

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Arthur Henrique Soares Pacheco

**ALTERAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NO
CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

BELO HORIZONTE

2023

ARTHUR HENRIQUE SOARES PACHECO

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NO
CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz

BELO HORIZONTE

2023

043 Pacheco, Arthur Henrique Soares.
Alteração de moléculas de adesão no ceratocisto odontogênico [manuscrito] / Arthur Henrique Soares Pacheco. – 2023.
37 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Marina Gonçalves Diniz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia

1. Patologia. 2. Recidiva. 3. Aderência Celular. 4. Matriz Extracelular. I. Diniz, Marina Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ALTERAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NO CERATOCISTO ODONTOGÊNICO”

ARTHUR HENRIQUE SOARES GOMES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 29 de junho de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Roberta Rayra Martins Chaves - FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS/MG

Profa. Vanessa de Fátima Bernardes, ICB/UFMG

Profa. Marina Gonçalves Diniz – ICB/UFMG – ORIENTADORA

Belo Horizonte, 29 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Fatima Bernardes, Professora do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Goncalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Rayra Martins Chaves, Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2402407** e o código CRC **EE7BBC00**.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por estar ao meu lado oferecendo amor e suporte durante toda a minha trajetória. Aos meus tios e avós, por serem pilares de confiança e apoio.

À Marina Diniz, pelo cuidado, dedicação e paciência, me sinto grato por ter trabalhado com você durante esse tempo.

Ao Ricardo Gomez, pela ajuda e disposição ao longo de minha jornada acadêmica

Aos professores, funcionários e colegas que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

O ceratocisto odontogênico (CO) é uma lesão cística composta por uma cápsula fina e friável. O revestimento epitelial consiste em uma camada de epitélio escamoso estratificado, e pode-se observar a separação parcial ou quase completa da camada epitelial. O CO apresenta uma alta taxa de recorrência, que pode estar associada a uma fraca adesão entre as células e com a matriz extracelular (MEC), causando fragmentação tecidual e permitindo a desprendimento das células durante a intervenção cirúrgica. Uma análise proteômica prévia identificou alterações em proteases (CTSD), proteínas de adesão associadas a desmossomos (PPL) e moléculas de junção célula-ECM (FBLN1, LGALS7, TLN1), sugerindo que essas alterações moleculares podem estar associadas a patobiologia do CO e seu comportamento recidivante. Na tentativa de esclarecer a base molecular por trás da patobiologia do OKC, investigamos os níveis de expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em uma coorte maior de CO e comparamos com cisto radicular (CR) e mucosa oral (MN). Os resultados da RT-qPCR estão de acordo com a análise proteômica e mostraram aumento significativo da expressão de TLN1 ($p < 0,05$) em comparação com a MN. Em comparação com o CR, o CO mostrou maior expressão de PPL ($p < 0,05$) e LGALS7 ($p < 0,05$). A expressão de TLN1, PPL e LGALS7 tende a diminuir em amostras de OKC que apresentam alto desprendimento do epitélio da cápsula cística. Em conclusão, nossos resultados mostraram alterações em genes que modulam as interações célula-célula e célula-ECM no OKC. Estudos adicionais são necessários para entender o papel dessas proteínas na adesão ou em outras atividades, como proliferação e sobrevivência das células do CO.

Palavras-chave: ceratocisto odontogênico, recorrência, adesão celular, matriz extracelular.

ABSTRACT

The odontogenic keratocyst (OKC) is a cystic lesion composed of a thin and friable capsule. The epithelial lining consists of a layer of stratified squamous epithelium, and partial or nearly complete detachment of the epithelial layer can be observed. OKC present a high recurrence rate that may be associated with a weak adhesion between cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM), causing tissue fragmentation and allowing cells to detach during surgical intervention. A previous proteomic analysis identified alterations in proteases (CTSD), desmosome-associated adhesion proteins (PPL), and cell-ECM junction molecules (FBLN1, LGALS7, TLN1), suggesting that these molecular changes could be associated to the recurrent behavior of OKC. In an attempt to clarify the molecular basis underlining the recurrence potential of OKC, we investigated the expression levels of genes associated with cell-cell and cell-ECM adhesion in a larger cohort of OKC and compared to radicular cyst (RC) and oral mucosa (OM). The RT-qPCR results are in line with proteomics analysis and showed upregulation of TLN1 ($p < 0.05$) compared to OM. Compared to RC, OKC showed higher expression of PPL ($p < 0.05$) and LGALS7 ($p < 0.05$). The expression of TLN1, PPL, and LGALS7 tend to reduce in OKC samples that exhibit high epithelium detachment of the cystic capsule. In conclusion our results showed alteration in genes modulating cell-cell and cell-ECM interactions in OKC. Further studies are needed to understand the role of these proteins in adhesion or in other activities such as proliferation and survival.

Keywords: odontogenic keratocyst, recurrence, cell adhesion, extracellular matrix,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Fotografia mostrando a histopatologia do ceratocisto odontogênico.....	11
Figura 2 Estrutura dos desmossomos.....	15
Figura 3 Representação esquemática das funções atribuídas à galectina-7.....	16
Figura 4 Expressão dos alvos TLN1, PPL, LGALS7, CTSD e FBLN1 em amostras de ceratocisto odontogênico e mucosa normal.....	25
Figura 5 Expressão dos alvos TLN1, PPL, LGALS7, CTSD e FBLN1 em amostras de ceratocisto odontogênico e cisto radicular.....	26
Figura 6 Expressão dos alvos TLN1, PPL e LGALS7 em amostras de ceratocisto odontogênico com mais de 50% e menos de 50% de desprendimento do epitélio da cápsula.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequencia de primers sintetizados para reação de RT-qPCR.....	22
Tabela 2 Dados clínicos das amostras utilizadas na reação de RT-qPCR.....	24

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Revisão de literatura.....	12
2.1 Ceratocisto odontogênico (CO).....	12
2.2 Cisto radicular (CR).....	14
2.3 Adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC).....	16
2.3.1 Degradação da matriz extracelular (MEC).....	18
3 Objetivos.....	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 Materiais e métodos.....	21
4.1 Seleção de amostra.....	21
4.2 Extração de RNA.....	21
4.2.1 Teste de integridade da amostra.....	22
4.3 Conversão das amostras de RNA para cDNA.....	22
4.4 RT-qPCR.....	23
4.5 Análise dos resultados.....	24
5 Resultados.....	25
6 Discussão.....	29
7 Conclusão.....	32
Referências.....	33
Anexos.....	36

1 INTRODUÇÃO

As lesões odontogênicas se originam e guardam aspectos histológicos e moleculares relacionados a tecidos específicos que compõem o aparato dental. Elas se desenvolvem a partir de alterações nas múltiplas e recíprocas interações entre o ectoderma oral e o ectomesênquima derivado de crista neural durante o processo de odontogênese. (DUARTE-ANDRADE et al., 2020). O ceratocisto odontogênico (CO), como nome sugere, é uma lesão de natureza cística, sendo estudada desde aproximadamente metade do século passado, e reconhecida por sua ambiguidade e dificuldade em determinar seu comportamento clínico (KHAN et al., 2019).

O CO foi considerado inicialmente um cisto primordial, mas após uma série de estudos que observaram seu comportamento potencialmente agressivo e sua alta taxa de recidiva, passou a ser considerado, em 2005, como uma neoplasia benigna pela World Health Organization (WHO), quando passou a ser denominado tumor odontogênico queratocístico (THOMPSON et al., 2006). Além disso, diferentemente de outros cistos, apresenta crescimento ativo por proliferação celular, e não por alterações da pressão hidrostática no interior do lúmen da cavidade cística, o que o difere, por exemplo, do cisto radicular (CR) e do cisto dentígero (BROWNE, 1975). No entanto, em 2017, a lesão voltou a ser considerado cisto na classificação da WHO, por falta de evidências para mantê-lo como neoplasia, e seu comportamento ser majoritariamente cístico (BIANCO et al., 2020).

