

FLÁVIA LEITE LIMA

**ANÁLISE DAS VIAS METABÓLICAS DO CERATOCISTO
ODONTOGÊNICO PRÉ E PÓS MARSUPIALIZAÇÃO E
COMPARAÇÃO À MUCOSA ORAL**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Flávia Leite Lima

**ANÁLISE DAS VIAS METABÓLICAS DO CERATOCISTO
ODONTOGÊNICO PRÉ E PÓS MARSUPIALIZAÇÃO E
COMPARAÇÃO À MUCOSA ORAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Estomatologia Bucal.

Orientador: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

L732a Lima, Flávia Leite.

2021

Análise das vias metabólicas do ceratocisto odontogênico
pré e pós marsupialização e comparação à mucosa oral /

97 f. : il.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB:
6/2727.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DAS VIAS METABÓLICAS DO CERATOCISTO ODONTOGÊNICO PRÉ E PÓS
MARSUPIALIZAÇÃO E COMPARAÇÃO À MUCOSA ORAL**

FLAVIA LEITE LIMA

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

Aprovada em 08 de junho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez – Orientador
FO-UFG

Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa
FO-UFG

Prof(a). Wagner Henriques de Castro
FO-UFG

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 09 / 06 /2021.

Prof. Isabela Almeida Pordeus
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFG

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã, que tanto me dão força e me inspiram a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido a oportunidade de dar mais esse passo em direção ao meu sonho, por sempre me dar forças e me mostrar mais uma vez que não somos nada sozinhos!

Um agradecimento especial a todos que muito me ajudaram na construção desse trabalho, sem vocês não teria conseguido! Obrigada pela paciência que tiveram ao longo de todo o processo.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez pela humanidade que emana, pela confiança em meu potencial e por ter acreditado que eu seria capaz de sair da minha zona de conforto e alçar novos voos profissionais.

Ao professor Wagner Henriques de Castro pelo incentivo e exemplo diário de profissionalismo.

Aos demais professores do mestrado, pela importante colaboração na minha formação.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro indispensável à realização deste trabalho.

RESUMO

O ceratocisto odontogênico (CO) é um dos cistos odontogênicos mais prevalentes da cavidade bucal e o seu tratamento está relacionado a altas taxas de recidiva. Trata-se de uma lesão que apresenta comportamento clínico e características histopatológicas específicas, diferentes dos demais cistos odontogênicos. Embora não exista consenso sobre a melhor forma de tratamento da lesão, a marsupialização é um procedimento amplamente utilizado. Estudos microscópicos, imunohistoquímicos e moleculares mostram que o epitélio do ceratocisto, após a marsupialização, sofre modificações após o contato com a mucosa oral, revelando semelhanças importantes com o revestimento da mucosa. Por outro lado, não sabemos os efeitos desse procedimento sobre as vias metabólicas do cisto. Dessa forma, o presente estudo visa comparar, qualitativa e quantitativamente, as vias metabólicas do epitélio do ceratocisto odontogênico antes da marsupialização com aquelas presentes após esse procedimento e com a mucosa oral dos mesmos indivíduos. A amostra foi constituída por casos de ceratocistos odontogênicos tratados nos serviços de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital municipal Odilon Behrens. O revestimento cístico foi analisado em dois momentos: antes e após a marsupialização da lesão. Os metabólitos foram extraídos de blocos de parafina correspondentes aos fragmentos dos tecidos e submetidos à análise metabolômica do tipo *untargeted*. Os resultados de tal análise foram então comparados aos constituintes da mucosa oral dos mesmos indivíduos. A variação de abundância dos metabólitos e suas funções nos processos de regulação de vias biológicas foram identificadas através de ferramentas de bioinformática e análises estatísticas. A comparação entre a mucosa e CO pré marsupialização revelou dez vias metabólicas significativamente alteradas: metabolismo de oxilipina, ácido linoléico, vitamina E, ácido siálico, ômega-3 e galactose, glicólise e gliconeogênese, transporte de carnitina, biossíntese de ácidos graxos e degradação de α -tocoferol. A comparação entre mucosa e CO pós marsupialização mostrou cinco vias metabólicas alteradas: biossíntese de ubiquinona, glicosfingolipídios e metabolismo de nicotinato / nicotinamida, beta-oxidação de ácidos graxos di-insaturados e ferroptose. Quando comparados os fragmentos de CO antes e após a marsupialização, foram encontrados o metabolismo do nicotinato / nicotinamida, a degradação do α -tocoferol e a biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados como vias metabólicas significativamente alteradas. Nossos achados mostram que o epitélio do cisto deixado em contato com a mucosa oral durante a marsupialização apresenta expressão metabólica mais similar à mucosa oral comparado com a lesão antes do procedimento.

Palavras-chave: Lesões odontogênicas. Tratamento conservador. Metabolômica

ABSTRACT

Metabolic profiling of odontogenic keratocysts prior and after marsupialization and matched oral mucosa

Odontogenic keratocyst (OKC) is one of the most prevalent odontogenic cysts found in the oral cavity and maxillofacial region and its treatment is associated with high recurrence rates. This lesion presents unique clinical behavior and histopathological characteristics as compared to the other odontogenic cysts. Although there is no consensus on the best treatment modality, marsupialization is a widely used procedure. Studies based on microscopic, immunohistochemical and molecular evaluations have been showing that the OKC epithelium undergoes several modifications after its approximation to the adjacent oral mucosa promoted by marsupialization, showing numerous similarities with the mucosal lining of the oral cavity. On the other hand, the effects of this procedure on the metabolic profile of OKC remain largely unknown. Thus, the present study aims to qualitatively and quantitatively compare the metabolic profile of samples of OKC epithelium before and after marsupialization with matched adjacent oral mucosa biopsies. OKC tissue samples were obtained from patients treated at the Oral and Maxillofacial Surgery facilities of the Faculty of Odontology of UFMG and Odilon Behrens Metropolitan Hospital. Metabolites were extracted from formalin fixed paraffin-embedded tissue samples and an untargeted metabolomic analysis was performed using a HPLC-qTOF. Differential abundance of metabolites and regulation of biological pathways among OKCs before and after marsupialization and matched adjacent oral mucosa were identified by bioinformatics and statistical analyses. Our findings revealed that the metabolic profile of the OKC epithelium that maintained contact with the oral mucosa during marsupialization is more similar to the adjacent oral mucosa than to non-treated lesions.

Keywords: Odontogenic keratocyst. Conservative treatment. Metabolomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma da metabolômica tipo <i>untargeted</i>	37
Figura 2	Representação esquemática do processo de obtenção e categorização das amostras.....	41
Figura 3	Curva cromatográfica para análise de outliers.....	43
Figura 4	Blocos de FFPE incluídos no estudo.....	43
Figura 5	Exemplos de modelos de superfície de resposta gerados pelo XCMS após a fase de processamento de dados.....	48
Figura 6	Modelos de superfície resposta após otimização dos parâmetros pelo IPO.....	51
Figura 7	Representação gráfica do comportamento dos dados após normalização no modo positivo (A) e negativo (B)....	53
Figura 8	Representação gráfica da normalidade dos dados (Teste de Shapiro-Wilk) nos modos positivo (A) e negativo (B)....	56
Figura 9	Gráfico de escores obtido através da análise de componente principal (PCA) das amostras nos modos positivo (A) e negativo (B).....	60
Figura 10	Representação esquemática da sobreposição das curvas cromatográficas dos controles de qualidade (QC) das amostras nos modos de ionização positivo (A) e negativo (B)	61
Figura 11	(A) Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) nos modos positivo e negativo. (B) Validação cruzada realizada pelo método de PLS-DA em ambos os modos de ionização.....	62
Figura 12	Representação esquemática (Heatmap) dos 25 features principais expressos através da análise metabolômica.....	63
Figura 13	Representação esquemática dos features estatisticamente significativos observados após análise estatística univariada (2-way ANOVA).....	64

Figura 14 Fotomicrografias representando as alterações morfológicas observadas na mucosa oral (A) e nos fragmentos de ceratocisto odontogênico pré (B) e pós (C) marsupialização..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas dos casos incluídos na amostra do estudo.....	43
Tabela 2	Definição das faixas de melhores parâmetros para otimização posterior nos modos positivo e negativo.....	49
Tabela 3	Exemplos de parâmetros passíveis de serem otimizados pelo IPO e seus respectivos significados.....	49
Tabela 4	Definição dos melhores parâmetros após a otimização no IPO nos modos positivo e negativo.....	51
Tabela 5	Vias metabólicas significativamente alteradas após a identificação putativa dos metabólitos e aplicação dos algoritmos preditivos.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDA – *Axin Interaction Partner and Dorsalization-Antagonist*

ANOVA – Análise de Variância

BCL-2 – Gene Antiapoptótico

Bcl-2 - Proteína Antiapoptótica Codificada pelo Gene BLC-2

BCLAF1 – Gene Pró-Apoptótico Fator 1 Associado à Transcrição

BiGG – *Biochemical Genetic and Genomic Knowledgebase of Large-Scale Metabolic Reconstruction*

BRAF-V600E – Gene Relacionado à Patogênese do Ameloblastoma

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

C18 – Carbono 18

CDK1 – Ciclina Dependente de Quinase 1

CDON – Gene Associado à Adesão Celular Regulado por Oncogene

CE-MS – Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massa

CK10, CK13, CK17 e CK19 – Marcadores Imunohistoquímicos

CNS – Conselho Nacional de Saúde

CO – Ceratocisto Odontogênico

COEP – Comitê de Ética Em Pesquisa

Da - Dalton

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DoE – Design do Estudo

DSG1 – Desmogleína 1

D1 – Ciclina Envolvida no Ciclo Celular e Apoptose

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal

ESI – Ionização por Eletropulverização

FFPE – Fragmentos de Tecido Fixados em Formalina e Parafinizados

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

GLI – Fator de Transcrição Gênica

GLUT-I – Transportador de Glicose 1

GSEA – Gene Set Enrichment Analysis

GSLs - Glicosfingolipídios

HCUFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HMDB – *Human Metabolome Database*

HMOB – Hospital Municipal Odilon Behrens

H₀ – Hipótese Nula

IL-1 α – Interleucina Relacionada à Proliferação de Queratinócitos

IPO – *Isotopologue Parameters Optimization*

JNK - Via *c-Jun N-terminal Kinase*

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Ki-67 – Antígeno Marcador de Proliferação Celular

KRT6B, KRT16, KRTDAP, KRT4 – Genes Relacionados à Proliferação Celular

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

LTBR – Gene Pró-Apoptótico Receptor de Linfotóxina Beta

M1 a M7 – Fragmentos de Mucosa

MAPK1 – Proteína Quinase Ativada por Mitogênio 1

m/z – Relação Massa/Carga

miR-15a e miR16-1 – Micro RNA

NAD⁺ - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NK – *Natural Killer*

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componente Principal

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

POS1 a POS 7 - Fragmentos de Ceratocisto Odontogênico Pós

Marsupialização

PRE1 a PRE 7 - Fragmentos de Ceratocisto Odontogênico Pré Marsupialização

PTCH1 – Gene Supressor de Tumor *Patched*

PUFA – Ácidos Graxos Poli-Insaturados

p21hras – Ciclina Envolvida no Ciclo Celular e Apoptose

p53 – Gene Supressor de Tumor

QC – Controle de Qualidade

QTOF – *Quadrupole Time of Flight*

RNA – Ácido Ribonucleico

RPLC – Cromatografia de Fase Reversa

RSD – Desvio Padrão Relativo

rt – Tempo de Retenção

SHH – Via *Sonic Hedgehog* de Controle de Diferenciação Celular

SMO – Proteína de Membrana *Smoothed*

SOX2 – Marcador de Células Tronco Epiteliais da Lâmina Dental

SPRR1A – *Small Proline Rich Protein 1A*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USA – Estados Unidos da América

V - Volts

VCR – Receptor de Vitamina D

XCMS – Software de Processamento de Dados

3D – Três Dimensões

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Modificações morfológicas, moleculares e imuno-histoquímicas do ceratocisto odontogênico após a marsupialização.....	25
2.2 Ciências “ômicas” e suas aplicações	31
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Aspectos éticos.....	37
5.2 Fluxo de trabalho	37
5.3 Determinação do problema biológico a ser estudado	40
5.4 Planejamento do experimento	40
5.5 Preparo da amostra	42
5.6 Escolha de técnicas analíticas e randomização da amostra preparada..	45
6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	47
6.1 Processamento dos dados.....	47
6.2 Normalização, transformação e escalonamento dos dados.....	52
6.3 Análise estatística multivariada	55

6.4 Análise estatística univariada.....	56
7 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS	57
8 RESULTADOS	60
9 DISCUSSÃO	666
10 CONCLUSÃO.....	72
11 FINANCIAMENTO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	88
APÊNDICES	94

1 INTRODUÇÃO

Descrito pela primeira vez por Philipsen, em 1956, o ceratocisto odontogênico (CO) é uma lesão intraóssea benigna originada de remanescentes da lâmina dentária do epitélio odontogênico, classificado em 2017 pela OMS como lesão de natureza cística (EL- NAGGAR *et al.*, 2017). Ocorre predominantemente em pacientes do gênero masculino, entre a segunda e quarta décadas de vida e tem como sítio mais acometido a região posterior de mandíbula. Pode ser encontrado de forma esporádica ou associado à Síndrome do carcinoma nevóide basocelular (CUNHA *et al.*, 2016).

