

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA

Alline Teixeira Valeriano

ANÁLISE MOLECULAR DA “MATRIX METALLOPROTEINASE 13” EM  
AMELOBLASTOMAS

BELO HORIZONTE

2023

ALLINE TEIXEIRA VALERIANO

ANÁLISE MOLECULAR DA “MATRIX METALLOPROTEINASE 13” EM  
AMELOBLASTOMAS

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz

BELO HORIZONTE

2023

V163a Valeriano, Aline Teixeira.  
Análise molecular da "Matrix Metalloproteinase 13" em ameloblastomas [recursos eletrônicos]. / Aline Teixeira Valeriano. - - Belo Horizonte: 2023. 48 f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Marina Gonçalves Diniz.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ameloblastoma. 2. Metaloproteinase 13 da Matriz. 3. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno. 4. Dissertação Acadêmica. I. Diniz, Marina Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WU 280



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### ANÁLISE MOLECULAR DA "MATRIX METALLOPROTEINASE 13" EM AMELOBLASTOMAS

**ALLINE TEIXEIRA VALERIANO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dois de maio de dois mil vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes professoras doutoras:

Marina Gonçalves Diniz - Orientadora  
UFMG

Sílvia Ferreira de Sousa  
UFMG

Roberta Rayra Martins Chaves  
FCMMG

Belo Horizonte, 2 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Rayra Martins Chaves, Usuário Externo**, em 02/05/2023, às 13:55, 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 **Sílvia Ferreira de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 14:04, 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 Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 15:45, 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?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 **2241760** e o código CRC **7A80C97E**.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Luciana. Sou eternamente grata pelo amor incondicional, por fazerem de tudo por mim e por me apoiarem nas minhas decisões. Nunca mediram esforços para investir na minha formação e sempre procuram me proporcionar o máximo de conforto possível. Não há palavras para descrever minha gratidão a vocês. Ao meu irmão, Lucas, pelo apoio, amor e compreensão.

À Marina Diniz, sou muito grata por você ter sido minha orientadora.

Muito obrigada pela paciência e dedicação ao longo desse projeto.

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

Agradeço também a agência de fomento CNPq que financiou minha bolsa de mestrado durante o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico benigno de origem epitelial. Possui um comportamento agressivo, infiltrativo e destrutivo. O tratamento preconizado é ressecção cirúrgica com margem de segurança para reduzir a chance de recidiva. Essa abordagem terapêutica resulta em deformação facial e comprometimento estético. Tem sido reportado a presença de mutação *BRAF p.V600E* em ameloblastomas e essa alteração genética geralmente resulta na ativação constitutiva da via MAPK/ERK permitindo a desregulação de processos celulares, dentre eles a proliferação celular. Apesar da elevada frequência da alteração da via MAPK/ERK em ameloblastomas, não se sabe qual o impacto da desregulação dessa via na patobiologia dessas lesões. Acredita-se que a ativação constitutiva da via MAPK pode levar ao aumento da expressão de proteínas modeladoras da matriz extracelular, como a MMP13, enzima associada a invasão de células neoplásicas. No presente estudo, investigamos a expressão da MMP-13 em amostras de ameloblastomas através da RT-qPCR. A atividade enzimática da MMP-13 foi analisada usando o ensaio de Zimografia. Ensaio de Western Blotting foram conduzidos para análise da atividade da via MAPK, através da detecção do efector fosforilado pERK, e para possível correlação entre a atividade pERK e expressão da proteína MMP13. Nosso estudo mostra a superexpressão gênica de MMP-13 em ameloblastoma (12/12) comparadamente à mucosa normal. A atividade colagenolítica dessa MMP foi observada em todas as amostras analisadas (7/7). A ativação da via MAPK foi detectada nos ameloblastomas (7/7), independente do status da mutação *BRAF p.V600E*. Uma possível associação entre a ativação da via MAPK/ERK com a expressão de MMP-13 em ameloblastomas não foi observada. Novos estudos são necessários para esclarecer o impacto da via MAPK na regulação da expressão de MMP-13 e no comportamento invasivo dos ameloblastomas.

Palavras-chave: Tumor odontogênico, Ameloblastoma, Matriz Metaloproteinases, MMP-13, MAPK

## ABSTRACT

Ameloblastoma is a benign odontogenic tumor of epithelial origin. It might have aggressive, infiltrative and destructive behavior. The recommended treatment is surgical resection with a safety margin to reduce the chance of recurrence. This therapeutic approach results in facial deformation and aesthetic impairment. The presence of *BRAF p.V600E* mutation in ameloblastomas has been extensively reported and this genetic alteration leads to constitutive activation of the MAPK/ERK pathway, culminating in dysregulation of cellular processes, such as cell proliferation. Despite the high frequency of alterations in the MAPK/ERK pathway in ameloblastomas, the impact of this finding on the biology of these lesions is unknown. It is believed that the constitutive activation of the MAPK pathway can lead to increased expression of proteins that degrades the extracellular matrix, such as MMP13, an enzyme associated with the invasion of neoplastic cells. In the present study, we investigated the expression of MMP-13 in ameloblastoma samples using RT-qPCR. The enzymatic activity of MMP-13 was analyzed using Zymography assay. Western Blotting assays were conducted to analyze the activity of the MAPK pathway, through the detection of the phosphorylated effector pERK, and for a possible correlation between pERK activity and MMP13 protein expression. Our study shows high levels of mRNA MMP-13 in ameloblastoma (12/12) compared to paired normal mucosa. The collagenolytic activity of this MMP was observed in all samples analyzed (7/7). Activation of the MAPK pathway was detected in ameloblastomas samples (7/7), regardless of *BRAF p.V600E* mutation status. An association between MAPK/ERK pathway activation and MMP-13 protein expression in ameloblastomas was not observed. Further studies are needed to clarify the impact of the MAPK pathway on the regulation of MMP-13 expression and the role of MMPs in the invasive behavior of ameloblastomas.

Keywords: Odontogenic tumor, Ameloblastoma, Matrix Metalloproteinases, MMP-13, MAPK

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação simplificada da cascata MAPK raf-raf-mek1/2 erk1/2.....	15
Figura 2 Representação esquemática simplificada dos domínios comuns as MMPs.....	17
Figura 3 Expressão relativa do gene <i>MMP-13</i> nas amostras de ameloblastomas (AM) e mucosa normal (MN) em ordem decrescente.....	26
Figura 4 Bandas de degradação em gel de colágeno evidenciando a atividade colagenolítica das amostras de ameloblastoma.....	27
Figura 5 Representação da atividade total (proMMP-13 e MMP-13 ativa) nas sete amostras de ameloblastomas em ordem decrescente.....	27
Figura 6 Representação da atividade separada, proMMP-13 e MMP-13 ativa, nas sete amostras de ameloblastomas.....	28
Figura 7 Blotting para MMP-13, p.ERK e ERK.....	29
Figura 8 Relação entre os valores de densitometria das bandas referente a p. ERK / ERK total e MMP-13.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados clínicos e moleculares das amostras e técnicas utilizadas no estudo para cada amostra.....	24
---	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Ameloblastoma: conceitos iniciais, características clínicas, histológicas e radiográficas.....	12
2.2 Via de sinalização MAPK.....	14
2.2.1 Via de sinalização MAPK e Ameloblastomas.....	15
2.3 Metaloproteinases da Matriz.....	16
2.3.1 Metaloproteinase da matriz 13 e ameloblastomas .....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral .....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 METODOLOGIA.....	19
5 RESULTADOS.....	22
6 DISCUSSÃO.....	29
7 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
APÊNDICE.....	38

## 1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é o tipo mais frequente de tumor odontogênico, no entanto, os potenciais fatores de risco para o desenvolvimento dessa lesão não são completamente conhecidos (KREPPPEL et al., 2018). Apresenta comportamento agressivo e destrutivo e, portanto, o tratamento preconizado é a ressecção cirúrgica, resultando em deformação facial e comprometimento estético (FUCHIGAMI et al., 2021). Tem sido reportado a presença de mutação *BRAFV600E* em ameloblastomas (BROWN et al., 2015; DINIZ et al., 2015) e essa alteração genética resulta na ativação constitutiva da via MAPK/ERK, permitindo a desregulação de processos celulares, dentre eles a proliferação celular excessiva (YUSOF et al., 2022). Apesar da elevada frequência da alteração da via MAPK/ERK em ameloblastomas, não se sabe qual o impacto da desregulação dessa via na biologia dessas lesões.

A via de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), regula diversos processos celulares tais como crescimento, diferenciação, proliferação, apoptose e motilidade através da transmissão de sinais extracelulares para respostas intracelulares. Na via MAPK prototípica Ras-Raf-MEK-ERK1/2, a ativação de uma família de receptores de superfície celular tirosina-quinases ativa proteínas da família GTPase do tipo Ras, que incluem moléculas codificadas por *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*. Ras ativado se liga e ativa as quinases Raf, codificadas por *BRAF*, *RAF1* e *ARAF*. A Raf fosforila e ativa MEK1/2, que por sua vez fosforila e ativa ERK1/2 (CAMPBELL et al., 1998; MARSHALL 1996). As ERKs fosforilam uma vasta gama de substratos no núcleo, como efetores de sinalização e fatores de transcrição e no citosol (YOON & SEGER 2006), incluindo proteínas citoesqueléticas, receptores e proteínas quinases.

Em um estudo prévio realizado em parceria com o centro de Pesquisas René Rachou-MG, realizamos a técnica de RNAseq para comparar o transcriptoma de quatro amostras de ameloblastomas-*BRAF p.V600E* com amostras normais de mucosa oral utilizando a plataforma SOLID (ThermoScientific). As análises de bioinformática apontaram uma relevante regulação positiva de genes relacionados com a degradação da matriz extracelular (MEC) nos tumores. Dentre os genes expressos de forma aberrante, destaca-se a superexpressão de MMP-13 (Matriz metaloproteinase 13, colagenase 13) (APÊNDICE).

Apesar da alteração em genes da via MAPK ser frequente em ameloblastomas, não se sabe qual o impacto da desregulação da via na patobiologia das lesões odontogênicas. Diante disso, levantamos a hipótese de que a ativação constitutiva da via MAPK em ameloblastomas poderia

regular a expressão de proteínas remodeladoras da matriz extracelular (MEC), como a MMP-13. A inibição desta via poderia bloquear o comportamento de invasão dessas lesões em tecidos adjacentes. Sabe-se que os ameloblastomas possuem grande potencial destrutivo e uso de inibidores da via MAPK pode reduzir a expressão global de genes alvos relacionados com a agressividade destes tumores. No presente trabalho foi validada a expressão gênica de MMP-13, e reportada sua atividade colagenolítica em amostras de ameloblastoma. Adicionalmente, foi avaliada a possível correlação entre a expressão de MMP-13 a via MAPK em amostras frescas de ameloblastomas. O trabalho ajuda a elucidar os mecanismos moleculares relacionados a patobiologia dos ameloblastomas-*BRAFV p.600E*, abrindo novas possibilidades terapêuticas para os casos mais agressivos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ameloblastoma: conceitos iniciais, características clínicas, histológicas e radiográficas

O Ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial que apresenta comportamento destrutivo com invasão local e tendência a recorrência (EL-NAGGAR et al., 2017). Embora essa lesão tenha esse comportamento invasivo e destrutivo, é considerado uma neoplasia benigna, devido à ausência de pleomorfismo celular e figuras de mitose atípica (KREPPEL et al., 2018). Esse tumor tem origem a partir do epitélio envolvido na formação dos dentes, incluindo órgão do esmalte e lâmina dentária e, portanto, possui semelhanças histológicas com essas estruturas. Até o presente momento, é desconhecido o fator que desencadeia a formação neoplásica a partir desses restos epiteliais (AGANI et al., 2019; SHI et al., 2021).