O tecido epitelial normal apresenta diversos marcadores que, em seu pleno funcionamento, possuem a capacidade de manter a homeostase do tecido. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi possível notar a alteração de diversas proteínas no CO quando comparado a mucosa normal, incluindo proteínas diretamente associadas à adesão célula-célula e adesão célula-matriz extracelular (MEC). O desequilíbrio na expressão destas proteínas poderia apresentar relação com as constantes recidivas observadas após a ressecção de lesões mais agressivas e extensas (DINIZ *et al.*, 2021)

Dado que a patogênese molecular do CO não é completamente entendida, e que recentes descobertas apontam uma desregulações na abundância de proteínas associadas à adesão célula-célula e célula-MEC em CO, validar e quantificar a expressão dessas moléculas em um número maior de CO, em comparação com os outros cistos e tecido sadio, pode nos oferecer dados que auxiliem no melhor entendimento do comportamento biológico da lesão.

Por se tratar de uma lesão com alta taxa de recidiva e com tendência a destruição óssea ao longo de seu crescimento, entender os processos biológicos e os mecanismos moleculares

envolvidos na lesão são de grande relevância. O conhecimento da patobiologia da lesão e a busca de marcadores e alvos terapêuticos possibilita o desenvolvimento de intervenções mais eficazes, podendo favorecer o manejo clínico da lesão pela prevenção de lesões recidivantes e abordagens de tratamento mais conservadoras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ceratocisto odontogênico (CO)

O ceratocisto odontogênico (CO) foi citado pela primeira vez por Philipsen em 1956, e desde então foi vastamente explorado, principalmente seu padrão de comportamento e formas eficazes de tratamento. Acomete majoritariamente posição posterior de mandíbula, com leve predileção para o sexo masculino. (KAHRAMAN; GUNHAN; CELASUN, 2018; MYOUNG *et al.*, 2001)

Histologicamente, o CO apresenta uma cápsula delgada e friável, o lúmen pode conter líquido semelhante a transudato seroso ou preenchido por queratina. Microscopicamente, a parede fibrosa não apresenta quantidade significativa de infiltrado inflamatório. O revestimento epitelial é composto por uma camada de epitélio pavimentoso estratificado de seis a oito células de espessura. A formação de cristas epiteliais na interação com a camada do conjuntivo é imperceptível, formando uma interface plana (Figura 1A-B). A camada basal apresenta células em forma de paliçada, frequentemente hiper cromáticas (Figura 1B). O desprendimento da camada epitelial pode ser observado parcialmente ou quase em sua totalidade (Figura 1C-D).

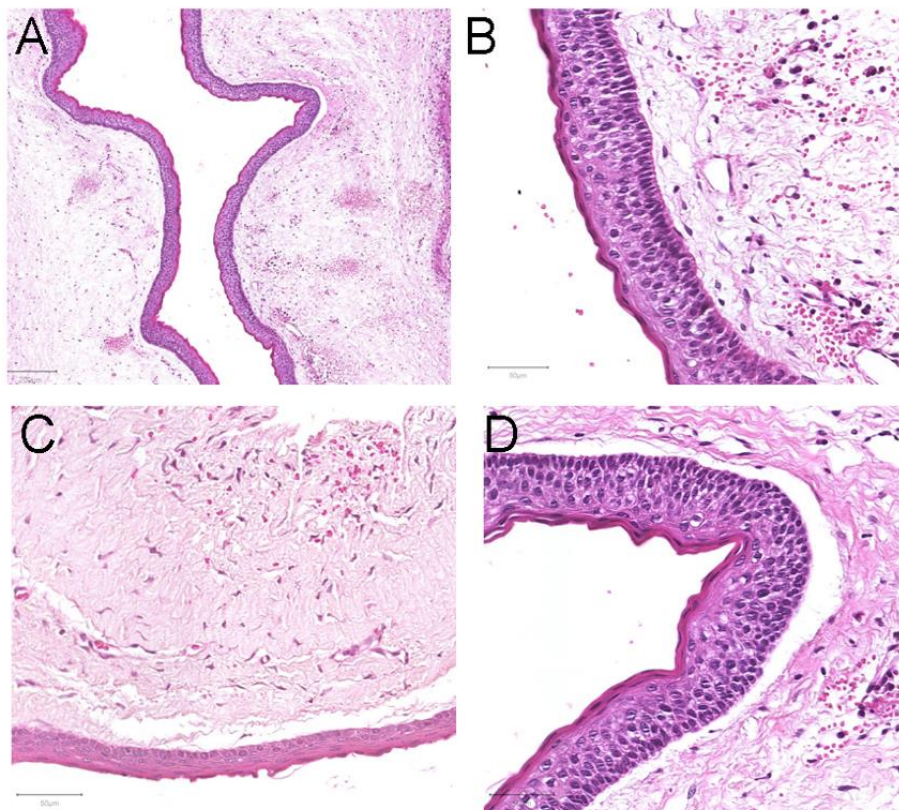


Figura 1: Fotomicrografia mostrando a histopatologia do ceratocisto odontogênico. (A) A lesão apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo delgada e friável, revestida por epitélio escamoso. (B) O epitélio cístico contém células em forma de paliçada na camada basal e a interface com o tecido conjuntivo é plana. (C-D) O desprendimento da camada epitelial pode ser observado em diferentes regiões do corte. Coloração Hematoxilina e Eosina. (Fonte: próprio autor)

É possível encontrar em amostras de CO, majoritariamente em cistos associados a síndrome de Gorlin-Goltz, a presença de cistos satélites, que consistem em ninhos de epitélio odontogênico em meio a cápsula cística, derivado de desprendimento do tumor primordial. Esses cistos satélites podem ser encontrados em aproximadamente de 7% a 37% das lesões de CO. (KAHRAMAN; GUNHAN; CELASUN, 2018)

Apesar da maioria das lesões ser de natureza esporádica e se manifestar de maneira isolada, os COs podem se manifestar no espectro do fenótipo de indivíduos portadores da síndrome do carcinoma basocelular nevóide (SCBN), também conhecida como síndrome de Gorlin-Goltz, causada por mutação no gene PTCH1 (OMIM:#109400) (SILVA et al., 2020). Esta é uma rara síndrome de natureza autossomal e dominante, caracterizada pela presença de múltiplos e recorrentes COs (observados em até cerca de 75% dos indivíduos portadores), assim como a ocorrência de carcinomas basocelulares que usualmente aparecem na puberdade ou nas primeiras décadas de vida (DALL MAGRO, 2014). De forma interessante, a mutação PTCH1 também foi descrita de forma consistente em CO esporádicos (GUO *et al.*, 2013). Apesar das semelhanças entre os COs esporádicos e sindrômicos, sua origem pode não ser a mesma. Acredita-se que os COs esporádicos são derivados de remanescentes de lâmina dentária, enquanto os sindrômicos podem ter, na maioria das vezes, sua origem advinda de células epiteliais da submucosa. Além disso, o CO sindrômico pode acometer indivíduos mais precocemente do que o CO esporádico, afetando crianças na primeira década de vida. (STOELINGA, 2022).

O comportamento recidivante, o crescimento agressivo de alguns casos, a presença mutação do gene PTCH1 e seu crescimento por alta proliferação de células epiteliais contribuíram importantemente no debate sobre a classificação do CO como neoplasia verdadeira. Na atual classificação da “World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumors”, de 2022, o CO permanece na lista dos cistos e tem a seção mais longa entre os cistos da mandíbula.

Nos primeiros anos de descoberta (aproximadamente 1960 a 1980) a taxa de recidiva do CO chegava a 60%, principalmente pelo desconhecimento do potencial recidivo da lesão.