Apesar de apresentar crescimento lento com ou sem expansão do osso adjacente, o ceratocisto possui caráter infiltrativo e agressivo, o que faz deste uma condição clínica desafiadora (MENDES *et al.*, 2010). Este comportamento está associado com o aumento da expressão de marcadores de proliferação celular e alterações genéticas específicas e que podem estar relacionados às altas taxas de recidiva encontradas na população mundial (CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Tal comportamento é diretamente relacionado à ausência de consenso sobre qual seria a melhor modalidade terapêutica para a lesão. Tais opções são comumente divididas entre abordagens conservadoras (enucleação isolada; enucleação associada a terapias adjuvantes, dentre elas ostectomia periférica e cauterização química com solução de Carnoy; marsupialização e posterior enucleação cística) e radicais (ressecção marginal ou ressecção segmentar) ABDULLAH *et al.*, 2011; AL-MORAISSI *et al.*, 2017). A escolha por uma opção terapêutica em detrimento das demais se deve por diversos fatores, dentre eles a extensão e localização da lesão, idade do paciente, relato de recidivas anteriores ou preferência do profissional (CHRCANOVIC *et al.*, 2017; FIDELE *et al.*, 2019).

Em relação à extensão da lesão, tem-se que lesões menores podem ser abordadas de forma mais conservadora com taxas de sucesso relativamente satisfatórias. Já lesões mais extensas, que trariam grandes déficits estéticos e funcionais ao paciente, caso fossem abordadas em um primeiro momento

através de modalidades radicais, podem ser tratadas a partir de uma opção mais conservadora: a marsupialização (FIDELE *et al.*, 2019).

A marsupialização consiste na criação de uma comunicação entre a loja da lesão e o ambiente oral. Essa terapia possibilita redução considerável do tamanho da lesão, bem como espessamento do revestimento cístico, o que facilita a manobra de enucleação que é realizada em um momento posterior. Um revestimento mais espesso e uma lesão de menores proporções permitem a enucleação total da lesão, evitando a sua fragmentação, diminuindo as chances de recidiva, e, conseqüentemente, fornecendo melhor qualidade de vida ao paciente (POGREL *et al.*, 2004).

As modificações biológicas encontradas no epitélio do ceratocisto odontogênico, após a marsupialização já foram avaliadas sob a perspectiva morfológica, molecular e imunohistoquímica. Estudos comprovaram que uma vez submetido à marsupialização, o epitélio do ceratocisto sofre alterações metaplásicas que o tornam semelhante à mucosa oral (CSERNI *et al.*, 2019).

Com o advento das ciências “ômicas”, foi possível maior conhecimento acerca da patogenia das lesões. É nesse sentido que a metabolômica surge como uma importante ferramenta para determinação das vias metabólicas constituintes do revestimento cístico e da mucosa oral. A marsupialização promove alterações metabólicas no epitélio da lesão que aproximam seu perfil ao da mucosa oral ou a lesão permanece com maior similaridade à lesão inicial?

A compreensão das modificações metabólicas presentes no revestimento do ceratocisto após a marsupialização possibilitará melhor compreensão das modificações fenotípicas da lesão com o uso dessa terapia, o que poderá, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O ceratocisto odontogênico é um dos mais prevalentes dos cistos odontogênicos e é descrito como uma lesão intraóssea benigna, originada a partir de remanescentes celulares da lâmina dental. Diferentemente dos demais cistos epiteliais, os quais crescem a partir do aumento da pressão hidrostática intraluminal, o ceratocisto odontogênico se desenvolve a partir de proliferação celular, seja pela presença de cistos satélites em sua cápsula, seja pela atividade enzimática na parede cística (ODELL *et al.*, 2017).

Trata-se de uma lesão que ocorre mais comumente na região posterior dos maxilares, especialmente na mandíbula. Pacientes do gênero masculino, e aqueles encontrados entre a segunda e quarta décadas de vida são acometidos com maior frequência (CUNHA *et al.*, 2016). Lesões menores tendem a ser assintomáticas e descobertas em exames radiográficos de rotina, enquanto lesões mais extensas podem estar relacionadas à dor e aumento de volume (HADZIABDIC *et al.*, 2019).

Sua patogênese é amplamente consolidada na literatura e é determinada pelo papel da via SHH/PTCH1/SMO. A via SHH (*sonic hedgehog*) é uma via de sinalização do desenvolvimento que possui papel importante no processo de crescimento celular durante a embriogênese (HADDEN *et al.*, 2016). A morfogênese dos dentes e a diferenciação celular está sob controle genético, representado por essa via, proteínas morfogenéticas e genes supressores de tumor. Mutações nesses genes induzem ao desenvolvimento da lesão da seguinte forma: o gene PTCH1 atua inibindo a via SMO. Quando ocorre a ligação do SHH ao domínio extracelular do PTCH1, o efeito inibitório desse sobre a via do SMO deixa de ocorrer, levando à ativação do fator de transcrição GLI que regula a transcrição dos genes proliferativos do SHH e consequente proliferação celular desregulada. Tais mutações podem influenciar diretamente o manejo terapêutico da lesão (MENDES *et al.*, 2010).

Essas mutações, porém, não são encontradas em aproximadamente 20% dos casos de ceratocisto odontogênico isolado. Com o objetivo de avaliar a importância de tais mutações relacionadas aos casos de COs esporádicos, Qu e colaboradores, analisaram em 2015, uma amostra de 19 casos de ceratocisto

odontogênico a partir do sequenciamento gênico do revestimento epitelial separado da respectiva cápsula da lesão. Além disso, realizaram uma nova análise em mais nove casos em que as mutações do gene PTCH1 foram consideradas ausentes. Os autores acreditavam que essas mutações eram subestimadas em casos de lesões esporádicas devido a possível contaminação promovida pelos componentes do estroma, a qual poderia ocultar tais mutações. Essas alterações foram encontradas em 16 dos 19 novos casos e em 3 dos 9 casos previamente analisados, o que comprova o papel crucial de tais mutações na patogênese da lesão (QU *et al.*, 2015).

Em 2019 o mesmo grupo procurou confirmar os achados obtidos no estudo de 2015, através da avaliação das mutações do gene PTCH1 em 38 casos de CO. Além disso, realizaram a análise de perda de heterozigosidade e o sequenciamento do exoma da lesão nos casos em que as mutações eram ausentes, no sentido de investigar o envolvimento de outros genes no desenvolvimento do cisto. Os genes avaliados como potenciais causadores do cisto nesse estudo foram CDON e MAPK1. Dos 38 casos, 30 (79%) apresentaram mutações em PTCH1 e todas elas se mostraram como sendo de natureza somática, uma vez que essa alteração não foi encontrada nas células do estroma. Entre os oito casos restantes, dois cistos apresentaram perda de heterozigosidade em pelo menos dois loci, o que sugere que essas lesões podem ter sido causadas por perda de heterozigosidade em PTCH1 e não por mutações. Através do sequenciamento do exoma foram encontradas 125 alterações somáticas em cinco casos, porém apenas um deles apresentou 22 novas mutações. Além disso, as mutações nos genes CDON e MAPK1 parecem estar envolvidas no desenvolvimento da lesão de forma rara e passageira. Os achados do estudo permitiram comprovar a importância que as mutações ocorridas no gene PTCH1 representam na patogênese do CO e sugerem possíveis direcionamentos para a terapêutica desta lesão (QU *et al.*, 2019).

Estudos envolvendo transcriptômica revelaram uma superexpressão de genes relacionados ao epitélio escamoso do ceratocisto esporádico (genes KRT6B, KRT16 e CDK1 e marcadores SPRR1A, KRTDAP, KRT4 E DSG1) e aumento da expressão do marcador de células tronco epiteliais da lâmina dental SOX2, o que indica um processo de diferenciação dessas células em queratinócitos (HEIKINHEIMO *et al.*, 2015).

O ceratocisto se apresenta radiograficamente como uma lesão radiolúcida uni ou multilocular com borda esclerótica bem definida. Pode provocar deslocamento e reabsorção radiculares, atraso na exfoliação de um dente decíduo bem como ausência de erupção de um dente permanente (TABRIZI *et al.*, 2014).

A análise histológica do ceratocisto, por sua vez, revela a presença de um epitélio fino e friável do tipo estratificado escamoso paraqueratinizado, formado por 5 a 8 camadas de células. A presença de corrugações epiteliais na superfície da lesão também é observada. A camada basal é composta por células dispostas em paliçada, e a interface entre epitélio e conjuntivo é plana (BARNES *et al.*, 2005; EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Em 2017, o ceratocisto foi novamente considerado como lesão cística pela Organização mundial de saúde (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Um dos motivos dessa reclassificação foi baseado no fato de que as mutações do gene PTCH1, amplamente encontradas no ceratocisto, também foram encontradas em outros cistos do desenvolvimento. Outra razão foi resposta favorável do ceratocisto quando submetido à descompressão, o que não é compatível ao comportamento de uma neoplasia (HADZIABDIC *et al.*, 2019).

Apesar de ser classificado como um cisto, não se pode negar seu comportamento invasivo, o qual é bem estabelecido na literatura, e pode ser indicado por diversos fatores, dentre eles a presença de cistos satélites na parede cística, pouca adesão epitélio/cápsula e a expressão de determinados marcadores celulares e mutações genéticas (AL-MORAISSI *et al.*, 2016; KAHRAMAN *et al.*, 2018; KINARD *et al.*, 2019; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; WRIGHT *et al.*, 2017). Essa característica torna mais importante a escolha pela forma de tratamento a ser adotada em cada caso, devido ao seu alto grau de recidiva que pode chegar em média a 30%.

O alto grau de recidiva observado nos casos de ceratocisto odontogênico pode ser explicado pelos seguintes fatores: 1) Presença de remanescentes císticos que não foram removidos na ocasião do tratamento ou que foram removidos de forma incompleta, uma vez que seu revestimento fino e friável dificulta sua remoção; 2) Presença de cistos satélites ou cistos “filhos” que possam ser deixados além da loja cirúrgica, principalmente nos casos de cistos associados à síndrome de carcinomas basocelulares 3) Desenvolvimento de um

novo cisto a partir de ilhas epiteliais ou microcistos encontrados na mucosa subjacente (AL-MORAISSI *et al.*, 2016).

As modalidades terapêuticas para o ceratocisto odontogênico podem ser classificadas como conservadoras ou radicais. As abordagens conservadoras são representadas pela enucleação cística isolada e pela marsupialização (DE CASTRO *et al.*, 2018).

A enucleação consiste na remoção completa da lesão cística de sua cavidade óssea sem deixar nenhum remanescente microscópico da lesão (DE CASTRO *et al.*, 2018). Essa modalidade é dificilmente realizada isoladamente, pois está associada a altos índices de recidiva (13 a 56%) devido à característica fina e friável da cápsula cística (DIAS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2010).

Em 2016, um estudo avaliou os índices de recidiva de 1005 amostras de ceratocisto, tratadas através de enucleação cística e cauterização química com solução de Carnoy entre os anos de 1990 a 2013. A recidiva foi observada em 11.4% dos casos, o que pode ser considerado baixo em função do número amplo de casos analisados. Esse estudo permite concluir que a associação de terapias adjuvantes como o uso da solução de Carnoy pode contribuir de maneira significativa para a redução dos índices de recidiva do ceratocisto (LEUNG *et al.*, 2016).

Considerando a enucleação cística, Al-moraissi e colaboradores, em uma revisão sistemática realizada em 2016, analisaram a importância da remoção do tecido da mucosa adjacente à lesão e sua respectiva redução das taxas de recidiva do ceratocisto odontogênico. Após a análise de onze estudos, foi concluído que não havia diferença estatisticamente significativa entre as taxas de recidiva quando comparados os casos abordados através de enucleação e aqueles cuja enucleação foi associada à remoção de mucosa circunjacente. Os autores concluíram que a enucleação associada à cauterização química produzida pela aplicação de solução Carnoy ou nitrogênio líquido representam excelentes alternativas de tratamento (AL-MORAISSI *et al.*, 2016).

A marsupialização consiste no estabelecimento de uma comunicação entre o epitélio de revestimento cístico e a cavidade oral através da criação de uma janela óssea e remoção cirúrgica da parede superior do cisto com posterior sutura do revestimento epitelial à mucosa subjacente. Geralmente é uma opção de escolha para a abordagem de lesões de maiores extensões ou próximas a

estruturas anatômicas importantes. A espessura reduzida do epitélio dificulta a remoção completa da lesão. Se ela não for completamente removida, os fragmentos remanescentes podem dar origem a recidivas. Tal procedimento promove, além da redução do defeito cirúrgico, uma metaplasia e um espessamento considerável do revestimento cístico, o que por sua vez facilita a completa enucleação cística e está relacionado a menores taxas de recidiva (DIAS *et al.*, 2017; POGREL *et al.*, 2004).

A modalidade de tratamento radical é representada pela ostectomia periférica da cavidade cística, que geralmente é realizada após a enucleação, uso de terapias adjuvantes como cauterização química com nitrogênio líquido ou solução de Carnoy e ressecção (DE CASTRO *et al.*, 2018). Esta pode ser realizada de maneira segmentar, em que todo o segmento afetado é removido cirurgicamente, ou de forma marginal, em que o cisto é removido juntamente com uma margem de tecido sadio, circunjacente à lesão. Tal alternativa deve ser reservada a abordagem de lesões múltiplas, recorrentes, com envolvimento de tecidos moles adjacentes ou sinais de ruptura de cortical óssea (VALLEJO-ROSETO *et al.*, 2020). Se tal alternativa apresenta menores taxas de recorrência por um lado, por outro está relacionada à maior morbidade e comprometimento funcional e estético para o paciente (DIAS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2010).

