁLISE ENTRE OS GRUPOS

CITOPLASMA

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
CITOPLAS	52	11,7692	22,2275	,00	137,00
GRUPO	52	1,9231	,8366	1,00	3,00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank
CITOPLAS	ilha	20	40,28
	reduzido	16	26,78
	mucosa	16	9,00
	Total	52	

Test Statistics^{a,b}

	CITOPLAS
Chi-Square	39,320
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

MEMBRANA E CITOPLASMA

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MEMCITO	52	13,0192	24,4681	,00	151,00
GRUPO	52	1,9231	,8366	1,00	3,00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank
MEMCITO	ilha	20	33,28
	reduzido	16	27,03
	mucosa	16	17,50
	Total	52	

Test Statistics^{a,b}

	MEMCITO
Chi-Square	10,249
df	2
Asymp. Sig.	,006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

MEMBRANA

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MEMBRANA	52	,1346	,5250	,00	3,00
GRUPO	52	1,9231	,8366	1,00	3,00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank
MEMBRANA	ilha	20	29,70
	reduzido	16	24,50
	mucosa	16	24,50
	Total	52	

Test Statistics^{a,b}

	MEMBRANA
Chi-Square	6,788
df	2
Asymp. Sig.	,034

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

ILHA X REDUZIDO

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MEMBRANA	ilha	20	20,10	402,00
	reduzido	16	16,50	264,00
	Total	36		
CITOPLAS	ilha	20	24,27	485,50
	reduzido	16	11,28	180,50
	Total	36		
MEMCITO	ilha	20	20,48	409,50
	reduzido	16	16,03	256,50
	Total	36		

Mann-Whitney	MEMBRA	CITOPLA	MEMCIT
Wilcoxon	264,00	180,50	256,50
Z	-1,867	-3,689	-1,260
Asymp. Sig. (2-	,062	,000	,208
Exact Sig. [2*(1-	,320 ^a	,000 ^a	,211 ^a
Sig.)]			

a.

b.

ILHA X MUCOSA

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MEMBRANA	ilha	20	20,10	402,00
	mucosa	16	16,50	264,00
	Total	36		
CITOPLAS	ilha	20	26,50	530,00
	mucosa	16	8,50	136,00
	Total	36		
MEMCITO	ilha	20	23,30	466,00
	mucosa	16	12,50	200,00
	Total	36		

Test Statistics^b

	MEMBRANA	CITOPLAS	MEMCITO
Mann-Whitney U	128,000	,000	64,000
Wilcoxon W	264,000	136,000	200,000
Z	-1,867	-5,335	-3,268
Asymp. Sig. (2-tailed)	,062	,000	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,320 ^a	,000 ^a	,002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

REDUZIDO X MUCOSA

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

GRUPO	N	Mean Rank	Sum of Ranks
MEMBRANA reduzido	16	16,50	264,00
mucosa	16	16,50	264,00
Total	32		
CITOPLAS reduzido	16	24,00	384,00
mucosa	16	9,00	144,00
Total	32		
MEMCITO reduzido	16	19,50	312,00
mucosa	16	13,50	216,00
Total	32		

Test Statistics^b

	MEMBRANA	CITOPLAS	MEMCITO
Mann-Whitney U	128,000	8,000	80,000
Wilcoxon W	264,000	144,000	216,000
Z	,000	-4,911	-1,995
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,000	,046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^a	,000 ^a	,073 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUPO

ANÁLISE INTRA-GRUPOS

ILHA

NPar Tests Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
MEMILHA	1,00
CITOILHA	2,63
MCCILHA	2,38

Test Statistics^a

N	20
Chi-Square	31,013
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

NPar Tests

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CITOILHA - MEMILHA	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
	Positive Ranks	20 ^b	10,50	210,00
	Ties	0 ^c		
	Total	20		
MCCILHA - MEMILHA	Negative Ranks	0 ^d	,00	,00
	Positive Ranks	20 ^e	10,50	210,00
	Ties	0 ^f		
	Total	20		
MCCILHA - CITOILHA	Negative Ranks	12 ^g	10,21	122,50
	Positive Ranks	7 ^h	9,64	67,50
	Ties	1 ⁱ		
	Total	20		

- a. CITOILHA < MEMILHA
- b. CITOILHA > MEMILHA
- c. MEMILHA = CITOILHA
- d. MCCILHA < MEMILHA
- e. MCCILHA > MEMILHA
- f. MEMILHA = MCCILHA
- g. MCCILHA < CITOILHA
- h. MCCILHA > CITOILHA
- i. CITOILHA = MCCILHA

Test Statistics^c

	CITOILHA - MEMILHA	MCCILHA - MEMILHA	MCCILHA - CITOILHA
Z	-3,921 ^a	-3,922 ^a	-1,107 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,268

- a. Based on negative ranks.
- b. Based on positive ranks.
- c. Wilcoxon Signed Ranks Test