Os primeiros casos foram tratados apenas com enucleação ou curetagem. Estudos atuais sugerem que osteotomia periférica, uso de solução de Carnoy, e marsupialização seguida de enucleação secundária auxiliam na redução da taxa de recidivas, considerando que células epiteliais residuais podem permanecer no sítio da lesão (STOELINGA, 2022). Estudos recentes demonstram uma menor taxa de recidiva associada a tratamentos que envolvem osteotomia periférica (14,8%), além de não apontar relação das recidivas com local da lesão e tratamento escolhido para dente envolvido na lesão (KARACA et al., 2018). Um estudo realizado por Mohanty et al. realiza uma comparação entre marsupialização, enucleação, cauterização química com solução de Carnoy, osteotomia e ressecção. Entre os métodos, o que apresentou a maior taxa de recidiva foi a enucleação (60%) e o único método que não apresentou nenhuma recidiva foi a ressecção. (MOHANTY *et al.*, 2021) Outro estudo realizado com pacientes de CO apresentou recidiva em 58,3% dos pacientes submetidos a enucleação, e 11,7% apresentaram 2 ou mais recidivas da lesão, com maior predileção para pacientes na quinta década de vida. (MYOUNG *et al.*, 2001) Estudos indicam que o CO recidivante apresenta diferenças de comportamento em relação a primeira lesão, inclusive com uma maior expressão de marcadores tumorais (CHANDRASHEKAR et al., 2020).

Acredita-se que a alta taxa de recidiva associada ao CO esteja relacionada ao desprendimento e permanência de células epiteliais no local do sítio cirúrgico. Essa possibilidade pode estar associada à ausência de cristas epiteliais e interface plana na junção epitélio-cápsula, mas também a uma fraca estrutura de adesão entre célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), fragmentando o tecido e permitindo que essas células se desprendam durante a abordagem cirúrgica. Uma análise proteômica realizada previamente por nosso grupo, apontou a alteração de proteases (CTSD), proteínas de adesão associadas ao complexo desmossomal (PPL) e na junção célula-MEC (FBLN1, GALECTIN-7, TLN1), sugerindo essas alterações moleculares poderiam estar por trás do comportamento recidivante do CO (DINIZ *et al.*, 2021). No entanto, novos estudos ainda precisam ser realizados para a melhor compreensão do papel dessas alterações moleculares na biologia do CO.

2.2 Cisto radicular (CR)

Os cistos radiculares (CR) representam 54,6% dos cistos odontogênicos e, diferente do CO, são classificados como cisto inflamatório, derivado de um processo inflamatório de longa duração no osso periapical com proliferação de células residuais do ligamento periodontal

(JOHNSON et al., 2014). O CR apresenta uma cavidade revestida por epitélio (BERNARDI *et al.*, 2015)

A proliferação epitelial na transformação da inflamação em lesão cística do cisto radicular apresenta grande quantidade de células CD8+ em comparação com CD4+. Células B também não estão presentes em grande quantidade, indicando que a fase inicial do desenvolvimento da lesão cística não é majoritariamente mediada por anticorpos (BERNARDI et al., 2015). A presença de tecido necrótico no lúmen do cisto atrai neutrófilos e granulócitos que irão migrar através do revestimento epitelial. O produto lítico derivado das mortes celulares no lúmen do cisto cria um grande volume de moléculas. Como resultado, a pressão osmótica sobe para um nível maior que o fluido tecidual, que irá se difundir na cavidade do cisto para aumentar a pressão hidrostática intraluminal bem acima da pressão capilar. Esse aumento da pressão intracistos pode levar a reabsorção óssea e expansão do cisto. (NAINANI; SIDHU, 2014; STOKKE, 1956)

O tipo de inflamação (aguda ou crônica) e sua extensão (focal ou difusa) podem alterar o desenvolvimento e comportamento do cisto radicular, principalmente quando analisados acordo com o conteúdo presente na cavidade cística (como os tipos de fibras e citocinas inflamatórias presentes).

O CO e o CR apresentam padrões de crescimento distintos. O CO apresenta como maior fator de crescimento a proliferação celular, causando aumento de volume. O fator de crescimento do CR é por pressão osmótica. Um estudo de imuno-histoquímica para análise da expressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) indica que o CO, em comparação com o CR, apresenta maior potencial de proliferação celular devido a maior expressão do PCNA (SHAHELA *et al.*, 2013). O Ki-67, importante marcador de proliferação celular, também é superexpresso no CO quando comparado com o CR e outros cistos odontogênicos, apontando para uma maior atividade proliferativa. (JABBARZADEH et al., 2021). Ainda não existem artigos que estudam a adesão célula-célula e adesão célula-MEC no cisto radicular.

O CR é revestido por epitélio escamoso estratificado similar ao do CO (com exceção da camada basal hiper cromática e em paliçada, com lúmen preenchido por fluido e resíduos celulares. Enquanto a taxa de recidiva do CO é consideravelmente alta, o mesmo não é percebido pelo CR, que possui taxa de recidiva extremamente baixa. A comparação das alterações moleculares encontrada nas duas lesões pode nos permitir melhor entendimento sobre os mecanismos por trás das diferenças biológicas e maior previsibilidade sobre seus comportamentos.

2.3 Adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC)

A MEC é a região do tecido que não é constituída por células, onde é possível encontrar uma rede de macromoléculas composta majoritariamente por proteínas e polissacarídeos. As metaloproteinases são enzimas proteolíticas com a capacidade de degradação da matriz extracelular.

As moléculas de adesão da família integrina são as mais importantes quando se trata da mediação da interação célula-célula e célula-MEC. Eles reconhecem e ligam os correspondentes, transmitem sinais do meio extracelular pra célula, e regulam a expressão de genes a partir de múltiplas vias de sinalização, além de movimento celular, proliferação e apoptose. A Talin-1, codificada pelo gene TLN1, foi a primeira proteína a ter sua ligação confirmada a integrina, e sua superexpressão está associada a crescimento e/ou invasão de células tumorais, metástase, maior indiferenciação celular, além de poder aumentar a resistência a tratamentos medicamento, quando associados a neoplasias. (CUI *et al.*, 2022)

O Periplakin, codificada pelo gene PPL, é uma proteína ligante do citoesqueleto que conecta filamentos intermediários a junções celulares e outras porções de membranas celulares. Além disso, compartilha a estrutura da principal proteína desmossômica, desmoplakin, estando diretamente envolvida na adesão célula-célula no tecido epitelial (Figura 2). (BOCZONADI; MÄÄTTÄ, 2016a)

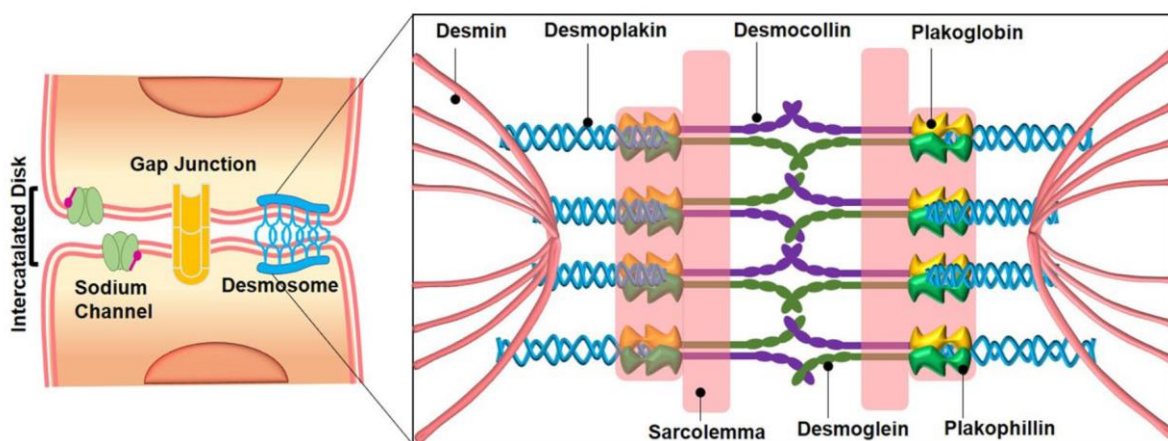


Figura 2. Estrutura dos desmossomos. A caderina desmocolina e desmogleína são projetadas por meio extracelular realiza a ligação entre as células, conectando com o filamento

intermediário (proteína desmoplaquina e placoglobina), gerando a força tensora. Fonte: (LIN et al., 2021)