Existem vários estudos comparativos entre as modalidades de tratamento disponíveis, e ainda não existe um consenso sobre qual delas representa a melhor abordagem, e se essa superioridade realmente existe (ABDULLAH *et al.*, 2011; AL-MORAISSEI *et al.*, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2017; FIDELE *et al.*, 2019).

Em um estudo do tipo coorte de 2019, Sigua-Rodriguez e colaboradores realizaram uma análise comparativa entre dois protocolos terapêuticos do ceratocisto, diagnosticados entre os anos de 1991 a 2018. O protocolo de etapa única era baseado na realização de enucleação e curetagem associada à ostectomia periférica da cavidade cística, enquanto a modalidade de duas etapas era baseada na realização de descompressão cística prévia, seguida pela enucleação e curetagem associada à ostectomia periférica após redução do tamanho das lesões (diâmetro menor do que 3 cm). A amostra final foi constituída por 72 casos. 13 foram submetidos ao protocolo terapêutico de uma etapa e 59 ao de duas etapas. Ambas as opções se mostraram seguras e

apropriadas como primeira escolha para o tratamento de tal condição e o acompanhamento dos pacientes deve ser realizado de forma criteriosa independente da modalidade terapêutica escolhida (SIGUA-RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

Alguns fatores podem ser relacionados à dificuldade em se comparar as modalidades terapêuticas utilizadas nos estudos. Dentre eles destacam-se: tamanho das amostras reduzido, natureza retrospectiva dos estudos, falta de detalhamento acerca do tratamento realizado e períodos de follow-up distintos (PITAK-ARNNOP *et al.*, 2010).

Uma revisão sistemática de 2018 objetivou a realização de uma análise das características clinicopatológicas de 1900 casos de ceratocisto odontogênico submetidos a tratamentos conservadores de marsupialização com posterior enucleação e enucleação isolada, com o mínimo de follow-up de 12 meses. A primeira opção terapêutica mostrou resultados superiores à segunda, no que diz respeito às taxas de recidiva, o que demonstra a boa aplicabilidade da técnica de marsupialização (DE CASTRO *et al.*, 2018).

Em outra revisão sistemática realizada em 2017, Al-Moraissi e colaboradores compararam as diversas abordagens terapêuticas disponíveis para o ceratocisto odontogênico. Oito estudos com 63 casos utilizaram a descompressão como modalidade de escolha e nove estudos, incluindo 141 casos, realizaram a descompressão associada à enucleação. A marsupialização como tratamento definitivo foi relacionada a maiores taxas de recidiva, se comparada à descompressão associada à cistectomia (AL-MORAISSI *et al.*, 2017).

Outra revisão sistemática do mesmo ano comparou as taxas de recidiva do ceratocisto quando submetido a tratamentos conservadores. Nesse estudo o autor diferenciou os termos marsupialização e descompressão cística. Segundo ele, a marsupialização consiste na remoção do teto da cavidade cística e sutura do revestimento cístico à mucosa, enquanto a descompressão está baseada no uso de um dreno para manter a permeabilidade da abertura criada na loja cística. Ambos os métodos objetivam reduzir a pressão intraluminal e o conseqüente volume da lesão. Tais técnicas, quando realizadas isoladamente, apresentaram recidivas de 18.2% e 18.5% respectivamente. Por outro lado, quando associadas à enucleação, apresentaram mínimas taxas de recidiva de 17.8% e 11.9%. Esse

achado sugeriu que essa associação constitui a melhor opção de tratamento conservador para o ceratocisto (DE CASTRO *et al.*, 2018).

Chrcanovic e colaboradores, ainda em 2017, conduziram uma análise de 6427 casos de ceratocisto odontogênico e compararam a probabilidade de recorrência da lesão em relação aos seguintes parâmetros: localização anatômica, gênero, locularidade radiográfica e modalidade terapêutica escolhida. Em relação à forma de tratamento, os autores concluíram que a marsupialização associada à enucleação cística reduziu as chances de recidiva (11,3%), se comparada à marsupialização isolada (22,5%). A modalidade mais provável para prevenção de recidiva foi a ressecção, porém sua escolha deve ser realizada de forma cautelosa, uma vez que abordagens menos agressivas mostram resultados satisfatórios em lesões menos extensas (CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Outro importante fator a ser considerado quando se trata de recidiva é o período de acompanhamento pós-operatório. Em função de seu caráter infiltrativo e agressivo, Berge e colaboradores, em 2016, analisaram o padrão de recorrência do ceratocisto odontogênico em casos tratados entre os anos de 1975 a 2012 na Noruega. Os autores concluíram que o risco de recidiva aumentava até sete anos após o tratamento da lesão, o que indica um comportamento tempo dependente. Foi então sugerido um protocolo de retornos para avaliação clínica e radiográfica de 2, 4 e 7 anos após o tratamento seguido de intervalos de 3 a 4 anos para pacientes com alterações sistêmicas e/ou lesões extensas e um protocolo de 4, 6 e 8 anos para os demais pacientes, seguido pelo mesmo intervalo de 3 a 4 anos (BERGE *et al.*, 2016).

2.1 Modificações morfológicas, moleculares e imuno-histoquímicas do ceratocisto odontogênico após a marsupialização

A marsupialização, também conhecida como descompressão cística, foi relatada pela primeira vez por Partsch em 1892. As vantagens apresentadas em realização às demais técnicas utilizadas para o tratamento do ceratocisto odontogênico anteriormente citadas são: técnica de simples execução, não está relacionada a complicações pós-operatórias graves, apresenta menor morbidade e possibilita a preservação de estruturas anatômicas adjacentes

(CAIXETA *et al.*, 2017). Essas vantagens garantem melhor qualidade de vida ao paciente. Como desvantagens, cita-se a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico de cistectomia e a possibilidade de não adaptação ao dispositivo de descompressão. Tais desvantagens, por sua vez, não suplantam os benefícios trazidos pela técnica, que é largamente utilizada na prática odontológica. Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e moleculares mostram as alterações no epitélio do revestimento cístico marsupializado.

O ceratocisto apresenta um revestimento epitelial delgado e interface epitélio/conjuntivo plana geralmente sem alterações inflamatórias. As células da camada basal são colunares ou cuboidais e dispostas em paliçada e observa-se a presença de paraceratina em sua superfície. Essas características histológicas, quando presentes, são suficientes para o diagnóstico da lesão. Porém, quando submetido à marsupialização, além da redução do defeito ósseo associado, são observadas alterações no revestimento cístico, tanto do ponto de vista molecular, quanto do ponto de vista morfológico, o que pode dificultar o diagnóstico (CSERNI *et al.*, 2019).

Em relação às alterações morfológicas, observa-se que o epitélio paraqueratinizado do ceratocisto odontogênico torna-se do tipo escamoso não ceratinizado semelhante à mucosa oral, perda parcial ou completa das células em paliçada na camada basal e, na interface epitélio/conjuntivo, ocorre a formação de cristas epiteliais. Além disso, podem ser observadas áreas desnudas de epitélio, bem como a presença de células inflamatórias. A cápsula cística torna-se mais espessa e menos aderida às estruturas adjacentes, o que facilita a remoção completa do cisto com menores chances de recidiva (CSERNI *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2018).

Com o objetivo de avaliar se a descompressão cística promove alterações na histologia ou no comportamento biológico do cisto, Awni e colaboradores, em 2017, realizaram um estudo com 17 pacientes. Todos foram submetidos à descompressão cística, associada ou não a posterior enucleação. A amostra foi então submetida à avaliação histológica e imunohistoquímica quanto à expressão dos marcadores p53, Ki-67 e Bcl-2, possivelmente relacionados ao potencial de recidiva da lesão. Foi observado que, após ser submetida à marsupialização, a amostra apresentou significativo aumento da cápsula fibrosa da lesão e redução da atividade mitótica. Não houve evidência estatística quanto

à influência da marsupialização na expressão dos marcadores celulares no revestimento cístico, o que pode indicar que o potencial de recidiva não está restrito à expressão dessas proteínas. O processo inflamatório e a expressão do marcador p53 aumentaram de forma diretamente proporcional à duração do tratamento, o que pode influenciar o risco de recorrência (AWNI *et al.*, 2017).

Considerando as alterações moleculares, um estudo de 2012 avaliou a expressão de microRNAs (miR-15a e miR16-1) no ceratocisto. MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes responsáveis por regular a expressão gênica após a transcrição, através da degradação do RNA mensageiro ou por inibição da transcrição. Os microRNAs miR-15a e miR-16-1 atuam inibindo o gene antiapoptótico *BCL2*. Os autores observaram diminuição da expressão desses miRNAs, com consequente superexpressão do mRNA do gene *BCL2* no ceratocisto não marsupializado. Para os autores, isso poderia contribuir para a proliferação das células do cisto, contribuindo para o seu comportamento biológico. Ainda nesse estudo, os autores observaram que nas lesões após a marsupialização, havia menor expressão da proteína Bcl-2, associado com aumento da expressão de miRNA (miR15-a e miR16-1) (DINIZ *et al.*, 2012).

Um estudo mais recente do mesmo grupo procurou investigar as causas de tal desregulação. Este estudo relacionou os achados de desregulação do microRNA e consequente superexpressão do gene *BCL2* observados no ceratocisto odontogênico à perda de heterozigossidade dos genes *MIR15A/MIR16-1* na posição 13 q14.3. Esta relação, porém, não foi observada no ceratocisto (DE RESENDE *et al.*, 2018).

Pereira e colaboradores, em 2017, compararam o perfil de metilação de 22 genes pró apoptóticos encontrados no ceratocisto antes e após a marsupialização. Através da metilação ocorre uma alteração do mecanismo regulador da expressão gênica, porém sem alterar a sequência do DNA da lesão. Foi observada maior porcentagem de metilação dos genes indutores de apoptose *BCLAF1* (Bcl-2 – fator 1 associado à transcrição) e *LTBR* (receptor de linfotóxina beta) em lesões marsupializadas, porém não foram observadas alterações na expressão gênica. Os autores concluíram que a reação inflamatória desencadeada pela descompressão cística pode contribuir para o

desenvolvimento de alterações epigenéticas como a hipermetilação (PEREIRA *et al.*, 2017).

Diniz e colaboradores, em 2009, investigaram a expressão dos primeiros exons 1d, 1b e 1e do gene PTCH1 em uma amostra de 40 ceratocistos através de PCR em tempo real. O exon 1b foi expresso em 90% dos ceratocistos e em nenhum folículo dental (utilizados para controle). O padrão de expressão desse exon foi semelhante ao encontrado na mucosa oral. Quando submetido à marsupialização, porém, foi observada a perda da expressão do exon 1b. Isso indica que a marsupialização pode alterar o perfil de expressão do gene PTCH1 em lesões marsupializadas, o que pode estar associado ao perfil agressivo da lesão. (DINIZ *et al.*, 2009).

Através da imunohistoquímica, Brajić e colaboradores avaliaram a expressão das proteínas survivina, ciclina D1 e p21hras, envolvidas no ciclo celular e apoptose. Foram analisadas 18 amostras de ceratocisto antes e após a marsupialização. Todas as amostras analisadas apresentaram positividade para as proteínas analisadas nos dois momentos, apesar da redução de tamanho das lesões. A positividade para survivina foi maior após a marsupialização, o que pode ser atribuído ao aumento da proliferação epitelial promovida por essa abordagem (BRAJIĆ *et al.*, 2016).

Na tentativa de estabelecer um perfil de expressão de citoqueratinas, Tsuji e colaboradores, em 2014, avaliaram a expressão de citoqueratinas em 25 casos de ceratocisto odontogênico através de imunohistoquímica. Em 22 casos, houve negatividade para CK10 na camada superficial do epitélio e em todos os 25 casos houve negatividade para CK10 na camada espinhosa. Houve positividade para CK13, CK17 e CK19 nas regiões superficial e espinhosa do epitélio (TSUJI *et al.*, 2014).

Outros estudos analisaram o efeito da marsupialização sobre a expressão de citoqueratinas e da proteína antiapoptótica Bcl-2 no ceratocisto odontogênico. Nas lesões antes da marsupialização foi observada positividade para Bcl-2 (proteína antiapoptótica), CK17, CK19 e CK10. O marcador Bcl2 foi encontrado na camada basal e suprabasal do revestimento típico do ceratocisto, enquanto o CK17 foi observado na camada intermediária do epitélio. Já o CK19 apresentou padrão similar de distribuição ao CK17, também expresso em outros cistos odontogênicos. Por fim a positividade para CK10 foi encontrada de maneira

difusa na camada superficial do epitélio. Após a marsupialização, a mudança predominantemente observada foi a perda de expressão da proteína Bcl-2 no revestimento do cisto, o que pode indicar alterações no ciclo celular das células que compõem a lesão. O CK17 mostrou-se com coloração reduzida ou ausente, enquanto CK19 e CK10 não demonstraram alterações significativas (CSERNI *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2017; POGREL *et al.*, 2004).