Clinicamente, o ameloblastoma apresenta-se como uma lesão expansiva indolor e de crescimento lento. Frequentemente é encontrado como achado radiográfico na rotina clínica e, em alguns casos, pode chegar a grandes dimensões, resultando em sintomatologia dolorosa e deformidade facial. Radiograficamente, apresenta-se como lesão osteolítica unilocular ou multilocular conferindo um aspecto de bolhas de sabão ou favo de mel. Além disso, pode ocorrer a presença de expansão das corticais nas faces vestibular e lingual (EL-NAGGAR et al., 2017; KREPPEL, et al., 2018). Embora possua uma baixa incidência na população geral, o ameloblastoma representa a neoplasia mais comum dentre os tumores odontogênicos, representando cerca de 18% dos diagnósticos. A maior incidência ocorre em pacientes de faixa etária entre 30-60 anos, e localização na região posterior de mandíbula. O desenvolvimento da lesão ocorre sem predileção por sexo (EL- NAGGAR et al., 2017; KREPPEL, et al., 2018).

De acordo com a classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço de 2022 da Organização Mundial da Saúde, o ameloblastoma pode ser clinicamente classificado em ameloblastoma (anteriormente sólido convencional/multicístico), ameloblastoma unicístico e extraósseo/periférico (VERED e WRIGHT, 2022). Microscopicamente, o ameloblastoma (convencional) apresenta ilhas ou cordões semelhantes ao epitélio do órgão do esmalte, células colunares com polarização invertida entremeado por estroma fibroso. Os padrões histológicos podem ser categorizados em folicular, plexiforme, acantomatoso, de células granulares, desmoplásico e de células basais (EL-NAGGAR et al., 2017). O ameloblastoma unicístico é caracterizado por um cisto simples revestido por cápsula fibrosa e possui comportamento menos agressivo. Possui epitélio ameloblástico típico revestindo a cavidade interna do cisto (AGANI

et al., 2016). O ameloblastoma unicístico corresponde a 5-22% dos diagnósticos de todos os ameloblastomas (PEREIRA et al., 2016). Histologicamente pode ser classificado em luminal, intraluminal e mural. As variantes luminal e intraluminal possuem melhor resposta ao tratamento conservador. No entanto, a variante mural possui maior taxa de recorrência, sendo necessário uma abordagem menos conservadora, à semelhança dos ameloblastomas convencionais (CADAVID et al., 2019; EL-NAGGAR et al., 2017). O ameloblastoma periférico é uma lesão exofítica com baixa incidência, correspondendo a 1-5% de todos os casos. Possui apresentação extra-óssea, ou seja, o desenvolvimento ocorre a partir dos tecidos moles (ANPALAGAN et al., 2020). Além disso, possui comportamento indolente, e, portanto, a abordagem terapêutica pode ser mais conservadora (JANARDHANAN et al., 2018). Microscopicamente, pode apresentar características histológicas variadas (EL-NAGGAR et al., 2017).

O tratamento padrão para os ameloblastomas consiste na cirurgia conservadora para ameloblastoma unicístico ou ressecção para as lesões com padrão de crescimento agressivo. No entanto, a cirurgia conservadora resulta em maior taxa de recidiva, em torno de 55% (KREPPEL et al., 2018). A cirurgia ressectiva, consiste na remoção do tumor com margem de segurança de 1,5-2cm além dos limites da lesão. Neste caso, a taxa de recidiva pode ser até 15% (DINIZ et al., 2015; KREPPEL et al 2018; SHI et al., 2021). A abordagem terapêutica de ressecção segmentar é uma cirurgia extensa que compromete a mastigação, deglutição, fonação e estética do paciente. Além disso, existe uma dificuldade na reconstrução dos extensos defeitos ósseos, e essa deformidade facial resultante dessa abordagem, causa impacto considerável na vida profissional e pessoal desses pacientes (de CAMPOS et al., 2022; HAQ et al., 2016).

Muitos estudos buscam compreender as bases moleculares da patogênese dos ameloblastomas, resultando em avanço no entendimento dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento do tumor. Em consequência disso, têm-se obtido uma melhor compreensão no diagnóstico, prognóstico e tratamento da lesão (NAGI et al., 2016; SHI et al., 2021).

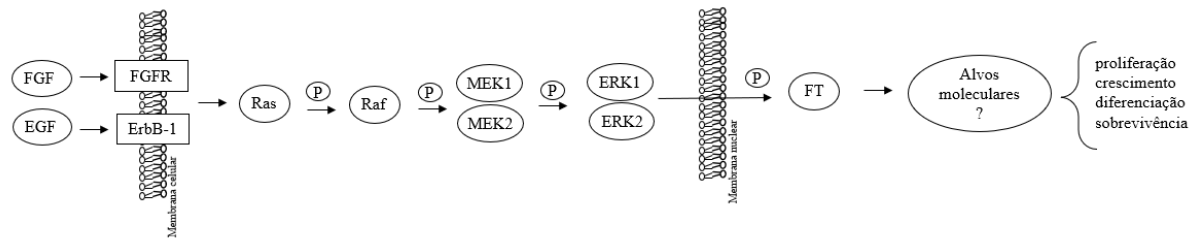
Trabalhos relevantes reportaram mutação somática recorrente em genes da via MAPK, indicando que a desregulação dessa via parece ser um evento importante na patogênese dos ameloblastomas (BROWN et al., 2014; KURPPA et al., 2014). No entanto, muito pouco foi explorado a respeito de quais são os impactos que as alterações na via MAPK tem na biologia dos ameloblastomas.

## 2.2 Via de sinalização MAPK

A via MAPK é uma via intracelular modulada por fosforilação sequencial de proteínas quinases. A ativação ocorre através de sinal extracelular que resulta em transdução de sinais dentro da célula. Uma ampla variedade de estímulos extracelulares, por exemplo hormônios, fatores de crescimento epidermal (EFG), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de necrose tumoral (TNF) podem estimular os receptores e ativar a via MAPK (DHILLON et al., 2007; KRISHNA e NARANG, 2008). Essa via regula importantes processos celulares, como proliferação, crescimento, diferenciação, migração e apoptose (DHILLON et al., 2007).

A MAPK pertence a uma família de quinases serina/treonina e tirosina que desempenham papéis importantes na sinalização celular. Os subgrupos dessa família, ERK (quinase regulada por sinal extracelular), JNK (quinase c-Jun N-terminal) e p38, são os mais bem caracterizados. Além disso, ERK foi a primeira MAPK a ser identificada, e apresenta duas isoformas ERK1 e ERK2 (GUIMARAES et al., 2021; KRISHNA e NARANG, 2008). Alterações nos componentes dessa via pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo doença de Alzheimer, Parkinson, proliferação e metástase tumoral (KIM and CHOI, 2015). A via MAPK/ERK também desempenha importante papel na odontogênese, e sua desregulação está associado a distúrbios da odontogênese e desenvolvimento de tumores odontogênicos (GUIMARAES et al., 2021)

A via de sinalização MAPK/ERK é estudada intensivamente e melhor representa a via MAPK. A sua desregulação está associada ao desenvolvimento e progressão em aproximadamente 1/3 dos cânceres em humanos (DHILLON et al., 2007). A ativação dessa cascata é mediada por fatores de crescimento externos que se ligam a receptores de superfície celular. A ativação desses receptores irá desencadear a ativação das proteínas monoméricas GTPases do tipo Ras e, em seguida, ativação das quinases Raf (Raf-1, B-Raf e A-Raf). Estas, fosforilam e ativam MEK (MEK1 e MEK2) que por sua vez irá fosforilar e ativar ERK (ERK1 e ERK 2), responsáveis por fosforilar efetores de sinalização e fatores de transcrição presentes no núcleo (DHILLON et al., 2007; ZHANG e LIU, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação simplificada da via da cascata MAPK ras-raf-mek1/2-erk1/2. A ligação de FGF e EGF em seus respectivos receptores, desencadeia a fosforilação de moléculas intracelulares, leva a atividade de ERK1/2 que desencadeia ativação de fatores de transcrição que atuam em diferentes alvos moleculares. Dentre desses alvos, sugere-se a atuação na regulação da MMP-13. FT, fatores de transcrição.

### 2.2.1 Via de sinalização MAPK e Ameloblastomas

Embora a patogênese molecular dos ameloblastomas ainda não seja totalmente conhecida, diferentes estudos têm reportado a participação da via de sinalização celular MAPK de diferentes moléculas de sinalização celular desempenhando função no desenvolvimento e progressão do tumor (GOMES et al., 2010). As mutações somáticas nos genes *FGFR2*, *RAS* e *BRAF*, correspondem a 77-88% das mutações em ameloblastomas, e resultam na ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (BROWN e BETZ, 2015). A mutação nesses genes é mutualmente exclusiva, no entanto *BRAF* e *FGFR2* apresentaram mutações concomitantes (BROWN e BETZ, 2015; SWEENEY et al. 2014). Sweeney e colaboradores (2014) encontraram 46% dos tumores com mutação em *BRAF* e 39% dos casos apresentaram mutação em *SMO*, relacionado a via de sinalização Hedgehog. Além disso, essas mutações tendem a ser mutualmente exclusivas (SWEENEY et al., 2014). Ademais, foram descritas mutações somáticas nos genes *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *CDKN2A*, *FGFR* e *CTNNB1* co-ocorrendo com *BRAF* e *SMO* em ameloblastomas convencionais (GÜLTEKIN et al., 2018).

A mutação *BRAF p.V600E* está frequentemente presente nos ameloblastomas em uma incidência de 62 - 82% dos casos (BROWN et al., 2015; CANTWELL-DORRIS et al., 2014; DINIZ et al., 2015). Essa mutação leva a substituição do aminoácido valina (V) por ácido glutâmico (E) no códon 600 e resulta na ativação constitutiva da via MAPK/ERK, levando a

desregulação de múltiplos genes e conseqüentemente a proliferação excessiva das células (BROWN et al., 2014; YUSOF et al., 2022).

A fosforilação de ERK, proteína efetora da via MAPK, atua em inúmeros alvos nucleares, por exemplo fatores de transcrição Ets, STAT, CREB, *myc* (MURPHY e BLENIS, 2006; DHILLON et al., 2007). O papel da via depende do contexto que ela está ativada, pois sua desregulação foi reportada em lesões neoplásicas benignas e malignas, e em outros processos patológicos, por exemplo lesões inflamatórias (MARTINS-CHAVES et al., 2020; FRIEDRICH et al., 2021). Compreender o papel contexto-específico das mutações oncogênicas é de extrema importância para a compreensão da oncogênese, além de ser fundamental para racionalizar possibilidades terapêuticas.

### 2.3 Metaloproteinases da matriz

As metaloproteinases da matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*) são um grupo de endopeptidases zinco-dependente que atuam no processo de remodelação da matriz extracelular (MEC). Essa denominação é devido a necessidade de íons metálicos para execução de suas atividades catalíticas. Essas proteínas podem clivar uma variedade de substratos da MEC, incluindo fibras colágenas, proteínases, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular (INANC et al., 2017; KONDRATIEV et al., 2008). Até o presente momento foram identificadas 23 metaloproteinases humanas e estas são classificadas de acordo com sua estrutura e especificidade do substrato, a saber: colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2 and MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 and MMP-11), matrilisinas (MMP-7 and MMP-26) e MMPs de transmembrana (MT-MMPs) e outras (BROWN et al., 2015; LI e YU, 2022).