As fibulinas formam uma família de glicoproteínas de fatores de crescimento epidermais (EGF), em que a fibulina 1, codificada pelo gene *FBLN1*, é a mais expressa, estando presente em vários tecidos do corpo humano. Possui um grande número de ligantes e apresenta interação com outras proteínas da MEC, como versican, aggrecan, laminin e fibronectin, além de interagir com outros fatores de crescimento, como o heparina-binding epidermal growth factor HB-EGF), connective growth factor (CNN2 e CNN3). A *FBLN1* pode apresentar efeito tanto pró-oncogênico quanto supressor de tumor, além de inibir adesão, proliferação celular, mobilidade, e invasão celular quando super expresso. Em alguns tumores, como NSCLC, o prognóstico é pior quando o se encontra com baixa expressão. (HARIKRISHNAN *et al.*, 2020)

A galectina-7, codificada pelo gene *LGALS7*, codifica a proteína galectina 7, que se liga especificamente a β -galactosídeos e é um marcador queratinócito-específico encontrado em todas as camadas do epitélio. Participa de diversos processos como controle da apoptose, migração celular e adesão celular (Figura 3). Sua participação no processo de carcinogênese é amplamente estudada em diversos tumores, como em carcinomas de mama, cabeça e pescoço, de tireóide, linfomas e melanoma (SEWGOBIND; ALBERS; PIETERS, 2021). É importante considerar a família da galectina é considerada reguladora do processo de adesão ao substrato ou células vizinhas atuando fortemente tanto na adesão célula-célula e célula-MEC, e pode favorecer ou inibir essas interações. A sua desregulação, tanto a baixa expressão quanto a superexpressão, podem apresentar efeitos semelhantes no tecido (ADVEDISSIAN; DESHAYES; VIGUIER, 2017).

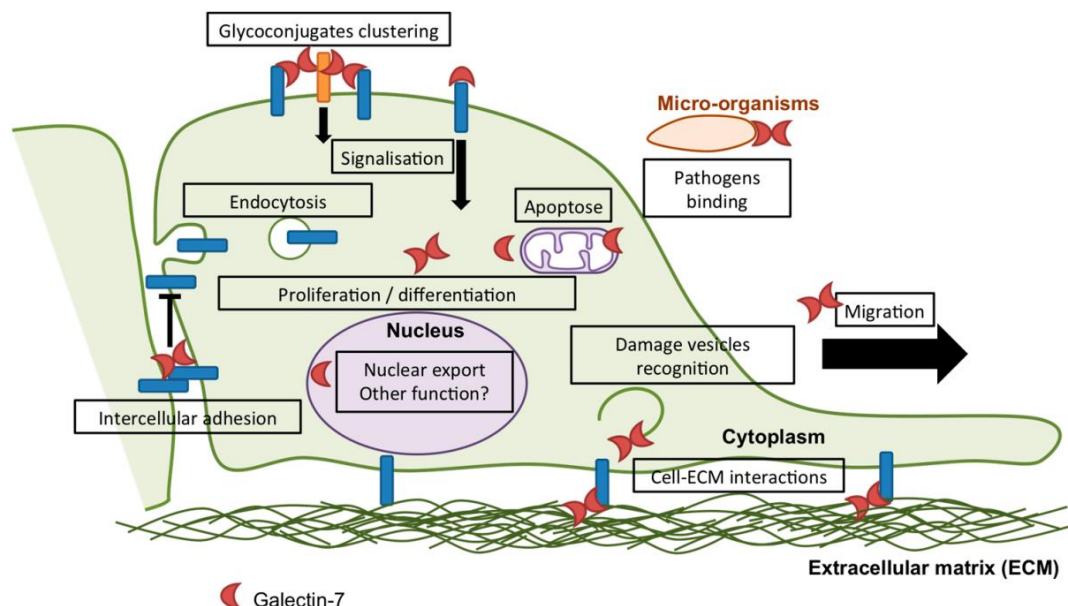


Figura 3. Representação esquemática das funções atribuídas a galectina-7. A galectina-7 participa em processos de adesão, além de proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e migração. Fonte: (ADVEDISSIAN; DESHAYES; VIGUIER, 2017)

2.3.1 Degradação da matriz extracelular

A MEC sofre constantemente o processo de remodelamento, que consiste na sintetização e degradação dos seus componentes, tanto processo fisiológico como em processos patológicos. O crescimento da lesão cística também pode possuir relação direta com a degradação da MEC. As metaloproteinases são enzimas proteolíticas com a capacidade de degradação da matriz extracelular. As MMP-2, -9 e -13 são expressadas em cistos radiculares, confirmando o seu papel no crescimento da lesão cística (BERNARDI et al., 2015).

A MMP-2 degrada e desnatura colágenos e estruturas fibrilares da ECM. Um estudo realizado por Wang realizou a inibição da MMP-2 por interferência no RNA em uma cultura primária de células de ameloblastoma mostrou que a sua inibição causa a supressão na capacidade de invasão local do tumor, podendo apresentar o mesmo papel em outras lesões odontogênicas (WANG et al., 2008).

MMP-9 é investigada por estar presente na expansão de cistos em região mandibular (apresenta grande expressão no CO) e é sugerida como um potencial marcador tumoral. Sua expressão é semelhante de forma similar no CO, CR e ameloblastomas unicísticos (KUBOTA et al., 2000).

MMP-13 está fortemente relacionada com o processo de reabsorção óssea e influencia na migração de células epiteliais. Ela tem a capacidade de clivar grande variedade de substratos, incluindo fibras colágenas e outros componentes da ECM e é estimulado pela transformação do fator de crescimento $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$). Além disso, promove a disponibilidade de fatores de crescimento essenciais para proliferação e sobrevivência celular (LEONARDI et al., 2005). Entre todas as lesões odontogênicas, o MMP-13 é expressado de forma mais abundante no CO. (DE ANDRADE SANTOS *et al.*, 2019). As metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 também apresentam aumento de sua regulação no CO (DINIZ *et al.*, 2021).

A catepsina D, codificada pelo gene CTSD, é uma protease intracelular envolvida em diversas funções fisiológicas como degradação de proteínas, apoptose e autofagia, além de associações com condições patológicas neoplásicas. (ZAIDI *et al.*, 2008) Estudos sugerem que a superexpressão da catepsina D em alguns tipos de tumores favorece a proliferação celular e, conseqüentemente a tumorigênese e o risco de metástase, enquanto a sua supressão apresenta um crescimento tumoral significativamente menor (GLONDU et al., 2002). Além disso, as catepsinas degradam colágeno e diversas proteínas da matriz celular, interferindo diretamente na interação do CO com a MEC. (DINIZ *et al.*, 2021)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar alterações na expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em CO

3.2 Objetivos específicos

- Validar e investigar a expressão dos genes PPL, LGALS7, FLN1, TLN1 e CTSD em amostras fixadas e incluídas em parafina de CO, em comparação com amostras de MN e CR através da técnica de RT-qPCR;
- Investigar a expressão dos genes PPL, LGALS7, FLN1, TLN1 e CTSD em CO e sua relação com o desprendimento do epitélio cístico da cápsula.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de amostra

Para realização do experimento, foi realizada a submissão para o COEP, registro 48638121.8.0000.5149 (Anexo 2). Foram utilizadas 32 amostras fixadas e incluídas em parafina (FFPE), dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFMG (FAO-UFMG). Dessas amostras, 15 foram de CO, 13 de CR e 5 de mucosa oral normal (MN). As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) foram analisadas para confirmação do diagnóstico por um patologista oral.