August e colaboradores, em 2003, analisaram a presença da expressão de CK10, através de imuno-histoquímica, em 14 ceratocistos submetidos à marsupialização. A cada três meses, eram realizadas novas radiografias panorâmicas e removidas novas amostras do revestimento epitelial para o estudo. As amostras citológicas colhidas apresentaram positividade para CK10 nos períodos de 3 e 6 meses após a marsupialização, porém 9 das 14 amostras demonstraram negatividade para CK10 no momento da enucleação cística, realizada em média 9 meses após a primeira intervenção. Esses dados mostram que a marsupialização interfere no processo de diferenciação das células epiteliais do cisto (AUGUST *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado em 2002, Ninomiya e colaboradores investigaram as alterações na síntese de interleucinas tipo 1 causadas pela marsupialização. Segundo o estudo, a IL-1 α está relacionada à atividade proliferativa dos queratinócitos e estimula a atividade das células osteoclásticas envolvidas no crescimento infiltrativo do cisto, e sua expressão é reduzida após a descompressão cística. Tal achado permite concluir que a marsupialização reduz o tamanho do ceratocisto através da inibição da IL-1 α e a proliferação das células epiteliais. (NINOMIYA *et al.*, 2002).

Um estudo de 28 amostras foi realizado em 2002, com o objetivo de avaliar os efeitos provocados pela descompressão cística no ceratocisto, relacionados aos respectivos índices de recidiva (NAKAMURA *et al.*, 2002). As mudanças em relação ao crescimento da lesão foram analisadas histologicamente e focadas na formação de queratina no revestimento epitelial e na ocorrência de microcistos satélites. Para avaliar as mudanças relacionadas ao potencial proliferativo da lesão, recorreu-se à imunohistoquímica, com o uso do anticorpo monoclonal Ki-67. A marsupialização promoveu mudanças histológicas significativas. O revestimento cístico tornou-se do tipo hiperplásico, estratificado e não queratinizado com uma fina parede de tecido conjuntivo em

10 dos 28 casos. Foi observada maior presença de microcistos satélites após a marsupialização. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à reação ao anticorpo Ki-67 antes e após a descompressão. Houve recidiva do CO em 6 dos 28 casos analisados, porém esta se mostrou mais influenciada pela localização e aspecto radiográfico das lesões (região posterior de mandíbula e aspecto multilocular, respectivamente), do que pela realização da marsupialização propriamente dita. Isso pode ser explicado devido à dificuldade de acesso em regiões posteriores dos maxilares, bem como ao aspecto multilocular, o que pode estar relacionado à remoção incompleta do cisto. A marsupialização mostrou-se, portanto, como uma efetiva forma terapêutica preliminar que promoveu a redução considerável das dimensões dos ceratocistos. (NAKAMURA *et al.*, 2002).

Telles e colaboradores, em 2013, realizaram uma análise morfométrica do revestimento epitelial e da cápsula cística de seis casos de ceratocisto odontogênico antes e após a marsupialização. Antes da marsupialização, as amostras apresentaram características típicas do ceratocisto quanto ao revestimento epitelial. Após a realização do procedimento, foi observado espessamento da cápsula cística, perda da queratinização do epitélio e hiperplasia epitelial. A diferença encontrada em relação à espessura epitelial foi estatisticamente significativa (TELLES *et al.*, 2013).

Para determinar como a extensão do ceratocisto é reduzida pela marsupialização, Shudou e colaboradores realizaram um estudo envolvendo análise de tomografia computadorizada de uma amostra de 15 pacientes. Os dados tomográficos foram obtidos durante o período de descompressão cística e convertidos em imagens em 3D. Essas imagens foram comparadas através da medição de seu maior diâmetro e volume no decorrer do tratamento. Foi observado que ceratocistos marsupializados tendem a reduzir-se de tamanho em direção à abertura criada pelo procedimento, e que lesões maiores respondem de forma mais satisfatória quando marsupializadas. Esses dados permitem prever o formato futuro de um cisto marsupializado e a duração do tratamento, evitando assim abordagens muito prolongadas (SHUDOU *et al.*, 2012).

Zhao e colaboradores, em 2011, avaliaram as alterações do volume cístico e densidade óssea adjacente ao ceratocisto provocadas pela

marsupialização em 53 pacientes. O volume da lesão foi mensurado a partir de injeção de solução salina no interior da loja cística. A alteração da densidade óssea foi avaliada através de radiografias panorâmicas. As aferições foram realizadas em períodos de 1, 3 e 6 meses após a intervenção cirúrgica. Os autores observaram redução média do volume cístico de 19,05% no primeiro mês, 55,62% no terceiro mês e 79,67% no sexto mês. Já em relação à densidade óssea da loja cirúrgica, foi observado um aumento de 22,42% no primeiro mês, 46,07% em três meses e 64,69% em seis meses (ZHAO *et al.*, 2011).

2.2 Ciências “ômicas” e suas aplicações

Com o objetivo de avaliar como as interações entre as biomoléculas afetam os processos biológicos de um organismo, recorreu-se a vários métodos bioanalíticos, dentre eles a fisiologia e a biologia molecular. Tais métodos, porém, permitiam a obtenção de dados incapazes de caracterizar as interações biológicas como o intrincado e complexo sistema que são. Nesse contexto surgiu a necessidade de buscar uma ferramenta mais abrangente que pudesse trazer todas as informações sobre o fenótipo das biomoléculas e de suas interações, e essa necessidade culminou com o desenvolvimento das ciências ômicas (KLASSEN *et al.*, 2017).

As ciências ômicas constituem um conjunto formado pela genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica. Cada uma delas é capaz de identificar o conjunto de biomoléculas pertencentes aos sistemas biológicos, sejam elas genes, proteínas ou metabólitos. A partir dessa identificação é possível realizar uma imensa gama de análises com extrema riqueza de dados e comparar substratos normais aos submetidos a algum tipo de alteração biológica (KLASSEN *et al.*, 2017).

Descrito pela primeira vez em 2001 por Oliver Fiehn, o termo metabolômica refere-se ao estudo qualitativo e quantitativo dos metabólitos encontrados em determinado organismo, conhecido desde 1998 como metaboloma. Os metabólitos por sua vez, constituem o resultado final das reações químicas do nosso organismo. Seu surgimento se deu a partir da descoberta do genoma e do seu funcionamento e suas interações com o ambiente (CANUTO *et al.*, 2016).

Sua aplicação é muito importante em diversas áreas, e na Odontologia tem se mostrado uma ferramenta indispensável para o estudo de marcadores moleculares envolvidos na patogênese de diversas lesões encontradas na prática diária, tais como ameloblastoma e líquen plano (CRUZ *et al.*, 2019; DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2019; DUDZIK *et al.*, 2018; WISHART *et al.*, 2016).

Li e colaboradores utilizaram a metabolômica como ferramenta para analisar o perfil metabólico do líquen-plano erosivo oral, lesão esta que apresenta elevado potencial de transformação maligna se comparado à forma clínica não erosiva. Os autores utilizaram amostras de urina de pacientes e a técnica analítica de escolha foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Foram detectados 12 metabólitos identificados como possíveis biomarcadores da lesão, e desregulação na expressão desses marcadores metabólicos podem explicar a sua patogênese e podem funcionar como alvos terapêuticos potenciais no manejo da lesão (LI *et al.*, 2017).

Cruz e colaboradores em 2019 realizaram uma comparação entre as formas clínicas de líquen plano reticular e erosivo sob o ponto de vista molecular através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Através da metabolômica foi possível elucidar as diferenças existentes entre o perfil metabólico das formas clínicas acima citadas, o que pode contribuir sobremaneira para o manejo terapêutico da lesão (CRUZ *et al.*, 2019).

Outra aplicação importante da metabolômica pode ser observada no estudo de Shi-Kai Yan e colaboradores. Através dela foi possível elaborar uma forma diagnóstica, baseada no ponto de vista metabólico, para o carcinoma de células escamosas oral e duas lesões potencialmente malignas representadas pelo líquen plano e a leucoplasia oral. Amostras de saliva foram coletadas de indivíduos saudáveis e doentes e analisadas através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Os resultados mostraram que o perfil metabólico é perfeitamente capaz de descrever as características patológicas das lesões, o que pode contribuir e muito para o diagnóstico precoce dessas doenças e consequentemente conferir melhor qualidade de vida aos pacientes (YAN *et al.*, 2008).

Ainda em 2019, Duarte-Andrade e colaboradores utilizaram a metabolômica para avaliar se alterações metabólicas encontradas no ameloblastoma estão relacionadas às mutações no gene BRAF-V600E que está

diretamente relacionado à patogênese do ameloblastoma ou ao comportamento biológico da lesão. Através dessa ferramenta foi possível observar a ausência de diferenças, sob o ponto de vista metabólico, entre lesões primárias ou recorrentes (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2019).

Através da proteômica, Gomez e colaboradores em 2020 procuraram avaliar o papel das proteínas expressas pelo ceratocisto odontogênico e pela mucosa normal adjacente com o objetivo de explorar a base molecular do desenvolvimento do ceratocisto e relacioná-la aos altos índices de recidiva. Cinco fragmentos de lesão e de mucosa oral adjacente foram avaliados através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Quatro deles se tratavam de casos de lesão esporádica. Foram identificadas 1150 proteínas, das quais 95% foram expressas tanto nos fragmentos de lesão quanto nos de mucosa normal. 164 proteínas foram expressas de forma variada entre os dois grupos e 27 delas mostraram-se exclusivas para o CO. Os achados permitiram observar uma redução da expressão de proteínas desmossomiais, o que pode levar ao desenvolvimento de desmossomos frágeis e explicar a característica friável do revestimento epitelial do CO que, por sua vez, está diretamente associada ao alto potencial de recidiva da lesão. Também foi observado aumento da expressão de proteases associadas à degradação de matriz extracelular, o que pode explicar a separação encontrada entre o revestimento epitelial e a cápsula cística. Essa característica também pode ser relacionada aos altos índices de recidiva da lesão, uma vez que pode predispor a remoção cística incompleta. (DINIZ *et al.*, 2020).

O perfil proteômico do ceratocisto odontogênico também foi avaliado por Malčić e colaboradores em 2015. A partir desse estudo foi possível comparar a expressão de proteínas em fragmentos de CO à expressão proteica encontrada nos fragmentos de mucosa normal e de cisto radicular, o qual se apresenta como lesão odontogênica de natureza inflamatória. Quando comparado à mucosa oral, o ceratocisto apresentou a expressão diferenciada de 43 tipos de proteínas que desempenham papel importante nos mecanismos de proliferação celular, transcrição gênica, organização do citoesqueleto, motilidade celular e apoptose. A validação dos achados através da imunohistoquímica permitiu revelar a presença da proteína AIDA, a qual bloqueia a ativação da via JNK e encontra-se

aumentada nos fragmentos de CO quando comparados aos de cisto radicular (MALČIĆ *et al.*, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A patogênese do ceratocisto, bem como as alterações da lesão quando submetida à marsupialização ainda não são bem elucidadas. Embora existam estudos sobre as modificações biológicas do epitélio do ceratocisto odontogênico após a marsupialização, com o uso de técnicas moleculares ou de imuno-histoquímica, não existem trabalhos com o uso da metabolômica. A metabolômica é uma ferramenta amplamente utilizada para a investigação de constituintes metabólicos. A compreensão das modificações metabólicas presentes no revestimento do ceratocisto após a marsupialização possibilitará melhor compreensão das modificações fenotípicas da lesão com o uso dessa terapia, o que poderá, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil metabólico do revestimento epitelial do Ceratocisto odontogênico pré e pós marsupialização e compará-lo ao revestimento da mucosa oral.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o grau de metaplasia sofrido pelo revestimento do ceratocisto ao ser submetido à marsupialização.
- Analisar comparativamente as vias metabólicas do ceratocisto pré e pós marsupialização, frente à mucosa oral.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

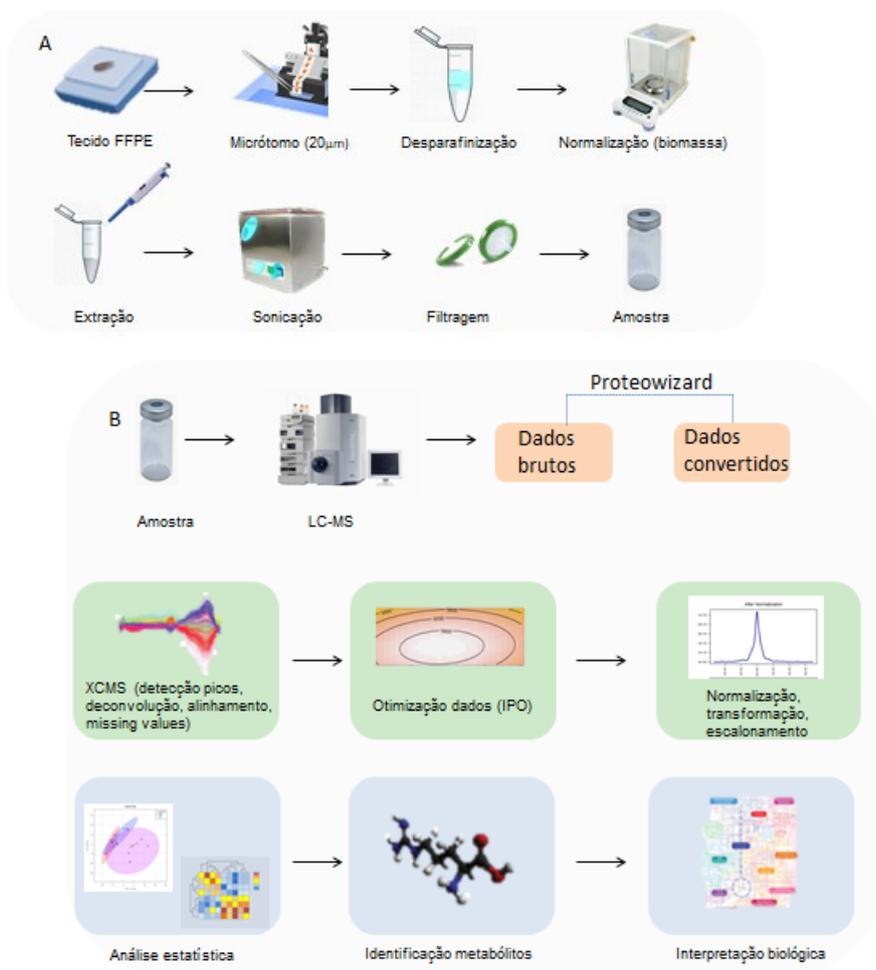
5.1 Aspectos éticos

O presente trabalho intitulado “Análise das vias metabólicas do ceratocisto odontogênico pré e pós marsupialização e comparação à mucosa oral” foi desenvolvido conforme as diretrizes da legislação brasileira que constam na resolução CNS n° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, no que diz respeito às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, de acordo com o Parecer CAAE - 33541820.3.0000.5149 (ANEXO A).