REDUZIDO

**NPar Tests
Friedman Test**

Ranks

	Mean Rank
MEMREDU	1,06
CITOREDU	2,34
MCREDU	2,59

Test Statistics^a

N	16
Chi-Square	22,290
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

**NPar Tests
Wilcoxon Signed Ranks Test**

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CITOREDU - MEMREDU	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
	Positive Ranks	15 ^b	8,00	120,00
	Ties	1 ^c		
	Total	16		
MCREDU - MEMREDU	Negative Ranks	0 ^d	,00	,00
	Positive Ranks	15 ^e	8,00	120,00
	Ties	1 ^f		
	Total	16		
MCREDU - CITOREDU	Negative Ranks	6 ^g	5,67	34,00
	Positive Ranks	10 ^h	10,20	102,00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	16		

- a. CITOREDU < MEMREDU
- b. CITOREDU > MEMREDU
- c. MEMREDU = CITOREDU
- d. MCREDU < MEMREDU
- e. MCREDU > MEMREDU
- f. MEMREDU = MCREDU
- g. MCREDU < CITOREDU
- h. MCREDU > CITOREDU
- i. CITOREDU = MCREDU

Test Statistics^b

	CITOREDU - MEMREDU	MCREDU - MEMREDU	MCREDU - CITOREDU
Z	-3,417 ^a	-3,409 ^a	-1,760 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001	,001	,078

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

MUCOSA

NPar Tests

Friedman Test

Ranks

	Mean Rank
MEMMUCO	1,50
CITOMUCO	1,50
MCMUCO	3,00

Test Statistics^a

N	16
Chi-Square	32,000
df	2
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

NPar Tests

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CITOMUCO - MEMMUCO	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
	Positive Ranks	0 ^b	,00	,00
	Ties	16 ^c		
	Total	16		
MCMUCO - CITOMUCO	Negative Ranks	0 ^d	,00	,00
	Positive Ranks	16 ^e	8,50	136,00
	Ties	0 ^f		
	Total	16		
MCMUCO - MEMMUCO	Negative Ranks	0 ^g	,00	,00
	Positive Ranks	16 ^h	8,50	136,00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	16		

- a. CITOMUCO < MEMMUCO
- b. CITOMUCO > MEMMUCO
- c. MEMMUCO = CITOMUCO
- d. MCMUCO < CITOMUCO
- e. MCMUCO > CITOMUCO
- f. CITOMUCO = MCMUCO
- g. MCMUCO < MEMMUCO
- h. MCMUCO > MEMMUCO
- i. MEMMUCO = MCMUCO

Test Statistics^c

	CITOMUCO - MEMMUCO	MCMUCO - CITOMUCO	MCMUCO - MEMMUCO
Z	,000 ^a	-4,000 ^b	-4,000 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,000	,000

- a. The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- b. Based on negative ranks.
- c. Wilcoxon Signed Ranks Test

ANEXO 11

TABELAS DOS DADOS LEVANTADOS

Tabela 1 – Distribuição do número de campos (n) em relação a localização da marcação com anti-EGFR nas amostras de mucosa normal.

Lamina	Campos	Membrana		Citoplasma		Mem/ cito	
		n	%	n	%	n	%
1	3	0	0	0	0	3	100
2	3	0	0	0	0	3	100
3	3	0	0	0	0	3	100
4	3	0	0	0	0	3	100
5	3	0	0	0	0	3	100
6	3	0	0	0	0	3	100
7	3	0	0	0	0	3	100
8	3	0	0	0	0	3	100
9	3	0	0	0	0	3	100
10	3	0	0	0	0	3	100
11	3	0	0	0	0	3	100
12	3	0	0	0	0	3	100
13	3	0	0	0	0	3	100
14	3	0	0	0	0	3	100
15	3	0	0	0	0	3	100
16	3	0	0	0	0	3	100
	48	0	0	0	0	48	100

Fonte: Laboratório de Patologia FO/ UFRGS – POA

Tabela 2– Distribuição do número de ninhos de células epiteliais (n) em relação a localização da marcação com anti-EGFR nos folículos pericoronários.

Lamina	Ninhos	Membrana		Citoplasma		Mem/ cito	
		n	%	n	%	n	%
1	4	0	0	2	50	2	50
2	9	0	0	5	55,6	4	44,4
3	10	0	0	8	80	2	20
4	14	0	0	11	78,6	3	21,4
5	15	0	0	5	33,3	10	66,7
6	19	1	5,3	10	52,6	8	42,1
7	19	0	0	16	84,2	3	15,8
8	21	0	0	8	38,1	13	61,9
9	22	0	0	20	90,9	2	9,1
10	23	0	0	15	65,2	8	34,8
11	24	0	0	19	79,2	5	20,8
12	32	0	0	26	81,3	6	18,7
13	36	0	0	15	41,7	21	58,3
14	40	1	2,5	8	20	31	77,5
15	46	0	0	22	47,8	24	52,2
16	66	0	0	44	66,7	22	33,3
17	79	0	0	45	57	34	43
18	91	2	2,2	54	59,3	35	38,4
19	147	0	0	54	36,7	93	63,3
20	291	3	1	137	47,1	151	51,9
	1008	7	0,7	524	52	477	47,3