Para seleção das amostras, foram considerados os seguintes requisitos: (i) o tempo de coleta da amostra, sempre menor que 10 anos e (ii) presença de epitélio na análise microscópica das lesões. A partir da observação do HE, as amostras de CO foram também classificadas de acordo com a quantidade de epitélio desprendido da capsula cística (mais que 50% e menos de 50% de epitélio solto/desprendido do tecido fibroso subepitelial).

4.2 Extração de RNA

De cada amostra FFPE, foi realizado a microtomia, utilizando 10 cortes de 5µm de espessura. Inicialmente foi realizado o processo de desparafinização a partir de dupla lavagem com xilol e lavagem única com etanol a temperatura ambiente. Para extração das amostras, foi utilizado o “ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System” (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo a recomendação do fabricante. Em resumo, foi adicionado às amostras o tampão de lise e proteinase K, seguido de incubação a 56°C por período “overnight”. Após a completa digestão das amostras e visualização de aspecto homogêneo, as amostras foram submetidos a banho seco a 80°C por 1 hora, gelo por 1 minuto e temperatura ambiente por 2 minutos. Após isso foi realizado o tratamento com DNase, BL Buffer e isopropanol. A lavagem foi realizada com a solução de lavagem e as colunas fornecidas no kit. O conteúdo de interesse permaneceu armazenado na membrana de sílica após a lavagem. A primeira eluição foi realizada com um volume total de 30µl e a segunda com 20µl de tampão de eluição. As amostras foram armazenadas no freezer -80°C até a etapa de conversão para cDNA.

4.2.1 Teste de integridade das amostras

Considerando o fato de usarmos amostras FFPE, foi decidido que realizar um teste de integridade seria uma ferramenta válida para realizar o devido controle da qualidade das amostras e a conservação do RNA. O teste de integridade das amostras de RNA foi realizado utilizando Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e o Qubit RNA HS Assay KIT (Invitrogen). Inicialmente foi realizada a produção dos standards, para calibração do aparelho para análise das amostras e então a preparação de amostras para análise. Para que não fosse necessário a realização do teste em todas as amostras e perda de grande quantidade de material, foram selecionadas amostras de concentrações variadas, tanto das menores concentrações até as que apresentaram maior quantidade de RNA medidas com o NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), com o objetivo de descobrir se as amostras com menos concentração também apresentavam um nível alto de integridade. Todas as amostras testadas demonstraram alto grau de qualidade, independentemente de sua concentração.

4.3 Conversão das amostras de RNA para cDNA

Para determinar quais amostras seriam usadas na pesquisa, foi realizado um teste de padronização usando concentração de 450ng e 1000ng. As amostras com concentração igual ou maior que 450ng/ul foram incluídas no estudo.

Na conversão de RNA para cDNA, a síntese da primeira fita é realizada pela enzima transcriptase reversa, que usará amostras de mRNA (poli-A) ou RNA total como molde. Para que ela seja realizada é necessário o buffer fornecido pelo kit; altas concentrações de dNTPs para a produção da primeira fita; um oligonucleotídeo, no caso o OligoDT pois sintetiza a fita a partir de RNA da cadeia poli-A; MgCl₂ que auxiliarão na produção de transcritos completos, aumentando a eficácia da reação.

Para conversão das amostras, foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). Inicialmente, foi realizado o mix de cada amostra com o primer OligoDT e água e colocada em um “heat block” de 70°C por 5 minutos, para realização da segunda etapa da conversão. Foi preparado o mix da reação de transcriptase reversa conforme protocolo, utilizando 15µl de mix para cada 5µl de amostra. Após o final da reação, as amostras foram armazenadas no freezer de -20°C até a realização do RT-qPCR.

4.4 RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para análise relativa da expressão dos alvos. Para confecção dos primers dos alvos FBLN1, GALECTIN-7, PPL, TLN1, CTSD as sequências dos alvos foram obtidas a partir do Ensembl, e os primers desenhados com o uso do Primer-BLAST (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os primers se encontram na tabela 1. Nas extrações de RNA e DNA de amostras FFPE, o material pode se encontrar mais fragmentado do que em amostras frescas. Por esse motivo, para maior eficácia dos primers utilizados com amostras FFPE, foi considerado primers que tivessem entre 70 e 90 pares de base e que cobrissem junções exon-exon.

Tabela 1. Sequência de primers sintetizados para reação de RT-qPCR

GENE	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
FBLN1	5' - ACC TGC TTC AAC ATC CAG GG -3'	5' - CTC CTG CTG GAG CGT GG -3'
LGALS7	5' AGC CAT GTC CAA CGT CCC -3'	5'- GAA TTC TCA GCA CCG TGC CA -3'
TLN1	5'- CTA CGG CCT CGG TCA TCA TC -3'	5'- GGT AAC CCA AAG CAA GCA GC -3'
PPL	5'- GCA GAC CCG GAG CAT CTC T -3'	5'- ACC TGG TCG GCA TTC TTC TG -3'
CTSD	5'- GCT GAT TCA GGG CGA GTA CAT 3'	5'- TCC CAG CTT CAG TGT GAT CG -3'
GAPDH	5'- AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT -3'	5'- CTT TAC CAG AGT TAA AAG CAG CCC -3'

Os primers foram diluídos para concentração final de 10pMol. Para teste de eficiência dos primers, foi realizado a diluição seriada (1; 1:10 e 1:100) e o RT-qPCR foi conduzido em triplicata. Os primers apresentaram índices satisfatórios de eficiência e as curvas de melting foram únicas, indicando que os primers não formava hairpin e dímeros de primer.

Para o primer endógeno, foram testados os primers do GAPDH, PKG1 e PPIA. O GAPDH foi o que apresentou maior homogeneidade na sua expressão, além de CT mais baixo, sendo o de escolha para realização do trabalho.

A reação foi realizada com o Kit SYBR Green qPCR Mix (Thermo Fischer Scientific) no equipamento StepOne Real-Time PCR System 96 wells (Thermo Fischer Scientific).

Para realização do RT-qPCR, os ciclos foram divididos de forma em que todos as placas tivessem todos os tipos de tecido (CO, CR, MN), usando como alvo endógeno o GAPDH, e uma amostra de mucosa normal como controle, presente em todos os ciclos.

Para cada um dos poços, foram usados 5ul de SYBR Green Real-Time qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,5ul de primer forward, 0,5ul de primer reverse, 2ul de água nuclease-free e 2ul de cDNA, totalizando um total de 10ul. Todas as reações foram feitas em duplicata. Para cada alvo, foi utilizado um poço negativo para controle da reação. A reação de RT-qPCR foi realizada do modo standard, quantitativa pela análise de $\Delta\Delta CT$, passando pelo ciclo de ativação a 50° por 2 minutos, Dual Lock DNA polymerase a 95° por 2 minutos e então, 40 ciclos das fases de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento/extensão (60° por 1 minuto).

Os valores de CT das duplicadas normalizadas para o controle endógeno (GAPDH) foram comparados com a amostra de referência (MN) usando a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, obtendo assim a expressão relativa dos genes alvos (fold-change).

4.5 Análise dos resultados

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para a distribuição dos dados (paramétrica ou não paramétrica). A significância estatística entre os grupos foi calculada usando o teste t de Student ou o Mann Whitney, usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism, EUA). O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras

Duas amostras de CO e cinco amostras de CR foram excluídas do estudo por apresentarem valores de CT consideravelmente altos para o alvo endógeno em comparação com as outras amostras. Entre as 13 amostras de CO analisadas, 7 são de homens e 6 de mulheres, com média de idade de 29 anos, variando de 13 a 64 anos. Das oito amostras de CR, 3 são homens e 5 mulheres, com idade média de 25 anos, e variando de 15 a 63 anos. Das 5 amostras de mucosa normal utilizadas, 3 delas são de mulheres e 2 de homens, com idade média de 43 anos, variando entre 17 e 75 anos. Os dados clínicos se encontram na tabela 2.