5.2 Fluxo de trabalho

Devido à complexidade do processo, foi necessário estabelecer um fluxo de trabalho (FIGURA 1A e B), constituído pelas seguintes fases: 1) Determinação do problema biológico a ser estudado; 2) Planejamento do experimento; 3) Preparo da amostra de acordo com a análise realizada; 4) Escolha de técnicas analíticas e randomização da amostra preparada; 5) Processamento e análise de dados; 6) Identificação dos metabólitos; 7) Interpretação biológica dos resultados (KLASSEN *et al.*, 2017).

Figura 1: A- Fases constituintes da etapa de preparo da amostra. (FFPE: fragmentos de tecido fixados em formalina e parafinizados); B- Workflow do estudo incluindo fases de utilização da plataforma analítica até interpretação biológica dos resultados. (LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; IPO: *Isotopologue Parameters Optimization*)



Fonte: A autora.

A determinação do problema biológico a ser estudado abrange a definição do objeto de estudo no qual serão baseadas as etapas seguintes. Após definido, a fase seguinte constitui-se na definição do desenho do estudo. Nesse momento, define-se o tipo de abordagem metabolômica realizada, se *targeted* ou *untargeted* (NAZ *et al.*, 2014; WISHART *et al.*, 2016). Na metabolômica do tipo *targeted*, a pesquisa será direcionada a metabólitos específicos de processos biológicos de interesse para a pesquisa. Já a análise do tipo *Untargeted* abrange todos os possíveis metabólitos que podem ser encontrados no sistema biológico avaliado. Essas amostras são categorizadas de acordo com sua origem ou relevância biológica (*fingerprinting*) e são determinados todos os produtos metabólicos resultantes do sistema avaliado quando submetido a condições controladas (*footprinting*) (KLASSEN *et al.*, 2017).

A fase seguinte consiste no planejamento do experimento. É nesse momento que são definidos o tamanho e origem da amostra a serem estudados, os grupos experimentais e controle, as condições de coleta e armazenamento da amostra e o tipo de plataforma analítica que será utilizada para processamento e interpretação dos dados obtidos. Uma vez definidos tais itens, o procedimento segue através do preparo da amostra. Nessa fase deve ser realizado um *quenching* metabólico sempre que houver a necessidade de interromper a atividade enzimática da amostra estudada, o que vai depender de sua origem. É nesse momento que se realizam os processos de limpeza, separação e extração de componentes de interesse da amostra. A fase de aquisição dos dados é determinada pela plataforma analítica escolhida na segunda fase do *workflow*. É estabelecido na literatura que a utilização de mais de uma plataforma analítica promove resultados experimentais complementares e mais abrangentes. As opções disponíveis são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa eletroforese capilar, espectroscopia por ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massa. No presente estudo optou-se pela escolha da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa devido a sua maior sensibilidade e especificidade para a obtenção de resultados. Neste caso o tratamento dos dados é realizado por softwares e envolve etapas de deconvolução de picos cromatográficos, criação de datasets, alinhamento, agrupamento, normalização e transformação de dados. No presente estudo o software de escolha para a realização desta etapa foi o XCMS (KLASSEN *et al.*, 2017).

Uma vez processados, os dados passam por uma análise estatística do tipo uni e multivariada para revelar os metabólitos de interesse encontrados entre os grupos de estudo e o grupo controle. A análise multivariada nos proporciona uma visão geral da amostra e permite classificá-la, enquanto a análise univariada é utilizada para confirmação dos dados obtidos pela análise multivariada (KLASSEN *et al.*, 2017).

A próxima etapa é a identificação dos metabólitos, a qual é indicada apenas nos casos de metabolômica *untargeted*, já que nos casos tipo *targeted*, os metabólitos estudados já são conhecidos previamente. Esta fase é realizada a partir de softwares e bibliotecas de dados. No caso do presente estudo, a

escolha foi pelo Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). Uma vez identificados, procede-se a última fase do workflow: a interpretação biológica dos resultados. Os metabólitos definidos são então relacionados à suas vias metabólicas correspondentes e os achados avaliados de acordo com a perspectiva do estudo (KLASSEN *et al.*, 2017).

5.3 Determinação do problema biológico a ser estudado

O problema biológico estudado foi o efeito da marsupialização do ceratocisto odontogênico sob o ponto de vista metabólico através da metabolômica do tipo *Untarget*. A escolha pelo tema se deu devido ao fato de que as alterações provocadas no revestimento do ceratocisto quando submetido à modalidade terapêutica de marsupialização já estão bem elucidadas sob o ponto de vista morfológico e molecular. Tais alterações, porém, ainda não foram avaliadas sob o ponto de vista metabólico. Para tanto, foi construída a seguinte pergunta: Após o contato com a mucosa oral, o perfil metabólico do epitélio do ceratocisto sofre também modificações, ficando mais próximo da mucosa ou ainda apresenta maior similaridade com a lesão inicial? As respostas a estes questionamentos podem contribuir de maneira significativa para o manejo clínico da lesão.

5.4 Planejamento do experimento

Foi realizado um levantamento dos casos de ceratocisto odontogênico tratados por meio de marsupialização pelas equipes de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial do Hospital das Clínicas da UFMG e do Hospital Municipal Odilon Behrens, inicialmente baseado em dados contidos nos prontuários dos pacientes. Uma vez levantados os casos, foram selecionadas as lâminas e blocos referentes a cada um deles e o material foi revisado para confirmação do diagnóstico.

Os critérios de inclusão adotados no presente estudo foram:

- a) Pacientes cujo prontuário estivesse preenchido de forma completa.
- b) Laudo anatomohistopatológico com diagnóstico de ceratocisto odontogênico antes e após a marsupialização.

c) Casos que possuam amostra da lesão antes da marsupialização, após esse procedimento (enucleação) e fragmento da mucosa do mesmo paciente.

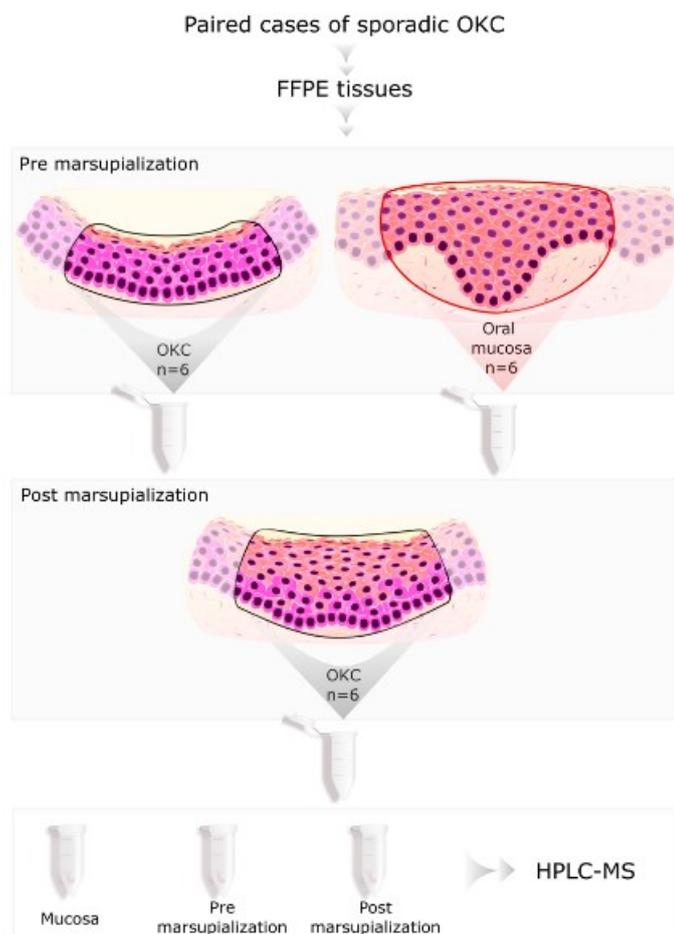
Os critérios de exclusão foram os seguintes:

a) Casos em que não seja possível a confirmação do diagnóstico ou não havia disponibilidade de amostra para análise.

b) Pacientes portadores da Síndrome do Carcinoma nevóide basocelular.

A etapa seguinte à definição da amostra do estudo consistiu na demarcação das áreas de interesse através de análise microscópica. As lâminas foram revisadas e as áreas de interesse, que continham material correspondente a ceratocisto pré e pós marsupializado e mucosa oral, foram identificadas e removidas separadamente por meio de microdissecção manual para separação do epitélio da cápsula e divididas em três grupos, conforme esquematizado na figura 2.

Figura 2 – Fluxo de trabalho correspondente à fase de preparo das amostras. Após a confirmação do diagnóstico histológico de CO e seleção das áreas representativas da amostra por observação microscópica, os respectivos blocos de parafina (n=18) foram divididos em três grupos: CO pré (n=6) e pós (n=6) marsupialização e mucosa orais (n=6) e preparadas para análise por LC-MS.



Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p.3

5.5 Preparo da amostra

Para a análise metabômica, 7 casos foram selecionados. Suas características clínicas encontram-se esquematizadas na tabela 1. As amostras pareadas foram identificadas em: mucosa (M1 a M7), pré marsupialização (PRE1 a PRE7) e pós marsupialização (POS1 a POS7) (FIGURA 3). O paciente 6 foi excluído do estudo após uma primeira instrumentação por se tratar de um outlier, o que foi confirmado pela curva cromatográfica (FIGURA 4), e por isso não foi representado nas fases subsequentes do estudo. A amostra de conveniência final foi então constituída por 6 casos.

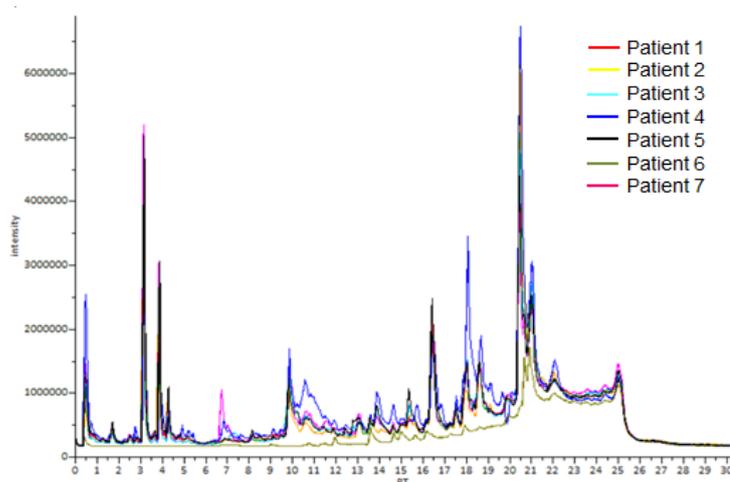
Tabela 1 Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo

Caso	Idade	Gênero	Localização	Intervalo marsupialização / enucleação (meses)	Redução tamanho lesão (mm)
#1	14	Feminino	Região retromandibular esquerda	14	9
#2	20	Masculino	Região retromandibular direita	ND	ND
#3	36	Feminino	Região retromandibular esquerda	10	28
#4	45	Feminino	Região retromandibular esquerda	8	8
#5	25	Masculino	Região retromandibular esquerda	6	7
#6	66	Feminino	Região retromandibular esquerda	11	34

ND: não disponível

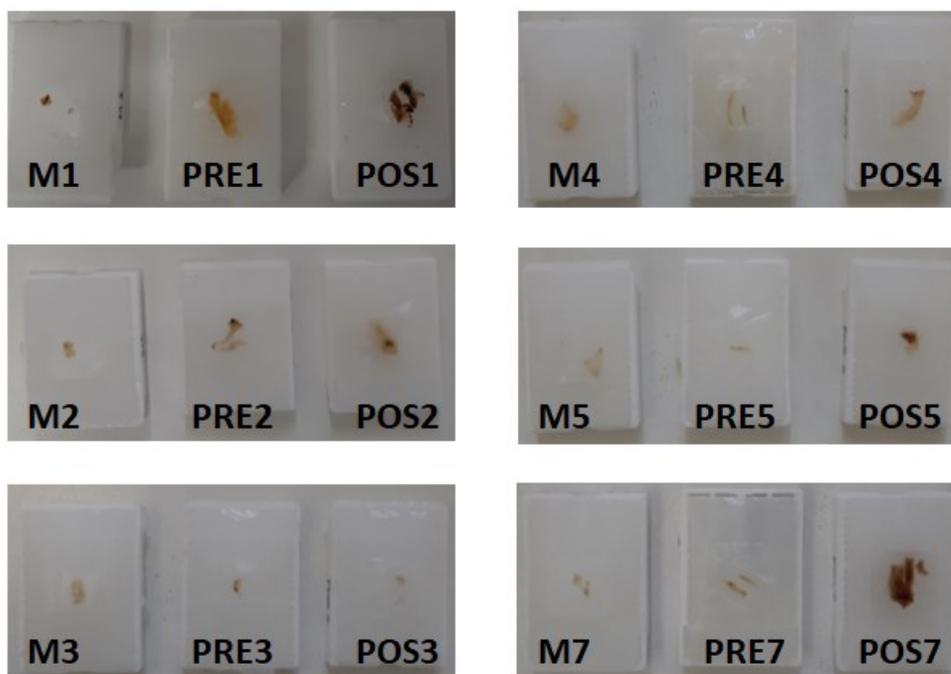
Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p.3

Figura 3 – Curva cromatográfica que evidencia o comportamento atípico da amostra do paciente 6 se comparada aos demais pacientes, o que nos permitiu classificá-lo como um outlier e excluí-lo das análises subsequentes.