A estrutura básica consiste na presença de um pro-domínio, que possui um resíduo cisteína, um domínio catalítico, que possui íon metálico, uma região hinge e um domínio hemapexina (VISSE e NAGASE, 2003) (Figura 2) As MMPs são secretadas para o meio extracelular na forma inativa/latente, denominada zimogênio. Nesta forma, o resíduo cisteína está associado com o íon zinco, impedindo sua ligação ao substrato. Uma mudança conformacional dessa associação resulta na liberação do sítio catalítico, permitindo atividade enzimática no substrato (BASSIOUNI 2021; VISSE e NAGASE, 2003; PAGE-MCCAW et al., 2007). As MMPs são sintetizadas por monócitos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e células tumorais. A ativação dessas enzimas ocorre no ambiente extracelular por proteínases ou agentes químicos, por

exemplo, SDS, agentes caotrópicos e oxigênios reativos (VISSE e NAGASE, 2003; BASSIOUNI 2021).

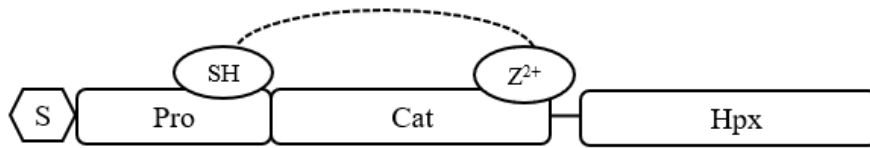


Figura 2. Representação esquemática simplificada dos domínios comuns as MMPs. S, sinal peptídeo; Pro, pró-peptídeo; SH, grupo tiol; Cat, catalítico, Zn, zinco; Hpx, hemopexina

As proteínas MMPs atuam de forma regulada em processos fisiológicos como embriogênese, remodelação e reparo tecidual, ovulação e angiogênese. Essa regulação fisiológica ocorre principalmente pela ação das TIMPs (inibidor fisiológico) e, portanto, a atividade das MMPs é resultado do balanço entre a expressão da MMP/TIMP. Em situações patológicas, ocorre aumento da expressão das MMPs, que nestes casos, podem atuar em processos inflamatórios, artrite reumatoide, progressão e metástase tumoral (STAMENKOVIC, 2000; VISSE e NAGASE, 2003). No entanto, estudos têm demonstrado que existe uma maior complexidade na função das MMPs em tumores, pois o aumento de sua atividade tem sido associado com progressão ou inibição destes. Isso sugere que sua função pode ser dependente do microambiente envolvido (COUSSENS 2002; PAGE-MCCAW et al., 2007).

Nesse contexto, estudos têm relacionado o aumento da expressão de MMP-13 (Matriz metaloproteinase 13, colagenase 13) em câncer de mama, colorretal, próstata, mieloma múltiplo e câncer de cabeça e pescoço. Além disso, há evidências do aumento de expressão dessa proteína com aumento da invasão do tumor, agressividade e pior prognóstico (LI e YU, 2022).

### 2.3.1 Metaloproteinase da matriz 13 e ameloblastomas

Em um estudo prévio do nosso grupo, em parceria com o centro de Pesquisas René Rachou-MG, foi realizada a técnica de RNAseq com o objetivo de analisar o transcriptoma de amostras de ameloblastomas com mutação, utilizando a plataforma SOLID (ThermoScientific). Foram utilizadas quatro amostras de ameloblastomas e quatro amostras de mucosa normal pareadas. A análise do transcriptoma revelou 146 genes diferentemente expressos nas amostras de

ameloblastoma (apêndice A). Dentre os genes consistentemente expressos nas amostras de ameloblastoma, destaca-se a *MMP-13* (Log2 fold change de 3,60).

Estudos têm descrito que a região promotora AP-1 do gene *MMP-13* é ativada através dos fatores de transcrição c-jun e c-fos, e estes respondem aos sinais da cascata MAPK ras-raf-mek-erk. (SAIGANESH et al., 2018; YAN e BOYD, 2007). Foi observado um aumento da expressão de MMP-13 em cultura de melanócitos estimuladas com EGF. Os fatores de crescimento EGF e FGF são os principais reguladores da cascata MAPK (DINIZ et al., 2017). E, previamente, foi reportado que a expressão de FGF contribui para a proliferação de células de ameloblastoma imortalizadas através da fosforilação de ERK1 e ERK2 (NAKAO et al., 2013). Além disso, células de cultura primária de ameloblastomas tratadas com EGF apresentaram maior taxa de migração, invasão e secreção de metaloproteinasas (da ROSA et al., 2014). Além disso, os autores demonstraram a diminuição da expressão de MMP-13 após a utilização de inibidor de MEK, evidenciando o papel da via MAPK na expressão da MMP-13 em melanócitos (MEIERJOHANN et al., 2010). da Rosa e colaboradores (2014) observaram em um estudo com cultura primária de ameloblastoma, que as células tratadas com EGF apresentaram aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 evidenciando que a sinalização ativada por EGFR provavelmente regula a secreção de MMPs. Goda H e colaboradores (2015) avaliaram as características genéticas de ameloblastomas usando análise de microarray e encontraram aumento de expressão de 192 genes, e dentre estes, a MMP-13.

Alterações nos constituintes da via MAPK tem sido associado aos ameloblastomas. Inclusive, novas estratégias têm sido direcionadas para os componentes da via MAPK como alvo terapêutico, principalmente em casos de aparecimento de ameloblastomas recorrentes (FUCHIGAMI et al., 2021; GOMES et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto da via MAPK na biologia dessa lesão. A via MAPK é conhecida como uma via mitogênica, e a proliferação celular descontrolada das células neoplásicas do ameloblastoma poderia ser impulsionada principalmente por alteração na via de sinalização MAPK. Além disso, o aumento da expressão da MMP-13 poderia ser uma resposta a ativação constitutiva da via MAPK em ameloblastoma.

Nesse contexto, um estudo avaliando a MMP-13 nos ameloblastomas pode contribuir para entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a patobiologia dessas lesões. E, fornecer novos mecanismos de desenvolvimento de tratamento terapêutico para os casos mais agressivos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Investigar o papel da MMP-13 na patobiologia dos ameloblastomas.

#### 3.2 *Objetivo específico*

- Validar a expressão de MMP-13 em amostras de ameloblastoma por RT-qPCR comparado a mucosa normal.
- Analisar a atividade da MMP-13 em amostras de ameloblastoma através da Zimografia.
- Avaliar a expressão de proteínas efetoras da via de sinalização MAPK/ERK em amostras de ameloblastomas utilizando Western Blotting.
- Correlacionar a ativação da via MAPK/ERK com a atividade da MMP-13 em ameloblastomas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Seleção das amostras

Dezenove amostras frescas foram incluídas no estudo, sendo 16 ameloblastomas e 6 amostras de mucosa normal. Todas as amostras foram obtidas durante biópsias incisionais ou excisionais, armazenadas em solução de RNA lator (Ambion, Austin, TX, EUA) e mantidas em nitrogênio líquido para extração de RNA e proteína. Espécimes cirúrgicos correspondentes foram enviados para histologia de rotina para confirmação do diagnóstico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 4.2 RT-qPCR

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) foi usada para quantificar a expressão do gene *MMP-13*. O RNA total foi extraído de 16 amostras usando o reagente TRIzol™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi determinada usando espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher). O cDNA foi sintetizado usando o SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As reações foram realizadas com Power Up SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, EUA). Os primers específicos foram desenhados com ajuda da ferramenta de bioinformática Primer3Plus (acesso: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). A eficiência de amplificação de todos os primers foi testada e uma eficiência de 90 a 110% foi considerada. As seguintes sequências de primers foram usados no experimento: MMP13 For GGAATTGGTGATAAAGTAGATGCTG; Rev ACGCGAACAATACGGTACTC; HPRT1 For: TGACACTGGCAAACAATGCA Rev: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT. O gene HPRT1 foi utilizado como endógeno. Amostra de mucosa normal foi usada como calibrador. Os experimentos foram realizados em duplicata e executados em instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A fórmula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  foi usada para análise de expressão relativa. 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. O nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Extração de proteína

A proteína total foi extraída de sete amostras. Os tecidos foram moídos em um pilão e, em seguida, foram adicionados o buffer RIPA (Sigma-Aldrich), o inibidor de fosfatase (Cocktail o Inibidor de Fosfatase 2 P5726 - Sigma-Aldrich) e o inibidor de protease (Sigma-Aldrich). A quantificação da proteína total foi realizada usando o fluorômetro Qubit 3.0 com o Qubit Protein Assay® (Thermo Fisher Scientific, EUA).

#### 4.5 Ensaio de zimografia

O ensaio de Zimografia foi feito para avaliar a atividade colagenolítica da MMP-13 em sete amostras de ameloblastomas. O gel de separação de 7,5% foi preparado com colágeno em uma concentração de 5,4 µg/ml. As amostras foram preparadas usando 3 µg de proteína, 5 µl de buffer de amostra 2x (Laemmli Sample Buffer 2X Bio-Rad Laboratories Inc, EUA) e água para injeção, obtendo um volume final de 10 µl. As amostras e o padrão de corrida (Spectra Multicolor Broad Range Protein Lader ThermoFisher Scientific, EUA) foram adicionados aos poços.

A eletroforese foi realizada em gelo, com tensão em 150V e corrente livre (Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio-Rad Laboratories Inc, EUA). O tempo médio de corrida foi de quatro horas. Após a corrida, o gel foi removido da placa e lavado 2x em solução contendo 2% de Triton X-100 (USB Corporation, EUA) sob agitação suave. Em seguida, lavado em água milli-Q e incubado em uma solução contendo cofatores de ativação por 30 min sob agitação suave. Em seguida, essa solução foi descartada e uma nova solução foi adicionada. O gel foi mantido incubando à 37°C por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com uma solução contendo 0,1% de Coomassie Blue R-250 (Vetec Química Fina LTDA, Brasil) overnight. Depois, a solução de descoloração contendo metanol foi usada para remover o excesso de corante e permitir a visualização das bandas de degradação, representadas pelas áreas claras e transparentes no gel.

O gel foi escaneado, as bandas da imagem foram capturadas e depois analisadas com o software de acesso livre ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012).

#### 4.6 Ensaio de Western Blotting

O Western Blotting foi utilizado para avaliar a expressão de proteína MMP-13 em amostras de ameloblastoma. Foram utilizadas 40 µg de proteínas de amostras de ameloblastoma. Cada amostra foi preparada com 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Califórnia, EUA) e completadas com água de injeção para volume final de

24ul. Em seguida, foram incubadas cinco minutos à 100° C. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em gelo, com voltagem de 150V e corrente livre (Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio-Rad Laboratories Inc, EUA). O tempo médio de execução foi de quatro horas. Em seguida, as proteínas foram transferidas para a membrana de polivinilideno fluoride (PVDF). Os componentes para a transferência foram montados e, esta, ocorreu em voltagem constante de 100V em gelo.