Tabela 2: Dados clínicos das amostras utilizadas na reação de RT-qPCR.

Amostra	Idade	Sexo	Localização
Ceratocisto odontogênico			
CO01	27	Masc.	Posterior de mandíbula (direito)
CO02	13	Fem.	
CO04	22	Masc.	
CO06	27	Masc.	
CO07	33	Fem.	Posterior de mandíbula (esquerdo)
CO08	23	Fem.	
CO09	64	Masc.	
CO10	53	Fem.	Posterior de mandíbula (direito) - Investigação GG
CO11	61	Masc.	
CO12	34	Fem.	Posterior de maxila (direito)
CO13	29	Masc.	
CO14	25	Fem.	
CO15	38	Masc.	Posterior de mandíbula (esquerdo) - Investigação GG
Cisto Radicular			
CR2	-	Fem.	
CR5	15	Fem.	
CR6	55	Fem.	
CR7	19	Masc.	
CR8	25	Fem.	
CR9	46	Fem.	
CR12	63	Masc.	
CR13	25	Masc.	

Mucosa oral normal

MN6	17	Fem.
MN5	20	Masc.
MN2	40	Masc.
MN1	66	Fem.
MN4	75	Fem.

4.2 Análise da expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em ceratocisto odontogênico (CO) comparado a mucosa normal (MN)

A expressão dos alvos no CO comparado a MN revela superexpressão de *TLN1* ($p < 0,05$), *CTSD* e *FBLN1* e uma expressão reduzida de *LGALS7* e *PPL* (Figura 4). Apesar da diferença na expressão de 3/4 alvos não serem estatisticamente significantes, os resultados corroboram com o resultado observado na análise proteômica (Anexo 1).

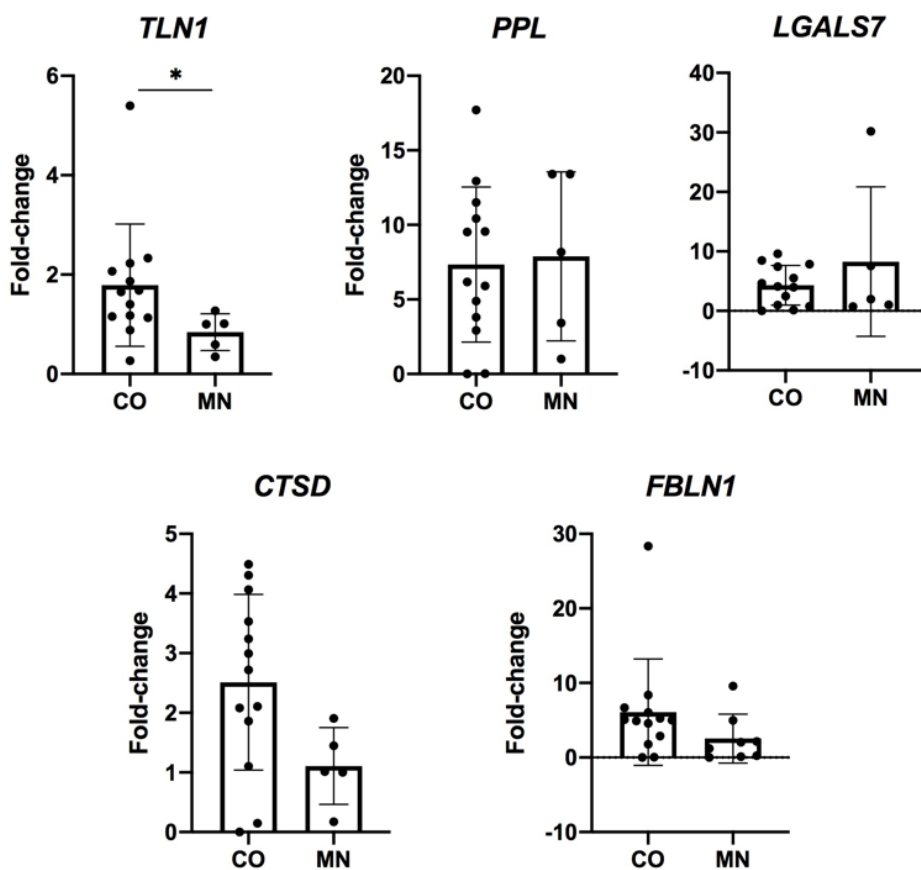


Figura 4. Expressão dos alvos TLN1, PPL, LGALS7, CTSD e FBLN1 em amostras de ceratocisto odontogênico (CO) e mucosa normal (MN). Os dados são mostrados como a média \pm desvio padrão

5.3 Análise da expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em ceratocisto odontogênico (CO) comparado ao cisto radicular (CR)

O CR e o CO são considerados cistos de natureza bastante distintas, e o alto potencial de recidiva é reconhecido apenas no CO. Sendo assim, comparamos a expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em CO e CR. Ao comparar as amostras, é possível observar uma maior expressão de CTSD, PPL ($p < 0,05$), LGALS7, FBLN1 e redução de TLN1 em CO (Figura 5).

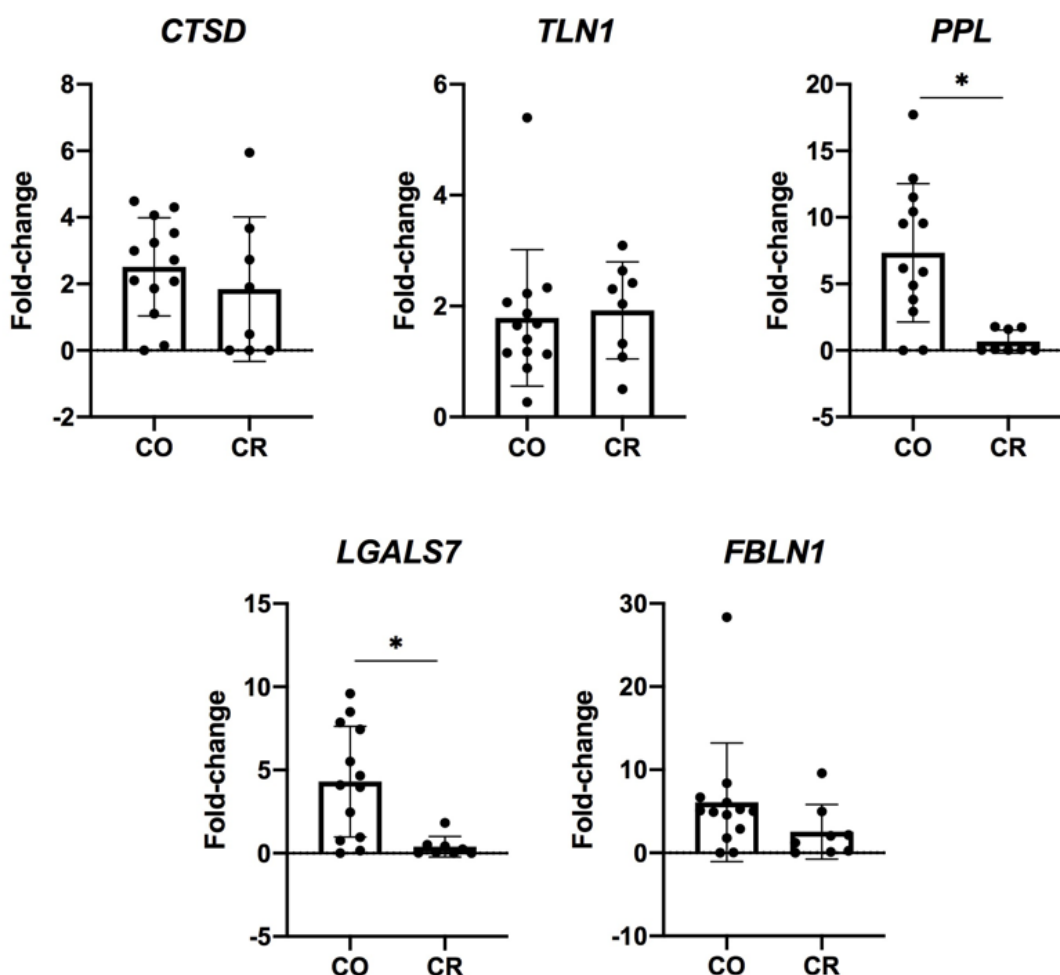


Figura 5. Expressão dos alvos TLN1, PPL, LGALS7, CTSD e FBLN1 em amostras de ceratocisto odontogênico (CO) e cisto radicular (CR). Os dados são mostrados como a média \pm desvio padrão