Fonte: A autora.

Figura 4 – Blocos de parafina correspondentes às amostras selecionadas após a exclusão do paciente 6. (M= fragmento de mucosa; PRE= fragmento de ceratocisto pré marsupialização; POS= fragmento de ceratocisto pós marsupialização).



Fonte: A autora.

Os blocos foram então cortados em micrômetro, em cortes de espessura de 20 μ m. Os dois primeiros cortes de cada amostra foram desprezados para evitar que fossem utilizadas amostras com contaminantes de superfície.

Após cortadas, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL e mantidas em gelo por aproximadamente 10 minutos. Os tecidos foram desparafinizados por quatro lavagens com 1 mL de xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) seguida de centrifugação a 4°C, 15.000mg durante 10 minutos.

Depois de centrifugadas, as amostras passaram por processo de secagem em banho seco a 37°C, para a eliminação do xilol residual. A amostra seca foi então pesada e os pesos registrados.

Uma vez pesadas, foi adicionado às amostras o solvente de extração, à base de metanol, clorofórmio e água, na proporção de 3:1:1. A quantidade de solvente adicionada a cada amostra seguiu a proporção de 200 μ L de solvente para cada 10 mg de tecido. Em seguida as amostras foram vortexadas e incubadas em gelo por 10 minutos. O próximo processo foi o de sonicação das amostras em cuba ultrassônica por 10 minutos para homogeneizá-las. Após o término da sonicação, as amostras foram novamente centrifugadas a 4°C, 15000g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado com filtros de seringa de nylon em 0,22 μ m. De cada amostra, foram coletados 10 μ L do extrato

para o preparo de um controle de qualidade (QC) que foi utilizado durante a corrida Metabolômica. Esse controle de qualidade consiste na mistura de todas as amostras utilizadas durante o estudo. Tanto as amostras quanto os controles de qualidade foram acondicionados em adaptadores de volume (inserto), contidos no interior de *vials* de vidro. As amostras foram tampadas e acondicionadas a -80°C até a realização da cromatografia líquida. Por se tratar de tecido fixado em parafina não foi necessária a realização do *quenching* metabólico, processo através do qual a atividade enzimática é interrompida através da adição de solventes orgânicos ou congelamento das amostras (CANUTO *et al.*, 2018).

5.6 Escolha de técnicas analíticas e randomização da amostra preparada

Há uma extensa gama de plataformas analíticas disponíveis para realizar a identificação e quantificação das categorias de metabólitos encontradas nas amostras de interesse. Como todas as opções apresentam vantagens e desvantagens, cabe ao pesquisador analisar qual delas se enquadra de melhor forma aos objetivos de seu estudo. Além disso, há a possibilidade de acoplar mais de uma técnica analítica no sentido de melhorar a acurácia do processamento de dados. As opções disponíveis são: ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (CE-MS) (KLASSEN *et al.*, 2017).

A plataforma analítica de escolha para a realização do presente estudo foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. A escolha se deu devido a maior sensibilidade, especificidade, alta resolução e boa repetibilidade da técnica (KLASSEN *et al.*, 2017).

A cromatografia líquida consiste no processo através do qual moléculas de uma mistura são separadas. As moléculas são separadas através de sua distribuição em duas fases inertes entre si e denominadas fases móvel e estacionária.

A fase móvel é constituída por uma mistura de solventes, denominada de eluente, que promove a dissolução da amostra. A eluição foi realizada com

gradiente, ou seja, foram injetados dois sistemas de solventes com polaridades distintas: um polar, representado pela água e outro apolar, representado pela acetonitrila. Já a fase estacionária é representada por uma coluna constituída por compostos sólidos ou líquidos e suportes de sílica ou carvão ativado (C18). Em casos em que a coluna é representada por um componente apolar (C18), a fase móvel deve ser menos polar que a fase estacionária, e por esse motivo é denominada de cromatografia de fase reversa (RPLC). A separação dos compostos é então dependente da interação que ocorre entre o componente, a fase móvel e a fase estacionária (KLASSEN *et al.*, 2017).

No presente estudo, foram injetados 10µL de cada amostra, incluindo os QC's, de forma randomizada e a cromatografia líquida foi realizada em uma coluna de C18 (Supelco Discovery HS, Titan C18, 2,1mm id x 5 cm, 0,5µm) mantida a 40°C. A fase móvel (fase A) foi constituída por água deionizada e acetonitrila (fase B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico para o modo positivo e sem acidificação para o negativo. A programação da corrida cromatográfica consistiu em 20 minutos para separação dos compostos em um gradiente de 20 a 95% de fase móvel B, seguido de 95% fase móvel B por 3 minutos (remoção de compostos mais retidos), 95 a 20% fase móvel B por 2 minutos (retorno às condições iniciais) e 20% fase móvel B por 5 min (condicionamento da coluna à condição inicial).

Para a análise e aquisição de dados, a cromatografia líquida é acoplada à espectrometria de massas. Ela consiste em uma técnica analítica que determina a massa molecular de compostos na fase gasosa. O analisador de massa utilizado foi do tipo QTOF (*quadrupole time of flight*) (Bruker, Massachusetts- USA) devido a sua capacidade de detectar dados com alta precisão em uma faixa de massas mais ampla. Seu princípio de ação, como o próprio nome diz, é baseado no tempo de voo dos íons, ou seja, o tempo gasto para que estes percorram a coluna (KLASSEN *et al.*, 2017). Para que isso ocorra, os compostos são submetidos à ionização. O sistema de ionização utilizado foi do tipo eletropulverização (ESI) por ser um método que gera íons com fragmentação reduzida ou até mesmo ausente e também por possibilitar a ionização de amostras com grande variação de polaridade, o que é muito valioso para estudos envolvendo metabolômica do tipo *untargeted*, uma vez que não há conhecimento prévio sobre os metabólitos que serão estudados. O sistema

possui um analisador de massa que separa e identifica estes íons de acordo com sua razão massa/carga. A análise foi executada nos modos positivo e negativo de ionização, com uma faixa de detecção de 90 a 1200 Da. A voltagem capilar foi ajustada em 4500 V para o modo positivo (ESI+) e 3500 V para o negativo (ESI-). Cada íon, por sua vez, emite um sinal constituinte de um espectro, que será reconhecido por um detector, contido em um sistema de software. Os dados obtidos são então submetidos à análise metabolômica para determinação do perfil metabólico das amostras.

6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

6.1 Processamento dos dados

Em metabolômica, o processamento dos dados consiste nas etapas realizadas que abrangem desde os dados brutos obtidos após a utilização da plataforma analítica até a obtenção de dados “limpos” para que sejam processados estatisticamente (GOODACRE *et al.*, 2007). Essa fase se faz necessária porque a análise das amostras através da plataforma analítica (LC-MS) resulta em dados brutos organizados em uma matriz 3D que contém as variáveis relação massa carga (m/z), intensidade e tempo de retenção (rt) cuja análise é complexa (GOODACRE *et al.*, 2007).

Os dados brutos referentes a cada amostra do estudo são então convertidos e processados para que possam ser traduzidos em forma de tabelas, as quais, por sua vez, serão submetidas à análise estatística em um momento posterior (KARAMAN *et al.*, 2017). No presente estudo, a conversão dos dados brutos para o formato mzXML foi realizada no software Proteowizard. Uma vez convertidos, os dados foram processados no XCMS, um pacote de códigos abertos que se encontra implementado no software R.

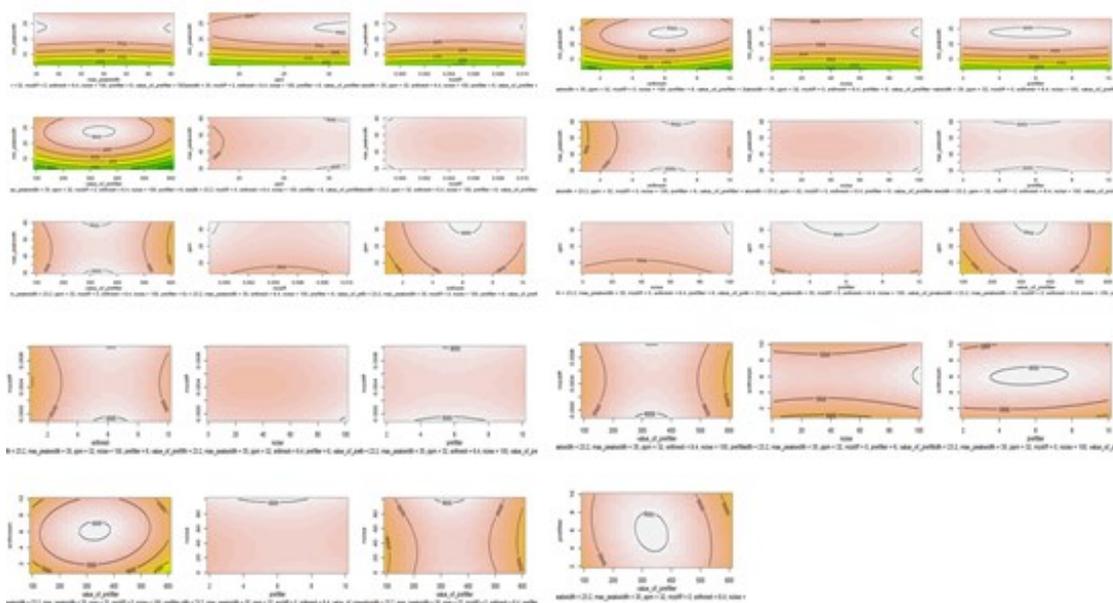
A fase de processamento dos dados é constituída pelas seguintes etapas:

- a) Peak picking: essa etapa tem como objetivo detectar cada íon (sinal) presente nos picos cromatográficos da amostra e relacioná-los a valores de relação massa/carga (m/z) e tempo de retenção, o que pode ser chamado de feature.

- b) Alinhamento: agrupa os picos cromatográficos que representam o mesmo tempo de retenção em cada amostra atribuídos na fase de peak picking.
- c) Remoção de valores perdidos: os valores perdidos ou gaps nas tabelas podem ocorrer devido à presença de picos cromatográficos mal definidos ou com baixos valores de intensidade que são perdidos na fase de peak picking.

Ao final dessa fase, serão obtidas representações gráficas que correspondem a modelos de superfície de resposta com seus respectivos parâmetros (FIGURA 5 e APÊNDICE A).

Figura 5 – Exemplos de modelos de superfície de resposta gerados pelo XCMS após a fase de processamento de dados.



Fonte: A autora.

A partir desse momento, é possível detectar visualmente quais as faixas de valores que melhor se comportam em cada parâmetro analisado, tanto no modo positivo quanto no modo negativo (TABELA 2) e otimizados pelo software IPO (Isotopologue Parameters Optimization) (APÊNDICES B, C e D). Exemplos de parâmetros passíveis de serem otimizados e seus respectivos significados são apresentados a seguir (TABELA 3).

Tabela 2 – Definição das faixas de melhores parâmetros para otimização posterior nos modos positivo e negativo.

Parâmetros	Modo positivo	Modo negativo
Minpeakwidth	24-30	14-22
Maxpeakwidth	35-45	60-110
ppm	30-40	30-50
Mzdiff	-0.0065	0.00747
Sntresh	4-8	0-15
Noise	140-160	0-150
prefilter	3-9	4-9
GapInt	0.4-0.7	0.1-0.9
GapExtend	2.4-2.8	2.1-2.7
profStep	0.7-1	0.5-1
bw	0.1-3	0-20
minfrac	0.7-0.9	0.6-1
mzwid	0.030-0.050	0.020-0.050
valueofprefilter	200-400	400-800

Fonte: A autora.