Anticorpos primários contra MMP-13 (anticorpo policlonal diluído 1:1000, ab39012 Abcam Inc, EUA), pERK(anticorpo monoclonal diluído 1:1000, 9101 Cell Signaling Technology, EUA) , ERK total (anticorpo monoclonal diluído 1:1000, 9102 Cell Signaling Technology, EUA) e GAPDH (anticorpo monoclonal diluído 1:1000, 14C10 Cell Signaling Technology, EUA) foram adicionados à membrana. O período de incubação de overnight ocorreu para MMP-13, p.ERK e ERK total a 8°C enquanto para o GAPDH foi de uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes com Tampão fosfato-salino ou Solução Salina Tamponada com Tris e tween-20 a 0,1% durante 5 minutos por 3x e incubada com anticorpo secundário (anti-mouse Ig HRP ligado diluído 1:1000). As bandas foram detectadas usando o kit de detecção quimioluminescente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA) e com auxílio do equipamento iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, EUA). A densidade óptica das bandas foram analisadas com o software de acesso livre ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para a distribuição dos dados (paramétrica ou não paramétrica). A significância estatística entre os grupos foi calculada utilizando o teste de correlação de Spearman ou coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### *Dados clínicos das amostras*

A média de idade dos casos selecionados foi de 27 anos (variando entre 10 e 63 anos) e a maioria do sexo feminino (1,8 mulheres: 1 homem). Todas as lesões estavam localizadas na região posterior de mandíbula. Foram utilizadas 16 amostras de ameloblastomas e, destas, oito foram classificadas como ameloblastoma multicístico, cinco como ameloblastoma unicístico e três casos não possível obter a classificação. Em 8 casos o status da mutação *BRAFV600E* foi recuperado de estudos anteriores do grupo. A Tabela 1 mostra em detalhes as características clínicas, moleculares e quais amostras foram utilizadas em cada experimento. Devido a quantidade insuficiente de material, não foi possível utilizar as mesmas amostras em todos os experimentos.

Tabela 1. Dados clínicos e moleculares das amostras e técnicas utilizadas no estudo para cada amostra

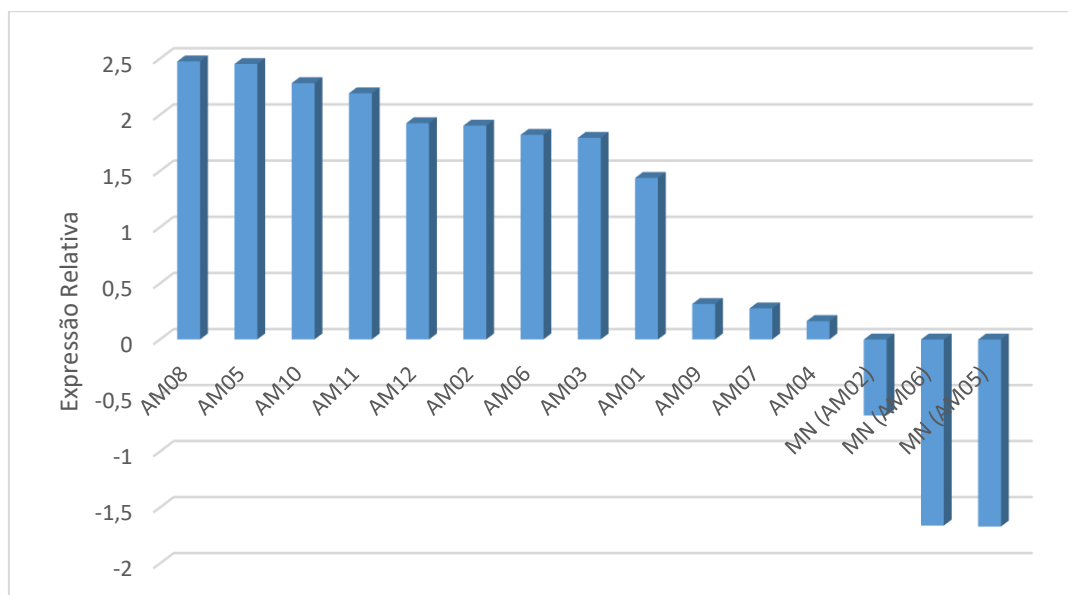
Amostras	Sexo	Idade	Localização	Classificação	Status BRAF V600E	Experimentos			
						RNAseq	RT-qPCR	Zimografia	WB
AM1	F	34	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	NA	x	x		
AM2	F	27	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	NA	x	x		
AM3	F	18	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	NA	x	x	x	x
AM4	F	35	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	Mut	x	x		
AM5	M	28	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	Mut		x	x	x
AM6	F	22	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	Mut		x		
AM7	M	NI	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	NA		x		
AM8	F	39	posterior mandíbula	ameloblastoma multicístico	Mut		x		
AM9	F	33	posterior mandíbula	ameloblastoma unicístico	Mut		x	x	x
AM10	F	10	posterior mandíbula	ameloblastoma unicístico	Selvagem		x		
AM11	F	10	posterior mandíbula	ameloblastoma unicístico	Mut		x		
AM12	F	11	posterior mandíbula	ameloblastoma unicístico	Mut		x		

AM13	M	63	posterior mandíbula	ameloblastoma	NA		x	x
AM14	F	18	posterior mandíbula	ameloblastoma unicístico	NA		x	x
AM15	M	28	posterior mandíbula	ameloblastoma	NA		x	x
AM16	M	62	posterior mandíbula	ameloblastoma	NA		x	x
MN01 (AM05)	M	28		mucosa normal				x
MN02 (AM02)	F	27		mucosa normal		x		x
MN03 (AM06)	F	22		mucosa normal				x
MN04 (AM01)	F	34		mucosa normal		x		x
MN05 (AM03)	F	18		mucosa normal		x		
MN06 (AM04)	F	35		mucosa normal		x		

Mut, Mutado; F, Feminino; M, Masculino; NA, não analisado;

### Análise da expressão gênica de MMP-13

Previamente, um estudo do transcriptoma revelou superexpressão de MMP-13 em 4 amostras de ameloblastoma. No presente trabalho, o ensaio de RT-qPCR foi realizado para validar a expressão de MMP-13 em um número maior de amostras de ameloblastomas. Para isso, foram utilizadas 12 amostras de ameloblastoma, e dentro desse grupo, estavam as amostras utilizadas no RNAseq (#AM01, #AM02, #AM03 e #AM04). Além disso, quatro amostras de mucosa normal pareadas foram usadas como controle. Os resultados do RT-qPCR confirmam o aumento de expressão do gene MMP-13 comparado com mucosa normal em 12/12 amostras ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).

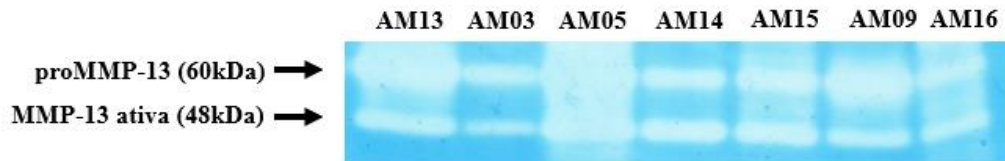


**Figura 3.** Expressão relativa do gene *MMP-13* nas amostras de ameloblastomas (AM) e mucosa normal (MN) em ordem decrescente. Foram utilizadas 12 amostras de ameloblastoma e quatro amostras de mucosa normal pareadas. A amostra MN04 (AM01) foi utilizada como calibrador (eixo x). AM, ameloblastoma; MN, mucosa normal.

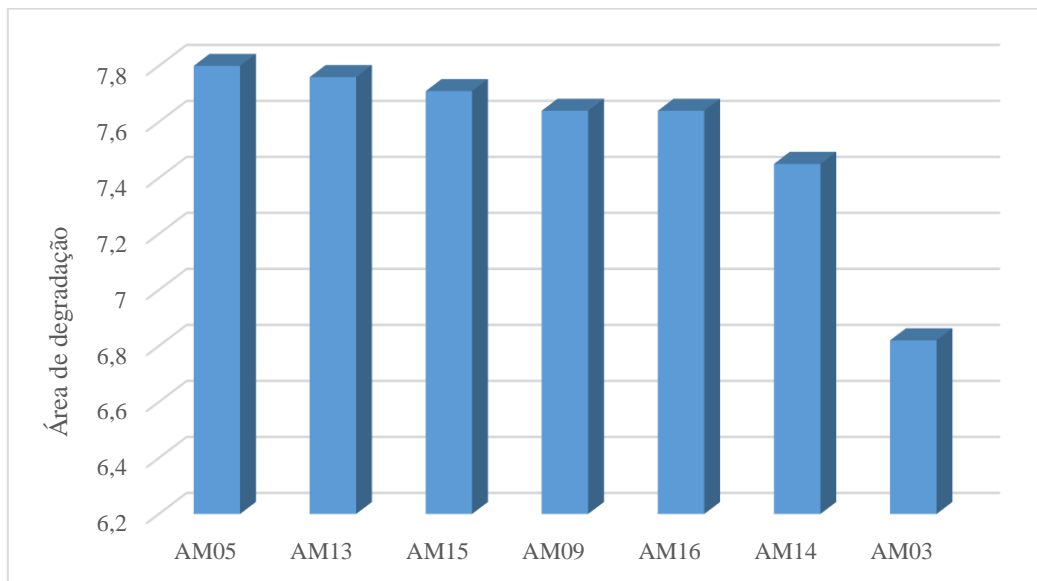
### Análise da atividade de MMP-13

Para verificar a atividade colagenolítica da MMP-13 foi realizado o ensaio de Zimografia com sete amostras de ameloblastoma. Destas, três foram validadas no ensaio RT-qPCR (Tabela 1). A MMP-13 foi observada na forma pró e ativa em todas as amostras (Figura 4). Bandas de MMP-13 foram observadas em 48kDa e 60kDa que correspondem a proMMP-13 e MMP-13

ativa, respectivamente. A atividade total da MMP-13 avaliada por densitometria pode ser visualizada na Figura 5.

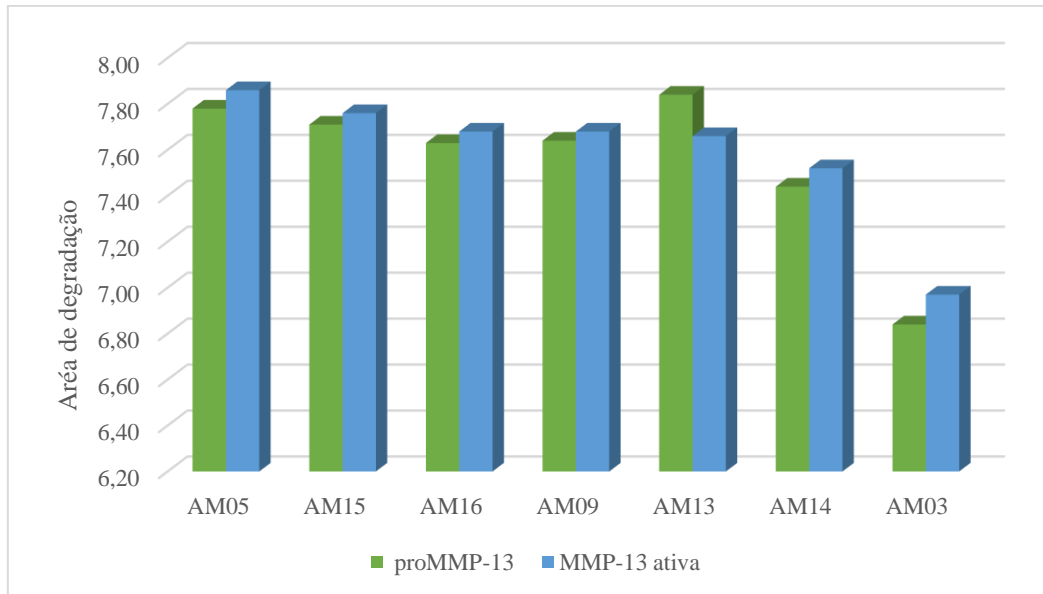


**Figura 4.** Bandas de degradação em gel de colágeno evidenciando a atividade colagenolítica das amostras de ameloblastoma. kDa, kilodaltons.