Fonte: Laboratório de Patologia FO/ UFRGS – POA

Tabela 3 – Distribuição do número de campos (n) em relação a localização da marcação com anti-EGFR no epitélio reduzido do órgão do esmalte dos folículos pericoronários

Lamina	Campos	Membrana		Citoplasma		Mem/ cito	
		n	%	n	%	n	%
1	10	0	0	0	0	10	100
2	12	0	0	3	25	9	75
3	8	0	0	2	25	6	75
4	10	0	0	2	20	8	80
5	10	0	0	10	100	0	0
6	31	0	0	5	16,1	26	83,9
7	11	0	0	8	72,7	3	27,3
8	5	0	0	3	60	2	40
9	4	0	0	3	75	1	25
10	3	0	0	2	66,7	1	33,3
11	9	0	0	6	66,7	3	33,3
12	27	0	0	13	48,1	14	51,9
13	24	0	0	5	20,8	19	79,2
14	17	0	0	5	29,4	12	70,6
15	33	0	0	15	45,5	18	54,5
16	26	0	0	6	23,1	20	76,9
	240	0	0	88	36,7	152	63,3

Fonte: Laboratório de Patologia FO/ UFRGS – POA

ANEXO 12

CARACTERÍSTICAS AMOSTRAIS MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

AMOSTRA INICIAL

Lâmina	Sexo	Idade	Cor	Dente
3766	M	16	B	38
3767	M	16	B	38
3772	F	17	B	48
3773	F	17	B	48
7727	F	18	B	48
7728	F	18	B	48
17554/02	F	19	B	48
17555/02	F	19	B	48
17622/02	F	17	B	38
17623/02	F	17	B	38
17913/02	F	23	B	38
17914/02	F	23	B	38
17959/03	F	15	B	38
17960/03	F	15	B	38
17961/03	F	18	B	48
17962/03	F	18	B	48
17972/03	F	18	B	38
17973/03	F	18	B	38
17974/03	M	27	B	38
17975/03	M	27	B	38
17977/03	M	15	B	38
17978/03	M	15	B	38
18010/03	M	18	N	38
18011/03	M	18	N	38
18059/03	F	24	B	38
18060/03	F	24	B	38
18097/03	M	17	N	38
18098/03	M	17	N	38
18156/03	F	18	B	48
18157/03	F	18	B	48
18158/03	F	20	B	38
18159/03	F	20	B	38
18226/03	F	18	B	48
18227/03	F	18	B	48
18228/03	F	20	B	48
18229/03	F	20	B	48
18267/03	F	24	B	48
18268/03	F	24	B	48
18269/03	M	20	B	38

18270/03	M	20	B	38
18278/03	F	27	B	38
18279/03	F	27	B	38
18312/03	F	20	B	38
18313/03	F	20	B	38
18363/03	F	18	B	38
18364/03	F	18	B	38
18404/03	F	24	B	38
18405/03	F	24	B	38
18427/03	M	17	B	48
18428/03	M	17	B	48
17439/02	F	18	B	48
17491/02	F	16	B	48
17527/02	M	18	B	48
17752/02	M	19	B	38
17763/02	F	20	B	48
18062/03	F	17	B	38
18237/03	F	18	B	38

MEDIA 19,33333 19,33333
 DESVIO 3,231173
 MODA 18 38
 MEDIANA 18 38

AMOSTRA FINAL - MUCOSAS

LAMINA	SEXO	IDADE	RAÇA	DENTE
3766	M	16	B	38
17554/02	F	19	B	48
17622/02	F	17	B	38
17914/02	F	23	B	38
17959/03	F	15	B	38
17978/03	M	15	B	38
18011/03	M	18	N	38
18060/03	F	24	B	38
18159/03	F	20	B	38
18226/03	F	18	B	48
18267/03	F	24	B	48
18269/03	M	20	B	38
18313/03	F	20	B	38
18364/03	F	18	B	38
18405/03	F	24	B	38
18428/03	M	17	B	48

MEDIA 19,25
DESVIO 3,109126
MEDIANA 18 38
MODA 18 38

AMOSTRA FINAL - FOLICULOS

LAMINA	SEXO	IDADE	RAÇA	DENTE
3767	M	16	B	38
7727	F	18	B	48
7728	F	18	B	48
17960/03	F	15	B	38
17962/03	F	18	B	48
17972/03	F	18	B	38
17974/03	M	27	B	38
17977/03	M	15	B	38
18010/03	M	18	N	38
18097/03	M	17	N	38
18156/03	F	18	B	48
18158/03	F	20	B	38
18229/03	F	20	B	48
18268/03	F	24	B	48
18312/03	F	20	B	38
18363/03	F	18	B	38
18404/03	F	24	B	38
17439/02	F	18	B	48
17527/02	M	18	B	48
17752/02	M	19	B	38

MEDIA 18,95
DESVIO 2,999561
MEDIANA 18 38
MODA 18 38