Tabela 3- Exemplos de parâmetros passíveis de serem otimizados pelo IPO e seus respectivos significados.

Parâmetro	Definição
Ppm	Desvio máximo tolerado na relação m/z em medidas consecutivas de ppm.
peakwidth (max/min)	Largura do pico cromatográfico que é obtido dentro de uma faixa medido em segundos
Mzdiff	Diferença mínima da relação m/z entre os picos quando os tempos de retenção são sobrepostos
profStep	Tamanho da etapa (m/z) para gerar perfis a partir dos dados brutos
gapInt	Penalidade por abertura de lacunas
gapExtend	Penalidade por ampliação de lacunas
Bw	Largura da banda da suavização gaussiana a ser aplicada ao pico cromatográfico

Mzwid	Largura dos fragmentos m/z sobrepostos usada para criar cromatogramas de pico de intensidades e agrupar picos entre as amostras
minfrac	Fração mínima de amostras necessária em pelo menos um grupo de amostras para que ele seja válido

Fonte: a Autora.

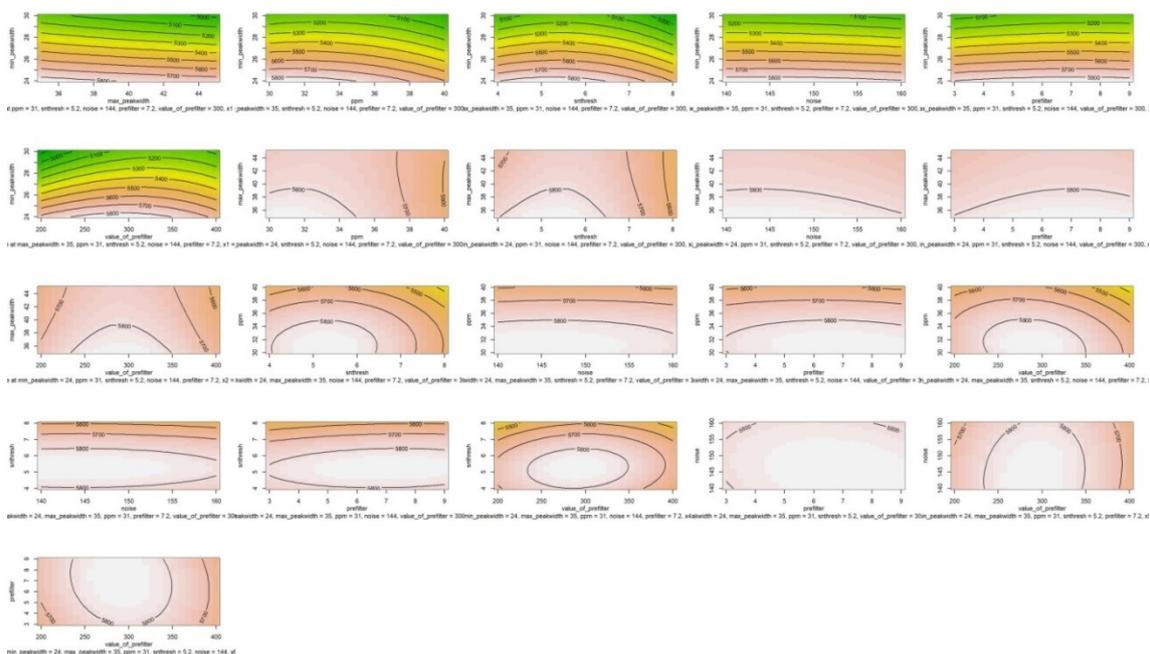
O IPO utiliza isótopos do carbono 13 (C13) para calcular valores de peak picking, segundo o qual picos que possam representar um determinado sinal são selecionados. O tempo de retenção é otimizado reduzindo as diferenças relativas dos tempos de retenção dos features constituintes da amostra de estudo. Já o agrupamento de dados é realizado baseando-se no número de features que mostram o mesmo pico durante a realização da corrida cromatográfica (ALBÓNIGA *et al.*, 2020). Essa sequência gera os parâmetros de curvas cromatográficas consideradas como melhores (TABELA 4) e uma nova interface com modelos de superfície de resposta a esses parâmetros. Esses modelos são representados por cores verde, amarelo e laranja. Quanto menos corados por verde, mais otimizados estarão os parâmetros (FIGURA 6). Esses dados são então organizados em uma tabela que será usada nas fases subsequentes de normalização, transformação e escalonamento dos dados.

Tabela 4 – Definição dos melhores parâmetros após a otimização no IPO nos modos positivo e negativo.

Parâmetros	Modo positivo	Modo negativo
Minpeakwidth	24.6	15.6
Maxpeakwidth	36	69.8
ppm	36	44.8
Mzdiff	-0.0065	0.00747
Sntresh	5.6	7
Noise	134	300
prefilter	7	5.5
valueofprefilter	284	1000
GapInt	0.7	0.792
GapExtend	2.8	2.7
profStep	0.7	0.8
bw	0.97	4
minfrac	0.84	1
mzwid	0.05	0.068

Fonte: A autora.

Figura 6- Modelos de superfície resposta após otimização dos parâmetros pelo IPO.



Fonte: A autora.

Após a otimização, os dados foram novamente processados no XCMS através do método de centWave para a detecção dos picos, alinhamento e

preenchimento dos valores perdidos conforme discorrido anteriormente (DOMINGO-ALMENARA *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2006).

As tabelas resultantes do processamento de dados foram então submetidas à aplicação dos filtros manuais seguintes, realizada no software Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>):

- a) Valores perdidos: Features que apresentassem mais de 20% de valores perdidos (representados na tabela pelo número zero) foram excluídos e os demais valores perdidos foram substituídos pela metade do mínimo valor de intensidade de cada feature (DOMINGO- ALMENARA *et al.*, 2020);
- b) Tempo de retenção (rt): Features que apresentassem tempos de retenção menor que 2,5 minutos ou maior que 20 minutos foram excluídos da amostra;
- c) Desvio padrão relativo (RSD): Para isso são utilizados os controles de qualidade, ou QC's, que consistem na mistura de todas as amostras do estudo. Eles fazem parte da corrida cromatográfica e são injetados no cromatógrafo a cada injeção de cinco a dez amostras. Features que apresentassem desvio padrão relativo maior que 25% nas amostras dos controles de qualidade também foram removidos;

Essa sequência gera um novo design do estudo organizado em uma tabela que será usada nas fases subsequentes de normalização, transformação e escalonamento dos dados.

6.2 Normalização, transformação e escalonamento dos dados

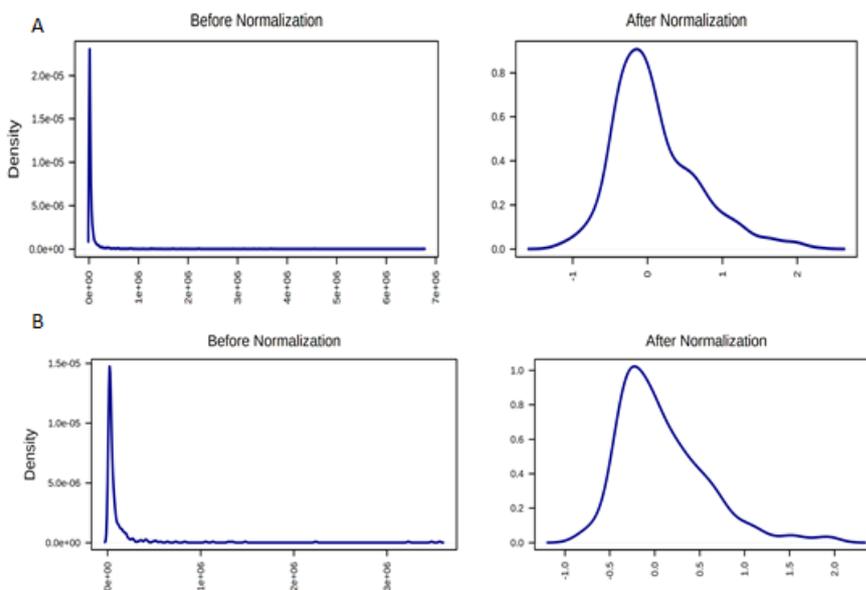
As etapas de normalização, transformação e escalonamento dos dados foram realizadas no Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), a partir da tabela gerada após a otimização no IPO.

A normalização se faz necessária porque metabólitos mais abundantes exibem maiores valores de intensidade na tabela de dados e, conseqüentemente, serão responsáveis por maiores diferenças encontradas entre as amostras, enquanto o oposto ocorre com aqueles menos abundantes (KLASSEN *et al.*, 2017). Dessa forma, a normalização corrige esse viés sistemático e permite assegurar que apenas diferenças biológicas relevantes

estejam presentes nas amostras (XIA *et al.*, 2011). Ela é realizada porque pode haver diferenças nas respostas das amostras analisadas em decorrência de fatores inerentes ao operador, como por exemplo, diferenças de volume injetado de cada amostra e a fatores inerentes ao instrumento, como alterações de capacidade de detecção, o que torna as amostras do estudo mais comparáveis entre si (LILAND *et al.*, 2011).

Ela pode ser realizada através de parâmetros previamente definidos pelo software ou de acordo com a preferência do pesquisador. Neste último caso pode-se recorrer a várias ferramentas como a aplicação de soma, média, mediana, dentre outras. (KOHL *et al.*, 2012). A opção de escolha utilizada foi a normalização por mediana porque estudos mostraram que a aplicação de média ou soma pode induzir ao estabelecimento de correlações falsas principalmente quando se trata de amostras maiores (DIETERLE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2016). A representação gráfica da normalização os dados em modo positivo e negativo, respectivamente, encontra-se ilustrada na figura 7.

Figura 7- Representação gráfica do comportamento dos dados após normalização no modo positivo (A) e negativo (B).



Fonte: a Autora.

A transformação dos dados é realizada nos casos em que os features apresentam concentrações muito variáveis e possibilita que a análise estatística

não seja focada nos features mais abundantes (LILAND *et al.*, 2011). Além disso, possibilita a correção de possíveis distorções e heterocedasticidade das amostras, reduzindo assim a sua dimensão e facilitando a realização de comparações entre elas. Vários métodos de transformação têm sido descritos na literatura, dentre eles a aplicação de logaritmo (natural ou generalizada) e de raiz cúbica (DI GUIDA *et al.*, 2016). A escolha pela aplicação do log generalizado se deu por se tratar de uma transformação de base 2 que reduz a dimensão dos dados e conseqüentemente facilita sua análise estatística e interpretação.

O escalonamento permite ajustar diferenças entre metabólitos relacionadas às razões das intensidades (*fold change*) das amostras, o que redimensiona os dados e apresenta efeito direto na interpretação dos modelos estatísticos a serem obtidos no passo seguinte. Alguns métodos para escalonamento disponíveis são: auto escalonamento (centralização pela média, seguida pela divisão de cada coluna de dados pelo desvio padrão dessa coluna), Pareto (centralização pela média seguida de divisão dos valores de cada coluna pela raiz quadrada do desvio padrão de cada coluna), escalonamento centrado na média (cada coluna da tabela é expressa em função de desvios de sua média), escalonamento por variação (centralização pela média seguida de divisão dos valores de cada coluna pela variação das intensidades de cada item da coluna) e vast (aplicação de estabilidade variável) (GOODACRE *et al.*, 2007). Essas modalidades de escalonamento são consideradas como métodos de classe II, uma vez que dividem cada variável por um fator de escalonamento que é diferente para cada variável. A técnica de escalonamento padrão é a de auto escalonamento, porém em muitas vezes ela é feita sem saber ao certo o efeito que provoca nas amostras do estudo e pode não ser a melhor escolha para todos os casos. A escolha pela técnica de escalonamento a ser utilizada varia de acordo com o contexto do estudo em questão, e não existe uma técnica que seja superior às demais do ponto de vista de efetividade (CHONG *et al.*, 2019; GROMSKI *et al.*, 2015). Alguns autores encorajam a realização de testes das opções de transformação e normalização disponíveis e conseqüente avaliação da curva Gaussiana resultante da aplicação desses métodos (CHONG *et al.*, 2019).

Além disso, é preciso ressaltar que o escalonamento das variáveis nem sempre é necessário. Na análise univariada, por exemplo, os dados são

avaliados individualmente e por isso não é necessário aplicar o escalonamento. Quando se trata de análise estatística multivariada, um grande número de variáveis é analisado simultaneamente, e um feature com maior variância pode influenciar mais o resultado da análise do que um feature que apresenta menor variância e por isso as técnicas de escalonamento devem ser aplicadas.

Para a análise estatística multivariada, os dados do presente estudo foram tratados através de normalização pela mediana, transformação por log e escalonamento por Pareto. Já para a análise univariada, os dados foram tratados através de normalização pela mediana e transformação por log, sem a aplicação de nenhum método de escalonamento.