5.4 Análise da expressão de genes associados à adesão célula-célula e célula-MEC em ceratocisto odontogênico (CO) com mais de 50% e menos de 50% de desprendimento do epitélio da cápsula

A comparação entre essas amostras de CO com mais ou menos de 50% de desprendimento epitelial consiste na medição da lesão, ao longo de toda a lâmina, qual a porcentagem de tecido epitelial que se encontra desprendido do tecido conjuntivo em comparação com os locais que permanecem aderidos. As amostras foram classificadas a partir de análise microscópica das lâminas coradas por HE, por um único patologista. 13 amostras de CO foram usadas nessa classificação, 7 (53,8%) foram consideradas com menos de 50% de desprendimento epitelial, e 6 amostras (46,2%) foram consideradas com mais de 50% de desprendimento epitelial.

Interessantemente, os genes que apresentaram superexpressão e significância estatística nas análises anteriores (*TLN1*, *PPL* e *LGALS7*) tendem a reduzir sua expressão nas amostras de CO que apresentam alto desprendimento do epitélio da cápsula da lesão (Figura 6).

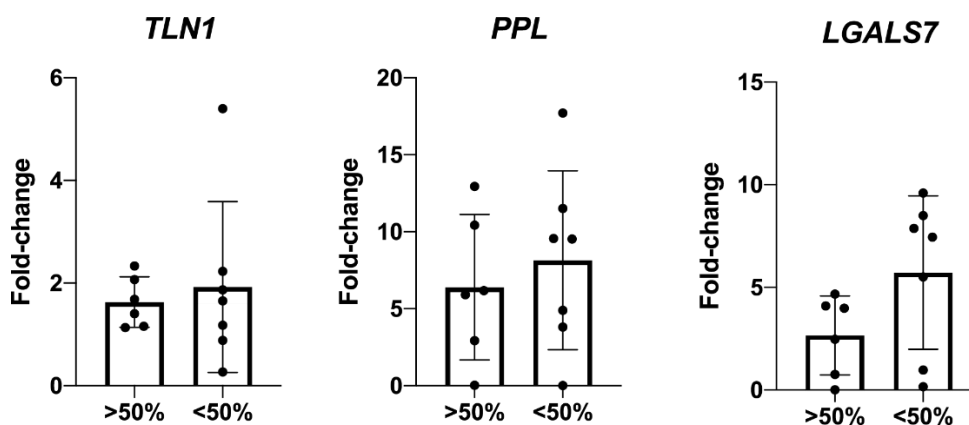


Figura 6: Expressão dos alvos *TLN1*, *PPL* e *LGALS7* em amostras de CO com mais de 50% e menos de 50% de desprendimento do epitélio da cápsula. Os dados são mostrados como a média \pm desvio padrão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, realizamos a análise da expressão gênica de alvos que estão envolvidos na adesão célula-célula e célula-MEC em CO, na tentativa de melhor compreender

as alterações moleculares envolvidas na patobiologia da lesão e, mais especificamente, com seu comportamento recidivante.

O CO apresenta diversas características que indicam uma patogênese destoante de outras lesões odontogênicas, inclusive em relação a sua origem, quando se considera COs esporádicos e COs sindrômicos. A proliferação celular acentuada e a alta taxa de recidiva indicam um comportamento mais agressivo, que necessita de abordagens mais específicas e estudos mais aprofundados. Os resultados da proteômica realizada por DINIZ e colaboradores (2020), indica a desregulação de proteínas importantes em processos de adesão e interação com a MEC, sugerindo que estas alterações podem levar ao enfraquecimento das estruturas de adesão em comparação com o funcionamento normal do tecido. A adesão célula-célula e célula-MEC no CO estaria comprometida pelas variações de marcadores essenciais para os processos envolvidos nessa adesão, podendo estar associados à alta taxa de recidiva. No presente estudo, realizamos a análise de algumas das moléculas relacionadas a processos de adesão de degradação da MEC em um número maior de CO através da técnica de RT-qPCR e comparamos com MN e também com CR.

Quando comparamos o CO com MN, nossos resultados corroboram com os resultados da proteômica, onde foi observado superexpressão de *TLN1*, *CTSD* e *FBLN1* e uma expressão reduzida de *LGALS7* e *PPL*. No entanto, apenas a alteração na expressão de *TLN1* atinge diferença estatisticamente significativa. A superexpressão da proteína Talin-1, codificada pelo gene *TLN1*, está associada a crescimento e/ou invasão de células tumorais, metástase, maior indiferenciação celular, além de poder aumentar a resistência a tratamentos medicamentosos de algumas neoplasias. (CUI et al., 2022). Em CO, o papel da Talin-1 pode estar associado mais ao comportamento agressivo/infiltrativo de algumas lesões.

Importante ressaltar que o estudo da proteômica, assim como estudos de microarray (HEIKINHEIMO *et al.*, 2015) reforça a noção que o epitélio do CO apresenta marcadores de diferenciação de epitélio escamoso. Sendo assim, comparar o CO com a MN é uma estratégia interessante para investigar as alterações moleculares associadas ao CO, fornecendo pistas sobre os possíveis alvos terapêuticos e aprimorando o entendimento da patobiologia do CO.

Para melhor compreender o papel dos genes alvos no comportamento biológico do CO, comparamos a expressão gênica com CR, um cisto odontogênico de natureza distinta revestido por epitélio escamoso. Quando comparado com o CR, é possível identificar a superexpressão de fatores envolvidos tanto nos papéis de adesão, quanto de interação com a MEC e proliferação celular. Os resultados mostram diferença na expressão dos *LGALS7* e *PPL*. A galectina 7, codificada pelo gene *LGALS7*, participa em diversos processos intra e

extracelulares em tecidos normais, controlando apoptose, migração e adesão celular, além do processo de reepitelização de feridas e modulando a expressão de MMP-2 ou MMP-9. Em processos patológicos pode atuar tanto no desenvolvimento quanto no impedimento da progressão do tumor (SEWGOBIND; ALBERS; PIETERS, 2021). Considerando seu papel na regulação de proliferação, diferenciação e migração de queratinócitos, a galectina 7 se encontrar aumentada no CO pode indicar sua participação no crescimento acentuado do CO em relação ao CR, além de uma possível associação com a expressão de metaloproteinases, interferindo também na interação com a MEC. De fato, a desregulação de MMPs é extensivamente reportada em CO (AMM *et al.*, 2014; ORTIZ-GARCÍA *et al.*, 2022).

O PPL, também superexpresso no CO quando comparado com o CR, participa ativamente na estrutura do desmossomo. Os terminais N são responsáveis por junções celulares e outras ligações de membrana, enquanto os terminais C interagem com filamentos intermediários de proteína (BOCZONADI; MÄÄTTÄ, 2016). O CO apresenta uma quantidade maior de desmossomos, mas eles se encontram mais fracos e danificados em comparação com tecidos normais e outras lesões, de forma mais acentuada em regiões de proliferação mais intensa, camada basal e suprabasilar. O aumento do PPL pode estar relacionado com a maior quantidade de desmossomos encontrados no CO que, apesar da grande quantidade, apresentam danos estruturais e deficiências funcionais (RAJU; WADHWAN; CHAUDHARY, 2014).