**Figura 5.** Representação da atividade total (proMMP-13 e MMP-13 ativa) nas sete amostras de ameloblastomas em ordem decrescente. O valor da área de degradação foi calculado em log<sub>10</sub> a partir dos valores de densitometria.

A comparação da atividade entre proMMP-13 e MMP-13 ativa nas amostras revela que as duas formas apresentaram uma atividade semelhante entre as amostras, com exceção da AM13, que apresentou maior expressão na forma pro zimogênio (Figura 6).

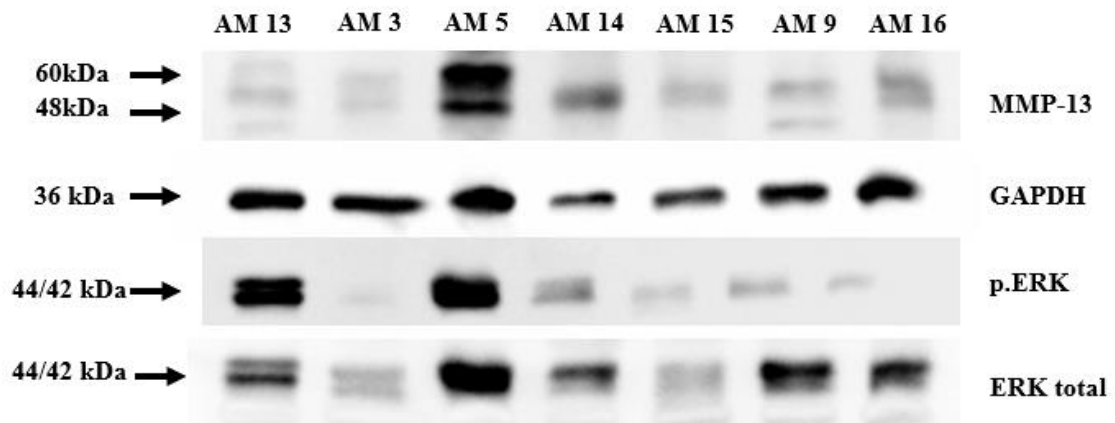


**Figura 6.** Representação da atividade separada, proMMP-13 e MMP-13 ativa, nas sete amostras de ameloblastomas. O valor da área de degradação foi calculado em log<sub>10</sub> a partir dos valores de densitometria

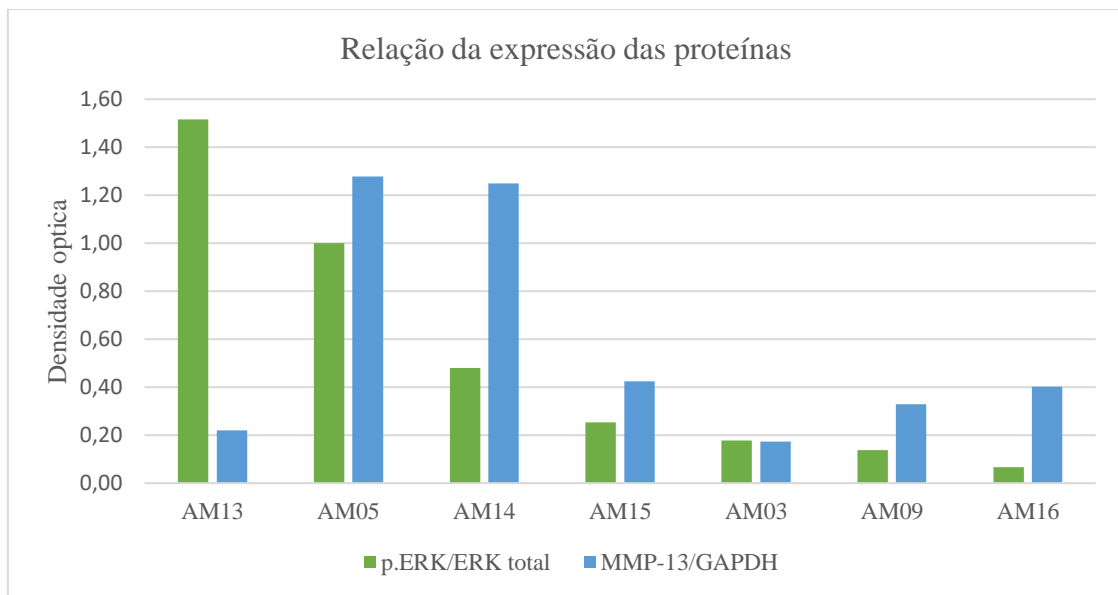
#### *Análise da expressão das proteínas p.ERK e MMP-13 em ameloblastomas*

O ensaio de Western Blotting foi utilizado para verificar a correlação da expressão da proteína fosforilada efetora da via de sinalização MAPK/ERK, p.ERK, e expressão da MMP-13 em sete amostras de ameloblastoma (Figura 7). Duas bandas com peso molecular próximo de 60kDa e 48kDa foram visualizadas para MMP-13. Duas bandas com peso molecular 44kDa e 42kDa foram identificadas para p.ERK. A relação pERK/Erk total foi utilizada para quantificar a ativação da pERK. GAPDH foi utilizado como padrão para normalização.

A representação gráfica dos valores de densitometria das bandas de Western Blotting de p.ERK / ERK total e MMP-13/GAPDH pode ser visualizado na Figura 8. Não foi encontrada correlação entre a expressão de pERK e MMP13 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7.** Blotting para MMP-13, p.ERK e ERK. kDa, kilodaltons.



**Figura 8.** Relação entre os valores de densitometria das bandas referente a p. ERK / ERK total e MMP-13.

## 6 DISCUSSÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial que possui comportamento invasivo e destrutivo (EL-NAGGAR et al., 2017; KREPPEL et al., 2018). Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares no surgimento dessa lesão pode contribuir para o desenvolvimento de terapias para os casos mais agressivos, resultando na diminuição da morbidade e melhorando a qualidade de vidas dos pacientes (GOMES et al., 2014; DINIZ et al., 2015). Embora existam lacunas na compreensão da biologia ameloblastomas, diferentes grupos de pesquisa estão investigando os processos moleculares relacionados ao desenvolvimento dessa lesão e diminuindo essas lacunas existentes (MEIERJOHANN et al., 2010; da ROSA et al., 2014; FUCHIGAMI et al., 2021).

Kurppa e colaboradores (2014) reportaram a presença de mutação oncogênica *BRAFV600E* em 63% das amostras de ameloblastoma. BRAF possui importante papel na via de sinalização MAPK/ERK, e a sua mutação resulta na ativação constitutiva dessa via. Além da mutação em *BRAF p.V600E*, Brown e colaboradores (2014) encontram mutações *RAS* (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*) e *FGFR2* mutualmente exclusivas com *BRAF*. Juntas, essas mutações representam 88% dos casos investigados e desempenham função na via MAPK/ERK. Portanto, sugere-se que a ativação constitutiva dessa via possua papel importante na patogênese dos ameloblastomas (BROWN et al., 2014; KURPPA et al., 2014; FUCHIGAMI et al., 2021). No entanto, pouco se sabe quais os impactos da sinalização MAPK na patobiologia dos ameloblastomas.

As MMPs são proteinases responsáveis pela degradação da MEC resultando no processo de migração e invasão celular (BROWN e MURRAY, 2015). Estudos têm relacionado a presença dessas MMPs com a progressão e agressividade dos ameloblastomas. Ribeiro e colaboradores (2009) encontraram imunopositividade de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 nas amostras de ameloblastoma e MMP-1 apresentou expressão predominante. Além disso, em uma análise imunohistoquímica, foi detectada uma elevada expressão de MMP-13 em amostras de ameloblastoma (de ANDRADE et al., 2019).

A regulação da expressão da MMP-13 pode ocorrer por várias vias de sinalização (FUCHIGAMI et al., 2021; SAIGANESH et al., 2018) e a desregulação da expressão dessa proteinase está relacionada com diversas condições malignas (VISSE e NAGASE, 2003; LI e YU, 2022). Tem sido reportado o aumento da expressão da MMP-13 na presença de FGF2, um conhecido ligante da via MAPK. Além disso, a fosforilação dos efetores da via MAPK,

ERK1/2, foi relacionada com o aumento de expressão da MMP-13 (SAIGANESH et al., 2018) em melanócitos. Nesse contexto, avaliamos o possível papel da MMP-13 nas amostras de ameloblastoma, no intuito de contribuir para o entendimento das alterações moleculares presente nesse tumor.

Em um estudo prévio do nosso grupo a análise do transcriptoma revelou o aumento da expressão de diversos genes como *FGFR3*, *ODAM*, *ADAMTS20* e *MMP-13* (APÊNDICE). Dentre esses genes expressos de forma aberrante, destaca-se a superexpressão da MMP-13. No presente estudo, validamos a expressão gênica de MMP-13 em 12/12 amostras de ameloblastomas, confirmado os achados prévios. Nosso achado está de acordo com outros estudos que investigaram o perfil de expressão gênica através de análise microarray e encontrou a MMP-13 entre os genes superexpressos (HEIKINHEIMO et al., 2002; GODA et al., 2015). As metaloproteinases são enzimas frequentemente estudadas devido ao seu papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral. Portanto, é bem estabelecido que a desregulação da MMP-13 está associada com comportamento agressivo e invasivo em vários cânceres humanos como, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma e câncer de mama (KONDRATIEV et al., 2007; KURPAI et al., 2010).

Para verificar a atividade colagenolítica da MMP-13, foi realizado ensaio de zimografia em gel de colágeno. Devido ao baixo custo, pouco tempo de execução e detecção simultânea de diferentes isoformas da enzima, essa é uma técnica amplamente utilizada para estudar enzimas hidrolíticas (la ROCCA et al., 2004; INANC et al., 2017). Na análise qualitativa, observamos a presença de substrato de degradação, que corresponde a atividade das enzimas, em todas as amostras, na forma pro-MMP-13 e na forma ativa. A visualização de bandas ativas (48kDa) representam atividade biológica no tecido, enquanto as enzimas identificadas na forma inativa (60kDa) significa que havia um potencial de atividade enzimática no tecido (VANDOOREN et al., 2013).

A via de sinalização MAPK/ERK regula diversos processos como proliferação, crescimento, apoptose e migração celular. A ativação de ERK resulta na fosforilação de alvos moleculares, dentre estes sugere-se como alvo a MMP-13 (DHILLON et al., 2007; SAIGANESH et al 2017). No presente estudo, objetivamos avaliar uma possível associação entre a atividade da via MAPK e a expressão de MMP-13 em ameloblastoma. Para isso, investigamos a proteína efetora da via de sinalização MAPK/ERK, pERK, em ameloblastomas através da técnica de Western Blotting. Observamos a presença da proteína ERK e da forma fosforilada pERK em todas as amostras, indicando a ativação dessa via de

sinalização nas amostras analisadas, independentemente da positividade da mutação BRAFV600E ter sido investigada previamente. Utilizando o mesmo extrato de proteínas, nós também investigamos a expressão de MMP-13 e correlacionamos os valores de densitometria de pERK/ERK total e MMP-13 na tentativa de correlacionar a atividade de MAPK/pERK com a expressão proteica de MMP-13. Porém, não foi encontrada associação entre a expressão de pERK e MMP-13. Trabalhos futuros com cultura de células primárias de ameloblastomas poderia ajudar a compreender a associação entre a ativação de pERK e a expressão aumentada de MMP-13.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dos ameloblastomas pode contribuir para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, principalmente para os casos mais agressivos. Nosso estudo indica uma possível associação entre a expressão da MMP-13 e a via MAPK/ERK em ameloblastomas. De fato, espera-se que a utilização de inibidores sintéticos da via MAPK/ERK poderia contribuir para o prognóstico dessas lesões ao atuar também reduzindo mecanismo de destruição/invasão da lesão (KONDRATIEV et al., 2007). Devido a importância da via MAPK no desenvolvimento de cânceres humanos, moléculas participantes dessa via de sinalização têm sido alvo de estudo para inibidores. Há inibidores de RAF e MEK1/2 em desenvolvimento e fase de ensaio clínico, no entanto, estudos têm demonstrado surgimento de mecanismos de resistência com o uso desses inibidores (DILLON et al., 2007; ROVIDA e STECCA, 2015). Tem sido demonstrado que a supressão pós translacional da atividade das MMPs pode apresentar uma resposta favorável na involução dos tumores em estágios iniciais. No entanto, essa eficácia é reduzida em estágios avançados da doença (SIDDHARTHA e GARG 2021).

Portanto, fica evidente a necessidade de mais estudos correlacionando a expressão da MMP-13 através da via de sinalização MAPK/ERK e os potenciais efeitos após a inibição dessa via e da MMP-13 em ameloblastomas.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou a superexpressão gênica de MMP-13 e demonstrou a atividade colagenolítica dessa MMP em ameloblastoma. Além disso, foi possível detectar a ativação da via MAPK/ERK em todas as amostras, independente do status da mutação *BRAF p.V600E*. Uma possível associação entre a ativação da via MAPK/ERK com a da expressão de MMP-13 em ameloblastomas não foi observada. Novos estudos são necessários para esclarecer o impacto da via MAPK na regulação da expressão de MMP-13 e no comportamento invasivo dos ameloblastomas.

## REFERÊNCIAS

- AGANI, Z. *et al.* Maxillary unicystic ameloblastoma: a case report. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 469, 2016.
- DE ANDRADE SANTOS, P.P. *et al.* Immunohistochemical analysis of MMP-13 and EMMPRIN in epithelial odontogenic lesions. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2019;276(11):3203-3211.
- ANPALAGAN A. *et al.* Current practice in the management of peripheral ameloblastoma: a structured review. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 2021 Jan;59(1):e1-e8.
- BASSIOUNI W., ALI MAM, SCHULZ R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. **FEBS J.** 2021 Dec;288(24):7162-7182.
- BROWN G.T, MURRAY G.I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **J Pathol.** 2015 Nov;237(3):273-81.
- BROWN N.A *et al.* Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. **Clin Cancer Res.** 2014 Nov 1;20(21):5517-26.
- BROWN N.A, BETZ B.L. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. **Biomark Cancer.** 2015 Oct 4;7(Suppl 2):19-24.
- CADAVID, A.M.H. *et al.* Ameloblastomas: current aspects of the new WHO classification in an analysis of 136 cases. **Surg Exp Pathol** 2, 17 (2019).
- CANTWELL-DORRIS, E.R. *et al.* BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, 10, 385–394; Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, Ristimäki A, Ruhin B, Kellokoski J, Elenius K, Heikinheimo K. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **J Pathol.** 2014 Apr;232(5):492-8.
- DE CAMPOS W.G *et al.* Surgical Treatment of Ameloblastoma: How Does It Impact the Oral Health-Related Quality of Life? A Systematic Review. **J Oral Maxillofac Surg.** 2022 Jun;80(6):1103-1114.
- COUSSENS L.M, FINGLETON B., MATRISIAN L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science.** 2002 Mar 29;295(5564):2387-92.

DEGIRMENCI U., WANG M., HU J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. **Cells**. 2020 Jan 13;9(1):198.

DINIZ M.G *et al.* Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumour Biol**. 2015 Jul;36(7):5649-53.

DINIZ M.G *et al.* Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. **Oral Oncol**. 2017 Sep;72:165-173.

DHILLON A.S *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**. 2007 May 14;26(22):3279-90.

EL-NAGGAR A.K *et al.* World Health Organization Classification of Head na Neck Tumor. 4<sup>th</sup> ed. Lyon, France: World Health Organization. (2017) p.347.

FRIEDRICH R.E, *et al.* Mutation in an Implant-associated Peripheral Giant Cell Granuloma of the Jaw: Implications of Genetic Analysis of the Lesion for Treatment Concept and Surveillance. **In Vivo**. 2021 Mar-Apr;35(2):947-953.

FUCHIGAMI T *et al.*..Molecular biological findings of ameloblastoma. **Jpn Dent Sci Rev**. 2021 Nov;57:27-32.

GUIMARÃES L.M et al. The Molecular Pathology of Odontogenic Tumors: Expanding the Spectrum of MAPK Pathway Driven Tumors. **Front Oral Health**. 2021 Sep 14;2:740788.

GODA H. *et al.* Peripheral ameloblastoma with histologically low-grade malignant features of the buccal mucosa: a case report with immunohistochemical study and genetic analysis. **Int J Clin Exp Pathol**. 2015 Feb 1;8(2):2085-9).

GOMES C.C, DINIZ M.G, GOMEZ R.S. Progress towards personalized medicine for ameloblastoma. **J Pathol**. 2014 Apr;232(5):488-91.

GOMES CC, DUARTE AP, DINIZ MG, GOMEZ RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. **J Oral Pathol Med**. 2010 Sep;39(8):585-91.

GÜLTEKIN S.E *et al.* The landscape of genetic alterations in ameloblastomas relates to clinical features. **Virchows Arch**. 2018 May;472(5):807-814.

HAQ J., SIDDIQUI S., MCGURK M. Argument for the conservative management of mandibular ameloblastomas. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2016;54(9):1001-1005.

- HEIKINHEIMO, K., et al. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. **Journal of dental research**. 2002 Aug 81(8), 525–530.
- INANC S., KELES D., OKTAY G. An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13. **Biotechniques**. 2017 Oct 1;63(4):174-180.
- JANARDHANAN M. *et al.* Peripheral ameloblastoma with neoplastic osseous invasion versus peripheral intraosseous ameloblastoma: A challenging diagnosis. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2018 Sep-Dec;22(3):396-400.
- KIM E.K, CHOI E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Arch Toxicol**. 2015;89(6):867-882.
- KUPAI, K *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 2010;61(2):205-209.
- KURPPA K J. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **J Pathol**. 2014;232(5):492-498.
- KONDRATIEV S. *et al.* Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. **Hum Pathol**. 2008 Mar;39(3):337-43.
- KREPPPEL M., ZÖLLER J. Ameloblastoma-Clinical, radiological, and therapeutic findings. **Oral Dis**. 2018 Mar;24(1-2):63-66.
- KRISHNA M., NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci**. 2008;65(22):3525-3544.
- KURPPA K., J. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **J Pathol**. 2014;232(5):492-498.
- LI S., PRITCHARD D.M, YU L.G. Regulation and Function of Matrix Metalloproteinase-13 in Cancer Progression and Metastasis. **Cancers (Basel)**. 2022 Jul 3;14(13):3263.
- MARTINS-CHAVES R.R *et al.* KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma. **Oral Dis**. 2020;26(2):334-340.
- MAMAT M. N, *et al.* BRAF V600E Mutation in Ameloblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancers (Basel)**. 2022 Nov 14;14(22):5593.

- MEIERJOHANN S. *et al.* MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. **Mol Cancer**. 2010 Jul 28;9:201.
- MURPHY L.O, BLENIS J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. **Trends Biochem Sci**. 2006;31(5):268-275.
- NAGI R., SAHU S., RAKESH N. Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma: An update. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2016 Sep-Dec;20(3):497-504.
- NAKAO Y. *et al.* Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Int J Oncol**. 2013 Nov;43(5):1377-84.
- PAGE-MCCAW A., EWALD A. & WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8, 221–233 (2007).
- PEREIRA N. B. *et al.* BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. **J Oral Pathol Med**. 2016 Nov;45(10):780-785.
- RIBEIRO B. F. *et al.* Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. **Oral Dis**. 2009 Oct;15(7):472-7.
- DA ROSA M. R. *et al.* EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. **Tumour Biol**. 2014 Nov;35(11):11107-20.
- LA ROCCA G., *et al.* Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **Br J Cancer**. 2004;90(7):1414-1421.
- ROVIDA E., STECCA B. Mitogen-activated protein kinases and Hedgehog-GLI signaling in cancer: A crosstalk providing therapeutic opportunities?. **Semin Cancer Biol**. 2015;35:154-167.
- SAIGANESH S., *et al.* Matrix metalloproteinase-13: A special focus on its regulation by signaling cascades and microRNAs in bone. **Int J Biol Macromol**. 2018 Apr 1;109:338-349.
- SCHNEIDER C.A., *et al* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**. 2012;671-675.

SIDDHARTHA R., GARG M. Molecular and clinical insights of matrix metalloproteinases into cancer spread and potential therapeutic interventions. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2021;426:115593.

SHI H. A. *et al.* Ameloblastoma: A succinct review of the classification, genetic understanding and novel molecular targeted therapies. **Surgeon**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 238–243, 2021

STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol.** 2000;10(6):415-433.

SWEENEY R. T. *et al.* Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nat Genet.** 2014 Jul;46(7):722-5.

VANDOOREN J. *et al.* Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nat Methods.** 2013;10(3):211-220.

Vered M., Wright J. M. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. **Head Neck Pathol.** 2022 Mar;16(1):63-75.

VISSE R., NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res.** 2003 May 2;92(8):827-39.

YAN C., BOYD D.D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol.** 2007 Apr;211(1):19-26.

ZHANG W., LIU H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Res.** 2002 Mar;12(1):9-18.