Para melhor entender o papel dos genes alvos associados com adesão celular e degradação da MEC em CO, nós comparamos amostras com alto desprendimento do epitélio da cápsula (>50%) com aquelas com epitélio completamente aderido ou pouco desprendido (<50%). Nossos resultados revelam a redução dos alvos TLN1, LGALS7 e PPL em CO com menos de 50% de desprendimento epitélio-cápsula. No entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. A tendência de redução dessas moléculas, associado à ausência de cristas epiteliais na interface com o conjuntivo, podem estar relacionadas a maior chance de desprendimento do epitélio da capsula e, em última instância, aumentando a probabilidade de retenção de células no local da ferida cirúrgica, facilitando a recidiva. Perspectivas futuras para a pesquisa incluem o aumento do número de amostras analisadas, a fim de fortalecer ainda mais os resultados obtidos. Além disso, é importante correlacionar os dados moleculares com informações clínicas, como a recorrência da lesão nos pacientes. Essa correlação pode fornecer insights valiosos sobre a relação entre a expressão dos genes estudados e o comportamento clínico do CO.

Como discutido anteriormente, TLN1, LGALS7 e PPPL podem ter papéis distintos no comportamento celular, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Estudos adicionais

dessas moléculas no contexto do CO podem ajudar a compreender a relação delas com atividades de adesão ou outras atividades como proliferação ou migração. Uma perspectiva importante seria a identificação da localização dos alvos moleculares nas regiões de desprendimento do epitélio cístico. A utilização de técnicas de imunohistoquímica pode auxiliar nessa identificação, fornecendo dados relevantes sobre a distribuição dos componentes moleculares nas diferentes áreas com características histopatológicas distintas, como áreas de maior proliferação celular ou de desprendimento epitélio-cápsula.

Um fator interessante deste estudo é o uso de amostras FFPE, o que permitiu uma correlação direta entre os dados moleculares e as características histológicas da lesão. Ao utilizar o mesmo bloco FFPE para a análise histológicas e para extração de RNA, foi possível investigar alterações moleculares no tecido que corresponde exatamente ao observado nas colorações com HE.

No entanto, é importante ressaltar que este estudo possui algumas limitações. O número de amostras analisadas foi restrito, o que pode limitar a generalização dos resultados. Além disso, não foram correlacionados os dados moleculares com os desfechos clínicos dos pacientes, como a recidiva da lesão. Portanto, estudos adicionais com um maior número de amostras e uma análise mais aprofundada, utilizando da imunohistoquímica e da associação com marcadores de proliferação, por exemplo, são necessários para ampliar nossa compreensão da patogênese do CO e a relevância clínica dos nossos achados.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo mostrou alterações na expressão de TLN1, PPL e LGALS7 em CO, corroborando a análise proteômica publicada anteriormente. Essas moléculas desempenham diversas funções em contextos fisiológicos e patológicos. Em CO, TLN-1 e LGALS7 podem estar associados à perda da adesão epitélio-cápsula, mas também a comportamento patológico, como proliferação e migração. Alteração em PPL pode refletir alterações na abundância e estrutura dos desmossomos em CO. Pesquisas experimentais adicionais como a imunomarcagem de talin-1, galectina-7 e periplakin, em um maior número de amostras, podem colaborar com um maior esclarecimento o papel dessas moléculas no contexto do CO.

REFERÊNCIAS

- ADVEDISSIAN, T.; DESHAYES, F.; VIGUIER, M. Galectin-7 in epithelial homeostasis and carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**. 2017.
- AMM, H. M. et al. Matrix metalloproteinase expression in keratocystic odontogenic tumors and primary cells. **Connect Tissue Res**. p. 97–101. 2014.
- BERNARDI, L. et al. Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. **Journal of Endodontics**. 2015.
- BOCZONADI, V.; MÄÄTTÄ, A. Functional Analysis of Periplakin and Envoplakin, Cytoskeletal Linkers, and Cornified Envelope Precursor Proteins. **Methods in Enzymology**. P. 309–329. 2016.
- CHANDRASHEKAR, C. et al. Odontogenic keratocyst: Analysis of recurrence by AgNOR, p53 and MDM2 profiling. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**. V. 24, n. 1, p. 184. 2020.
- CUI, D. et al. Identification of TLN1 as a prognostic biomarker to effect cell proliferation and differentiation in acute myeloid leukemia. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1. 2022.
- DE ANDRADE SANTOS, P. P. et al. Immunohistochemical analysis of MMP-13 and EMMPRIN in epithelial odontogenic lesions. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 276, n. 11, p. 3203–3211. 2019.
- DINIZ, M. G. et al. Deregulation of desmosomal proteins and extracellular matrix proteases in odontogenic keratocyst. **Oral Diseases**, v. 27, n. 4, p. 952–961. 2021.
- GLONDU, M. et al. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 21, p. 5127–5134. 2002.
- GUO, Y. Y. et al. PTCH1 Gene Mutations in Keratocystic Odontogenic Tumors: A Study of 43 Chinese Patients and a Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10. 2013.
- HARIKRISHNAN, K. et al. Cell Derived Matrix Fibulin-1 Associates With Epidermal Growth Factor Receptor to Inhibit Its Activation, Localization and Function in Lung Cancer Calu-1 Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 3 jul. 2020.
- HEIKINHEIMO, K. et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 1, p. 101–111. 2015.

- JABBARZADEH, M. et al. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**. 2021
- JOHNSON, N. R. et al. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. **Journal of investigative and clinical dentistry**. 2014
- KAHRAMAN, D.; GUNHAN, O.; CELASUN, B. A series of 240 odontogenic keratocysts: Should we continue to use the terminology of ‘keratocystic odontogenic tumour’ for the solid variant of odontogenic keratocyst? **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 6, p. 942–946. 2018.
- KARACA, Ç. et al. Recurrence rate of odontogenic keratocyst treated by enucleation and peripheral ostectomy retrospective case series with up to 12 years of follow-up. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 4, p. e443–e448. 2018.
- MOHANTY, S. et al. Surgical management of the odontogenic keratocyst: A 20-year experience. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 9, p. 1168–1176.2021.
- MYOUNG, H. et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 91, n. 3, p. 328–333. 2001.
- NAINANI, P.; SIDHU, G. K. 19. Radicular Cyst –An Update with emphasis on Pathogenesis. **Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research**. 2014
- ORTIZ-GARCÍA, J. Z. et al. Expression level and proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in dental follicles, dentigerous cysts, odontogenic keratocysts and unicystic ameloblastomas. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 12, n. 3, p. 339–342. 2022.
- RAJU, P.; WADHWAN, V.; CHAUDHARY, M. Desmosomes: A light microscopic and ultrastructural analysis of desmosomes in odontogenic cysts. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**. 2014.
- SEWGOBIND, N. V.; ALBERS, S.; PIETERS, R. J. Functions and inhibition of galectin-7, an emerging target in cellular pathophysiology. **Biomolecules**. 2021
- SHAHELA, T. et al. Immunohistochemical expression of pcna in epithelial linings of selected odontogenic lesions. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2615–2618. 2013.
- STOELINGA, P. J. W. The odontogenic keratocyst revisited. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2022.

STOKKE, T. Osmotic pressure in odontogenic cysts. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 14, n. 1, p. 65–78, 1956.

ZAIDI, N. et al. Cathepsin D: A cellular roadmap. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2008

ANEXOS**Anexo 1**

Protein	Gene	Log2 fold change (OKC/NOM)
Cathepsin D	<i>CTSD</i>	1.53
Fibulin-1	<i>FBLN1</i>	3.34
Galectin-7	<i>LGALS7</i>	-4.27
Periplakin	<i>PPL</i>	-2.77
Talin-1	<i>TLN1</i>	2.24

Desregulação das proteínas desmossomais e proteases da MEC no CO (DINIZ, 2022)