## APÊNDICE

### APÊNCIDE A – LISTA DE GENES EXPRESSOS EM AMELOBLASTOMA

	Gene Symbol	Description	log2 Fold-Change	Base Mean	AM	AM	AM	AM	MN	MN	MN	MN
					1	2	3	4	1	2	3	3
					2	6	8	10	41B	3B	5B	7B
ENSG00000185774	<a href="#">KCNP4</a>	Potassium voltage-gated channel interacting protein 4	-1,10	636,29	759	1001	1420	796	297	866	59	988
ENSG00000254502	<a href="#">FNTAL1</a>		-1,24	67,48	84	105	115	126	41	79	5	80
ENSG00000198929	<a href="#">NOS1AP</a>	Nitric oxide synthase 1 adaptor protein	-1,39	276,19	277	611	462	459	144	317	20	317
ENSG00000124749	<a href="#">COL21A1</a>	Collagen type XXI alpha 1 chain	-1,42	296,17	498	261	760	459	142	200	26	431
ENSG00000169019	<a href="#">COMMD8</a>	COMM domain containing 8	-1,52	136,39	109	264	203	351	72	133	10	129
ENSG00000135069	<a href="#">PSAT1</a>	Phosphoserine aminotransferase 1	-1,68	139,16	65	297	249	393	70	116	10	100
ENSG00000156711	<a href="#">MAPK13</a>	Mitogen-activated protein kinase 13	-1,69	172,84	75	418	387	384	82	92	14	170
ENSG00000169247	<a href="#">SH3TC2</a>	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2	-1,82	137,84	152	204	178	452	93	98	4	78
ENSG00000171766	<a href="#">GATM</a>	Glycine amidinotransferase	-1,90	168,21	181	121	304	645	39	200	7	120
ENSG00000186868	<a href="#">MAPT</a>	Microtubule associated protein tau	-1,90	95,07	30	180	334	213	26	63	7	84
ENSG00000215018	<a href="#">COL28A1</a>	Collagen type XXVIII alpha 1 chain	-1,93	246,78	572	447	466	219	118	196	18	72
ENSG00000183018	<a href="#">SPNS2</a>	Sphingolipid transporter 2	-1,93	103,82	78	238	235	229	66	59	4	58
ENSG00000136999	<a href="#">NOV</a>	Nephroblastoma overexpressed	-1,99	22,96	39	57	30	40	13	13	0	15
ENSG00000139364	<a href="#">TMEM132B</a>	Transmembrane protein 132B	-2,02	260,87	384	298	909	390	97	126	24	176
ENSG00000085831	<a href="#">TTC39A</a>	Tetratricopeptide repeat domain 39A	-2,05	95,74	69	261	130	242	38	34	10	42

ENSG00000160685	<a href="#">ZBTB7B</a>	Zinc finger and BTB domain containing 7B	-2,06	181,78	57	535	280	527	75	70	5	167
ENSG00000112414	<a href="#">ADGRG6</a>	Adhesion G protein-coupled receptor G6	-2,06	469,08	405	583	857	1727	292	176	19	221
ENSG00000066279	<a href="#">ASPM</a>	Abnormal spindle microtubule assembly	-2,10	179,25	35	422	315	634	53	100	10	115
ENSG00000176920	<a href="#">FUT2</a>	Fucosyltransferase 2	-2,19	87,64	26	152	102	404	18	32	8	41
ENSG00000169860	<a href="#">P2RY1</a>	Purinergic receptor P2Y1	-2,19	390,31	68	901	908	1297	106	91	15	381
ENSG00000185112	<a href="#">FAM43A</a>	Family with sequence similarity 43 member A	-2,20	35,98	49	118	69	39	11	13	0	38
ENSG00000101412	<a href="#">E2F1</a>	E2F transcription factor 1	-2,21	13,98	15	38	22	34	3	10	0	10
ENSG00000111344	<a href="#">RASAL1</a>	RAS protein activator like 1	-2,26	75,26	24	213	176	195	26	57	2	26
ENSG00000268089	<a href="#">GABRQ</a>	Gamma-aminobutyric acid type A receptor theta subunit	-2,26	22,87	11	42	117	34	10	6	0	15
ENSG00000163472	<a href="#">TMEM79</a>	Transmembrane protein 79	-2,26	53,24	6	104	124	211	13	30	1	32
ENSG00000124575	<a href="#">HIST1H1D</a>	Histone cluster 1, H1d	-2,27	221,39	105	414	414	815	50	178	9	124
ENSG00000120913	<a href="#">PDLIM2</a>	PDZ and LIM domain 2	-2,27	31,72	11	66	61	118	12	12	1	17
ENSG00000179133	<a href="#">C10orf67</a>	Chromosome 10 open reading frame 67	-2,29	15,72	5	50	48	23	4	5	2	3
ENSG00000181652	<a href="#">ATG9B</a>	Autophagy related 9B	-2,32	13,98	13	17	40	47	4	12	0	3
ENSG00000241735	<a href="#">FABP5P3</a>	Fatty acid binding protein 5 pseudogene 3	-2,38	7,46	4	14	18	23	1	2	1	3
ENSG00000279310	<a href="#">RP11-123O10.1</a>		-2,42	8,25	8	24	31	8	4	2	0	1
ENSG00000113389	<a href="#">NPR3</a>	Natriuretic peptide receptor 3	-2,45	545,79	67	1055	1449	2061	111	266	32	112
ENSG00000186889	<a href="#">TMEM17</a>	Transmembrane protein 17	-2,46	124,28	12	348	251	421	17	49	6	66
ENSG00000249681	<a href="#">KRT19P3</a>	Keratin 19 pseudogene 3	-2,47	98,92	6	382	152	280	29	22	1	51

ENSG00000166006	<a href="#">KCNC2</a>	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 2	-2,48	13,51	7	38	23	40	3	7	1	1
ENSG00000247193	<a href="#">RP11-431M7.3</a>		-2,52	15,88	11	40	63	21	3	10	1	2
ENSG00000104055	<a href="#">TGM5</a>	Transglutaminase 5	-2,52	115,41	13	315	294	367	36	34	5	6
ENSG00000127249	<a href="#">ATP13A4</a>	ATPase 13A4	-2,52	599,91	37	1103	1863	2274	147	135	34	56
ENSG00000168907	<a href="#">PLA2G4F</a>	Phospholipase A2 group IVF	-2,54	138,16	2	613	300	257	20	38	7	25
ENSG00000197953	<a href="#">AADACL2</a>	Arylacetamide deacetylase like 2	-2,54	46,94	11	74	301	59	11	20	1	19
ENSG00000148600	<a href="#">CDHR1</a>	Cadherin related family member 1	-2,55	139,82	3	534	450	240	31	18	7	23
ENSG00000135480	<a href="#">KRT7</a>	Keratin 7	-2,55	62,64	53	147	46	236	8	24	6	10
ENSG00000214822	<a href="#">KRT16P3</a>	Keratin 16 pseudogene 3	-2,59	696,85	5	2150	1437	2438	68	141	36	128
ENSG00000130055	<a href="#">GDPD2</a>	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	-2,63	15,07	2	57	34	35	2	5	1	0
ENSG00000214856	<a href="#">KRT16P1</a>	Keratin 16 pseudogene 1	-2,63	774,47	6	2330	1676	2705	83	181	27	266
ENSG00000159495	<a href="#">TGM7</a>	Transglutaminase 7	-2,65	95,19	2	222	575	125	3	8	7	6
ENSG00000183844	<a href="#">FAM3B</a>	Family with sequence similarity 3 member B	-2,66	87,36	2	104	213	459	20	14	3	8
ENSG00000135374	<a href="#">ELF5</a>	E74 like ETS transcription factor 5	-2,67	52,50	7	128	134	185	5	3	5	3
ENSG00000159871	<a href="#">LYPD5</a>	LY6/PLAUR domain containing 5	-2,67	74,76	45	174	72	312	25	18	1	30
ENSG00000163220	<a href="#">S100A9</a>	S100 calcium binding protein A9	-2,68	7806,55	643	11150	2869	50640	1368	1522	292	1349
ENSG00000164687	<a href="#">FABP5</a>	Fatty acid binding protein 5	-2,69	883,77	54	2018	2709	3029	191	107	44	173
ENSG00000213606	<a href="#">AKR1B10P1</a>	Aldo-keto reductase family 1 member B10 pseudogene 1	-2,69	218,23	1	811	358	718	46	12	6	25
ENSG00000186395	<a href="#">KRT10</a>	Keratin 10	-2,69	249,78	73	906	1070	169	44	29	17	46

ENSG00000173239	<a href="#">LIPM</a>	Lipase family member M	-2,71	22,36	5	82	60	47	4	9	0	9
ENSG00000064787	<a href="#">BCAS1</a>	Breast carcinoma amplified sequence 1	-2,73	147,00	541	12	69	447	24	31	6	14
ENSG00000134760	<a href="#">DSG1</a>	Desmoglein 1	-2,74	2308,06	35	5392	10832	5587	390	67	96	150
ENSG00000231203	<a href="#">KRT8P10</a>	Keratin 8 pseudogene 10	-2,77	544,55	7	1647	717	2300	106	71	16	73
ENSG00000146147	<a href="#">MLIP</a>	Muscular LMNA-interacting protein	-2,82	301,76	640	449	481	730	95	99	11	95
ENSG00000108602	<a href="#">ALDH3A1</a>	Aldehyde dehydrogenase 3 family member A1	-2,83	231,73	1	521	328	1202	29	4	7	11
ENSG00000124102	<a href="#">PI3</a>	Peptidase inhibitor 3	-2,85	366,17	6	815	36	2272	13	77	10	28
ENSG00000165449	<a href="#">SLC16A9</a>	Solute carrier family 16 member 9	-2,86	368,51	38	232	2744	696	55	106	11	82
ENSG00000196805	<a href="#">SPRR2B</a>	Small proline rich protein 2B	-2,86	15,59	0	60	13	63	2	1	0	2
ENSG00000170426	<a href="#">SDR9C7</a>	Short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member 7	-2,88	61,12	1	122	132	299	15	3	0	4
ENSG00000125998	<a href="#">FAM83C</a>	Family with sequence similarity 83 member C	-2,88	75,20	1	286	86	280	11	1	2	2
ENSG00000203785	<a href="#">SPRR2E</a>	Small proline rich protein 2E	-2,89	418,76	7	1668	538	1421	37	8	17	11
ENSG00000105131	<a href="#">EPHX3</a>	Epoxide hydrolase 3	-2,91	20,21	2	62	37	74	3	0	1	3
ENSG00000186832	<a href="#">KRT16</a>	Keratin 16	-2,91	10294,04	83	34723	17862	37354	1005	1535	368	853
ENSG00000143546	<a href="#">S100A8</a>	S100 calcium binding protein A8	-2,93	6978,26	260	9481	2504	47838	1029	597	186	462
<b>ENSG00000068078</b>	<b><a href="#">FGFR3</a></b>	<b>Fibroblast growth factor receptor 3</b>	<b>-2,93</b>	<b>218,46</b>	<b>19</b>	<b>888</b>	<b>266</b>	<b>664</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>94</b>
ENSG00000125285	<a href="#">SOX21</a>	SRY-box 21	-2,93	16,34	0	20	85	57	2	1	0	3
ENSG00000166948	<a href="#">TGM6</a>	Transglutaminase 6	-2,94	155,99	3	265	1224	121	10	8	7	10
ENSG00000188508	<a href="#">KRTDAP</a>	Keratinocyte differentiation associated protein	-2,95	214,06	0	521	130	1221	8	11	6	14

ENSG00000262484	<a href="#">CCER2</a>	Coiled-coil glutamate rich protein 2	-2,96	14,26	3	66	56	7	1	1	0	5
ENSG00000186442	<a href="#">KRT3</a>	Keratin 3	-2,97	461,70	3	2060	463	1471	26	9	16	12
ENSG00000163216	<a href="#">SPRR2D</a>	Small proline rich protein 2D	-2,98	284,88	5	876	265	1323	23	15	11	7
ENSG00000129437	<a href="#">KLK14</a>	Kallikrein related peptidase 14	-3,00	15,62	2	95	36	6	0	3	0	3
ENSG00000119411	<a href="#">BSPRY</a>	B-box and SPRY domain containing	-3,05	49,90	8	120	110	199	8	15	1	9
ENSG00000206072	<a href="#">SERPINB11</a>	Serpin family B member 11	-3,07	749,10	20	1534	2547	2859	92	27	26	31
ENSG00000185069	<a href="#">KRT76</a>	Keratin 76	-3,16	7907,71	68	17231	22205	33974	469	87	225	184
ENSG00000172867	<a href="#">KRT2</a>	Keratin 2	-3,20	58,28	0	206	277	77	2	3	2	2
ENSG00000182938	<a href="#">OTOP3</a>	Otopetrin 3	-3,20	14,92	1	52	51	35	2	2	0	1
ENSG00000167768	<a href="#">KRT1</a>	Keratin 1	-3,21	3524,20	31	11875	19635	3222	111	58	105	111
ENSG00000243284	<a href="#">VSIG8</a>	V-set and immunoglobulin domain containing 8	-3,22	20,53	2	68	49	66	3	3	0	3
ENSG00000164122	<a href="#">ASB5</a>	Ankyrin repeat and SOCS box containing 5	-3,25	12,22	55	7	21	11	0	3	0	1
ENSG00000162366	<a href="#">PDZK1IP1</a>	PDZK1 interacting protein 1	-3,27	97,01	2	151	42	661	7	8	0	17
ENSG00000184330	<a href="#">S100A7A</a>	S100 calcium binding protein A7A	-3,29	172,26	4	486	1	1016	4	12	1	2
ENSG00000112494	<a href="#">UNC93A</a>	Unc-93 homolog A (C. elegans)	-3,44	9,25	1	16	28	44	0	0	0	0
ENSG00000150764	<a href="#">DIXDC1</a>	DIX domain containing 1	1,42	533,46	289	242	499	240	802	1114	146	1807
ENSG00000179603	<a href="#">GRM8</a>	Glutamate metabotropic receptor 8	1,44	119,82	38	59	124	69	99	542	28	347
<b>ENSG00000074527</b>	<b><a href="#">NTN4</a></b>	<b>Netrin 4</b>	<b>1,54</b>	<b>507,64</b>	<b>240</b>	<b>167</b>	<b>526</b>	<b>202</b>	<b>474</b>	<b>2425</b>	<b>100</b>	<b>1565</b>
ENSG00000106565	<a href="#">TMEM176B</a>	Transmembrane protein 176B	1,59	151,59	61	64	131	67	123	294	40	862

ENSG0000019 6277	<a href="#">GRM7</a>	Glutamate metabotropic receptor 7	1,68	320,42	80	102	154	300	312	1547	66	1024
ENSG0000014 9948	<a href="#">HMGA2</a>	High mobility group AT-hook 2	1,70	298,32	86	142	310	69	182	1073	118	944
ENSG0000018 6094	<a href="#">AGBL4</a>	ATP/GTP binding protein-like 4	1,83	859,97	279	266	734	308	391	3752	205	4132
ENSG0000020 5593	<a href="#">DENND6B</a>	DENN domain containing 6B	1,87	14,28	4	8	5	7	21	45	4	49
ENSG0000005 8085	<a href="#">LAMC2</a>	Laminin subunit gamma 2	1,91	2163,9 5	356	1155	651	1301	133 1	5201	135 9	4816
ENSG0000025 3796	<a href="#">RP11- 1084E5.1</a>		1,94	53,47	15	25	40	13	116	93	10	243
ENSG0000014 2920	<a href="#">AZIN2</a>	Antizyme inhibitor 2	1,94	188,95	68	38	180	42	181	527	39	1125
ENSG0000025 6235	<a href="#">SMIM3</a>	Small integral membrane protein 3	1,94	290,01	110	129	186	81	262	1102	72	1257
ENSG0000018 4949	<a href="#">FAM227A</a>	Family with sequence similarity 227 member A	1,95	72,53	21	17	63	21	36	274	31	250
ENSG0000019 6876	<a href="#">SCN8A</a>	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 8	1,98	126,25	29	33	109	39	64	516	63	294
ENSG0000006 0656	<a href="#">PTPRU</a>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type U	2,02	362,91	152	112	202	65	156	689	208	1462
ENSG0000025 5532	<a href="#">CTD- 2026G22.1</a>		2,04	34,11	9	12	27	4	17	181	10	125
ENSG0000011 1249	<a href="#">CUX2</a>	Cut like homeobox 2	2,06	75,78	29	16	61	6	51	433	17	280
ENSG0000025 1557	<a href="#">HNRNPKP3</a>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K pseudogene 3	2,12	71,88	12	13	57	27	63	481	6	283
<b>ENSG0000013 0413</b>	<b><a href="#">STK33</a></b>	<b>Serine/threonine kinase 33</b>	<b>2,19</b>	<b>435,65</b>	<b>85</b>	<b>30</b>	<b>387</b>	<b>93</b>	<b>199</b>	<b>1365</b>	<b>283</b>	<b>989</b>
ENSG0000008 6991	<a href="#">NOX4</a>	NADPH oxidase 4	2,20	593,57	129	245	420	73	436	2929	187	2007
ENSG0000015 4118	<a href="#">JPH3</a>	Junctophilin 3	2,22	28,15	10	12	11	1	43	84	13	62
ENSG0000014 4834	<a href="#">TAGLN3</a>	Transgelin 3	2,23	17,88	10	1	8	1	20	90	5	57
ENSG0000017 7294	<a href="#">FBXO39</a>	F-box protein 39	2,30	21,93	1	6	11	8	11	42	6	177

ENSG00000079101	<a href="#">CLUL1</a>	Clusterin like 1	2,35	36,81	7	4	24	7	9	269	11	102
ENSG00000157542	<a href="#">KCNJ6</a>	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 6	2,36	105,58	39	7	62	5	87	735	19	343
ENSG00000154736	<a href="#">ADAMTS5</a>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5	2,38	123,23	33	31	28	21	103	43	15	1354
ENSG00000134668	<a href="#">SPOCD1</a>	SPOC domain containing 1	2,39	32,38	14	2	11	7	37	146	15	55
ENSG00000121207	<a href="#">LRAT</a>	Lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine--retinol O-acyltransferase)	2,40	257,77	27	23	220	14	66	1850	89	658
ENSG00000224384	<a href="#">RP3-417O22.3</a>		2,40	13,57	1	2	10	2	8	96	2	57
ENSG00000137766	<a href="#">UNC13C</a>	Unc-13 homolog C	2,42	344,98	52	61	146	88	53	2159	20	2432
ENSG00000168280	<a href="#">KIF5C</a>	Kinesin family member 5C	2,43	549,48	112	60	364	62	336	4248	35	2399
ENSG00000101115	<a href="#">SALL4</a>	Spalt like transcription factor 4	2,46	23,02	3	7	12	4	24	53	3	189
ENSG00000175497	<a href="#">DPP10</a>	Dipeptidyl peptidase like 10	2,47	369,60	80	61	162	85	58	1032	132	2609
ENSG00000231584	<a href="#">FAHD2CP</a>	Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2C, pseudogene	2,51	288,14	69	55	114	68	88	685	183	1112
ENSG00000206120	<a href="#">EGFEM1P</a>	EGF like and EMI domain containing 1, pseudogene	2,51	634,41	140	87	326	136	357	5240	75	2036
<b>ENSG00000109205</b>	<b><a href="#">ODAM</a></b>	<b>Odontogenic, ameloblast associated</b>	<b>2,55</b>	<b>654,11</b>	<b>41</b>	<b>45</b>	<b>159</b>	<b>299</b>	<b>54</b>	<b>2273</b>	<b>136</b>	<b>5673</b>
ENSG00000254667			2,57	10,87	2	2	3	2	11	13	4	77
ENSG00000254489	<a href="#">RP5-1024C24.1</a>		2,59	102,26	7	6	72	3	22	750	16	520
ENSG00000183117	<a href="#">CSMD1</a>	CUB and Sushi multiple domains 1	2,62	2059,40	144	585	575	573	550	11867	1229	2398
ENSG00000276521	<a href="#">RP11-690D19.4</a>		2,66	13,76	0	1	5	2	3	8	7	116
ENSG00000029559	<a href="#">IBSP</a>	Integrin binding sialoprotein	2,69	6,38	1	1	1	0	4	63	0	24
ENSG00000224116	<a href="#">INHBA-AS1</a>	INHBA antisense RNA 1	2,72	60,16	6	2	39	6	25	295	13	386

ENSG00000167858	<a href="#">TEKT1</a>	Tektin 1	2,72	16,91	2	2	3	5	5	41	3	166
ENSG00000166819	<a href="#">PLIN1</a>	Perilipin 1	2,72	10,87	0	2	5	1	39	16	3	28
ENSG00000174482	<a href="#">LINGO2</a>	Leucine rich repeat and Ig domain containing 2	2,73	337,72	50	33	131	71	117	2878	125	303
ENSG00000149927	<a href="#">DOC2A</a>	Double C2 domain alpha	2,75	11,96	3	0	4	1	8	36	7	44
ENSG00000205693	<a href="#">MANSC4</a>	MANSC domain containing 4	2,76	71,93	5	7	33	6	50	820	2	104
ENSG00000234425	<a href="#">RP11-528G1.2</a>		2,79	12,49	0	1	1	4	10	29	11	13
ENSG00000251312	<a href="#">AC004062.2</a>		2,82	11,31	1	0	5	1	12	77	0	67
ENSG00000233009	<a href="#">NALCN-AS1</a>	NALCN antisense RNA 1	2,90	273,07	11	62	64	15	21	211	232	1227
ENSG00000259337	<a href="#">IGHV1OR15-2</a>	Immunoglobulin heavy variable 1/OR15-2 (pseudogene)	2,91	5,31	1	0	1	0	17	16	0	29
ENSG00000157423	<a href="#">HYDIN</a>	HYDIN, axonemal central pair apparatus protein	2,93	123,93	8	16	19	27	69	390	113	22
ENSG00000133048	<a href="#">CHI3L1</a>	Chitinase 3 like 1	2,97	810,07	133	35	249	75	364	7876	35	2939
<b>ENSG00000173157</b>	<b><a href="#">ADAMTS20</a></b>	<b>ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 20</b>	<b>3,05</b>	<b>1351,83</b>	<b>39</b>	<b>95</b>	<b>226</b>	<b>247</b>	<b>55</b>	<b>568</b>	<b>684</b>	<b>12375</b>
ENSG00000183775	<a href="#">KCTD16</a>	Potassium channel tetramerization domain containing 16	3,05	1191,59	210	39	122	27	141	197	520	12104
ENSG00000277436	<a href="#">REXO1L5P</a>	REX1, RNA exonuclease 1 homolog-like 5, pseudogene	3,09	12,43	1	0	1	0	21	143	0	4
ENSG00000164283	<a href="#">ESM1</a>	Endothelial cell specific molecule 1	3,15	55,56	10	5	13	6	19	188	32	234
ENSG00000253691	<a href="#">IGKV2OR2-4</a>	Immunoglobulin kappa variable 2/OR22-4 (pseudogene)	3,34	25,81	1	0	3	2	87	2	2	196
ENSG00000141485	<a href="#">SLC13A5</a>	Solute carrier family 13 member 5	3,48	227,00	1	16	10	5	11	8	221	1042
<b>ENSG00000137745</b>	<b><a href="#">MMP13</a></b>	<b>Matrix metalloproteinase 13</b>	<b>3,60</b>	<b>690,12</b>	<b>45</b>	<b>87</b>	<b>78</b>	<b>105</b>	<b>320</b>	<b>883</b>	<b>296</b>	<b>5633</b>