6.3 Análise estatística multivariada

A análise estatística multivariada possibilita uma visão geral de todas as variáveis do estudo e foi realizada no software Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA *et al.*, 2011). A primeira análise realizada foi o PCA (análise de componente principal). Trata-se de um método não supervisionado em que o software não utiliza a informação sobre qual indivíduo pertence a cada grupo para construir o modelo. Essa análise reduz a dimensionalidade das amostras, permite a detecção de outliers, a avaliação de tendências de agrupamento e da qualidade dos dados estudados. Ela converte a infinidade de variáveis analisadas nas amostras em vetores a partir de seus componentes principais. A primeira componente principal criada pelo método é direcionada à máxima variância dos dados, minimiza os resíduos e representa a combinação linear de todos os metabólitos encontrados na amostra. A segunda componente principal é ortogonal a primeira e é direcionada de acordo com a segunda maior variância da amostra. O primeiro componente principal contém as informações mais importantes (com maior variância) e esta decresce subsequentemente nos demais componentes principais demonstrados. Os grupos foram categorizados em cores distintas (mucosa – vermelho; pré marsupialização – roxo; pós marsupialização – azul; QC's – verde) para facilitar a interpretação dos achados.

A segunda análise estatística multivariada aplicada aos dados do estudo foi o PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais), método

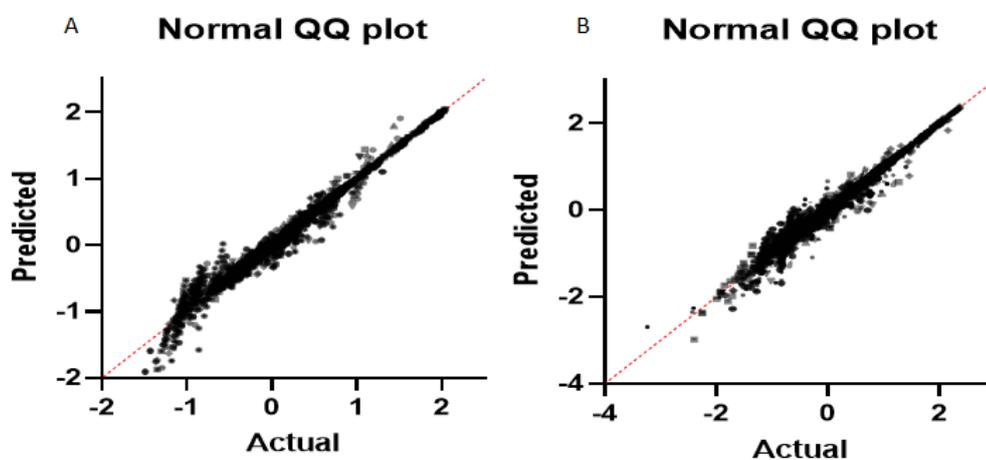
supervisionado em que o software utiliza a informação sobre a que grupo pertence cada amostra para realizar permutações e validações cruzadas entre elas que possibilitam a criação de modelos aleatórios comparados às respostas reais.

6.4 Análise estatística univariada

Para otimizar o processo de obtenção de informações relevantes em metabólômica, recomenda-se a associação da estatística multivariada à análise univariada. Diferentemente da análise multivariada, a análise estatística univariada permite a avaliação de uma variável por vez (VINAIXA *et al.*, 2012). A amostra do estudo foi caracterizada da seguinte forma: amostra de conveniência dividida em três grupos (mucosa, ceratocisto pré e pós marsupialização), duas variáveis analisadas (paciente e tratamento) e um desfecho (efeito do tratamento sob o perfil metabólico da lesão).

Previamente à aplicação do teste estatístico univariado, foi realizado o teste de normalidade da amostra do estudo. A normalidade dos dados foi avaliada através do software GraphPad Prism 8. O teste de escolha foi o Shapiro-Wilk por se tratar de uma amostra com menos de 50 ($n=18$) unidades amostrais (VINAIXA *et al.*, 2012). Os gráficos de QQ plot demonstram a distribuição normal dos dados nos modos positivo e negativo (FIGURA 8 A e B).

Figura 8 – Avaliação de normalidade dos dados (Teste de Shapiro-Wilk) nos modos positivo (A) e negativo (B).



Fonte: A autora.

Uma vez comprovada a normalidade da distribuição dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, o passo seguinte consistiu na aplicação do teste estatístico de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). Esse teste permite detectar se há ou não diferença estatística entre os grupos, porém não nos revela informações sobre quais grupos diferem entre si. Além disso, em análise metabolômica do tipo untargeted o número de features detectados pode chegar a milhares e esse número equivale à quantidade de testes estatísticos univariados realizados (VINAIXA *et al.*, 2012). Dessa forma, quanto mais features detectados, mais testes estatísticos são realizados entre eles e, conseqüentemente, maiores as chances de encontrarmos resultados falso positivos, o que pode nos levar a rejeitar a hipótese nula H_0 de que não há diferença estatisticamente significativa entre os dados avaliados (erro tipo I). Por esse motivo é aconselhável a correção dos valores de p através dos chamados testes de post-hoc. No presente estudo, o teste de correção aplicado foi o teste de Tukey. Ambos os testes (two-way ANOVA e teste de post-hoc) foram realizados através do software GraphPad Prism 8 e p-valores < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

7 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS

A fase de identificação dos metabólitos e determinação de vias biológicas correspondentes em metabolômica do tipo untargeted é um grande desafio porque geralmente trabalha-se com milhares de features. Seu maior obstáculo consiste em realizar uma identificação não equivocada e conseqüentemente desenvolver comparações consistentes entre os achados. A espectrometria de massa dá origem a sinais detectados que são traduzidos em picos, conforme discutido anteriormente. O fator dificultador durante a identificação está no fato de que vários metabólitos podem corresponder a um mesmo pico, e quando se trata de efeitos de um determinado tratamento isso pode ser problemático (STEUER *et al.*, 2020).

Além disso, observa-se um crescimento vertiginoso das bases de dados para identificação de metabólitos, porém não há uma convergência total entre os componentes constituintes de cada uma delas (GIL-DE-LA-FUENTE *et al.*, 2019), o que nos forçou a recorrer a mais de uma plataforma de identificação dos dados originados pela LC-MS. No sentido de tentar compreender o contexto de vias metabólicas alteradas no CO quando submetido à marsupialização e compará-las àquelas correspondentes à mucosa oral adjacente, recorreremos no presente estudo à identificação putativa e à identificação através do uso de algoritmos preditivos.

A identificação putativa dos metabólitos segue o workflow original da metabolômica. Ela foi realizada por busca de relações m/z significativas em bancos de dados públicos usando a ferramenta CEU Mass Mediator 3.0 (GIL-DE-LA-FUENTE *et al.*, 2019). Ele permite que o pesquisador realize a busca em diferentes bancos de dados como o HMDB (Human Metabolome Database), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), LipidMaps Metlin, dentre outros. Os adutos utilizados para a busca foram $[M+H^+]$ e $[M+Na^+]$ para o modo positivo e $[M-H^-]$ e $[M+FA-H^-]$ para o modo negativo. O erro de massa adotado foi de 3ppm.

Uma vez que a falta de precisão de identificação resultou em um pequeno número de metabólitos, optamos pela realização da análise de enriquecimento de vias através do uso de algoritmos preditivos como o mummichog, o GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) e a análise combinada de ambos os algoritmos (STEUER *et al.*, 2020) realizada no software Metaboanalyst 4.0, no módulo denominado Peaks to Pathways (versão 1).

O mummichog, nome de um peixe que vive em grupos e também um termo de origem indígena que significa “em grupos” (LI *et al.*, 2013), realiza uma análise de sobre representação (testar se grupos de metabólitos são representados com mais frequência do que esperado em uma lista de metabólitos) para avaliar o enriquecimento de vias baseado nos features significativos. Ele nos informa sobre a presença de vias alteradas ou não sob o ponto de vista estatístico a partir de uma lista de picos representados por suas respectivas relações massa/carga e inclui todas as correspondências possíveis, inclusive os isótopos e adutos. Para isso ele utiliza um valor p de corte, que nesse caso foi igual a 0,05. Ele testa se determinada via biológica é enriquecida

ou não por esses picos significativos através da realização de permutações entre os features da amostra e essas combinações são mapeadas de acordo com vias biológicas do organismo (LIU *et al.*, 2020; STEUER *et al.*, 2020).

O GSEA consiste em uma análise de enriquecimento de vias que se baseia em uma lista de genes e em seu significado biológico. Ele é considerado superior ao mummichog porque não realiza nenhum tipo de corte de significância de valores de p , o que possibilita uma análise mais abrangente de dados (CHONG *et al.*, 2019; STEUER *et al.*, 2020). Ele avalia as diferenças gerais entre duas distribuições através de testes de Kolmogorov-Smirnov. Sua análise é baseada no t score, um número adimensional que analisa a variabilidade da intensidade de um feature constituinte de uma amostra. Quanto maior seu valor, maior é a chance de aquele metabólito em questão ser relevante para o objeto do estudo.

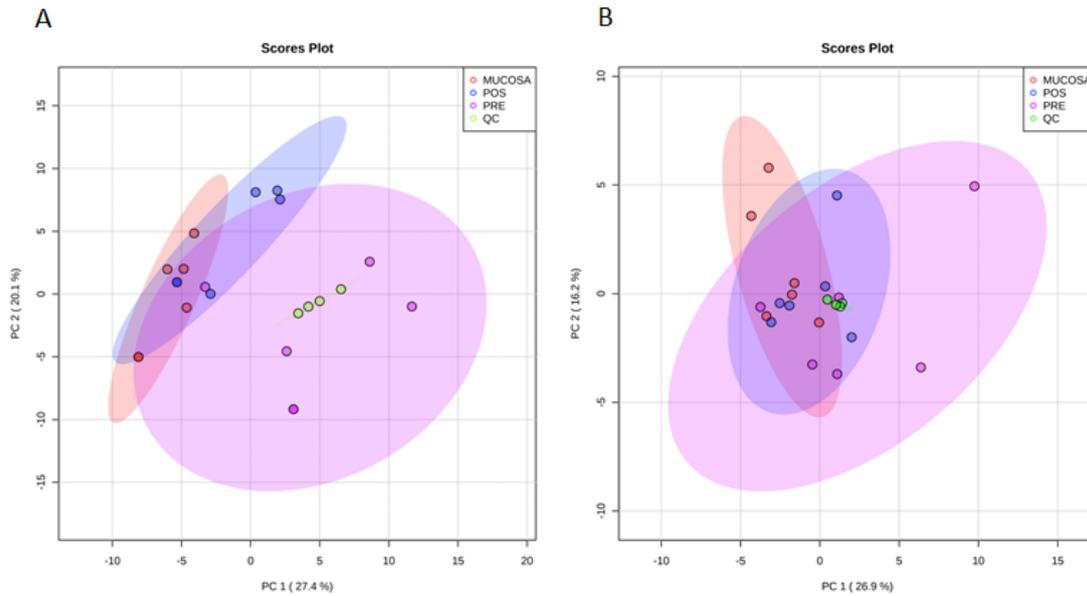
No presente estudo, foi construída uma tabela de quatro colunas que continha os features significativos obtidos a partir das análises estatísticas descritas anteriormente. Trata-se de uma lista de picos com seus respectivos dados de forma de ionização (positiva ou negativa), relação massa/carga, valores de p resultantes dos métodos estatísticos empregados anteriormente e t .score. Foi adotada uma tolerância de peso molecular de 10 ppm e a análise foi do tipo mista, ou seja, as tabelas organizadas em duplas (mucosa e pré marsupialização; mucosa e pós marsupialização; pré e pós marsupialização) já continham os valores resultantes da análise estatística tanto no modo de ionização positivo quanto no negativo. A análise foi baseada na biblioteca de dados MFN (*Homo sapiens*), uma escala genômica humana original do algoritmo mummichog e que é originada de uma série de bibliotecas, dentre elas a KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), a BiGG (*Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large-scale metabolic reconstruction*) e a Edinburgh Model (PANG *et al.*, 2020).

8 RESULTADOS

A análise metabolômica identificou 1038 features nos modos de ionização positivo e negativo, após o processamento dos dados. Após processados, os dados foram submetidos à análise estatística multivariada e univariada. A análise estatística multivariada foi realizada no software Metaboanalyst 4.0, e os testes realizados foram o PCA e PLS-DA. Já a estatística univariada foi realizada no software GraphPad Prism 8, e os testes de escolha foram o 2-way ANOVA e o post-hoc de Tukey.

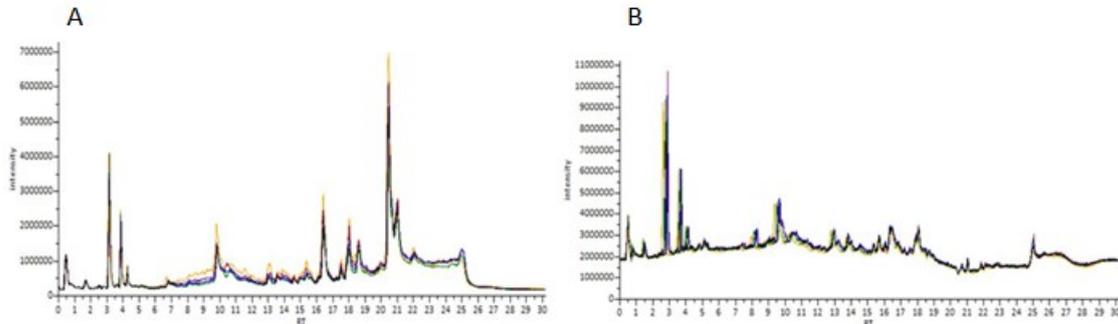
Através do PCA, foi observada uma tendência de agrupamento entre as amostras de mucosa e de fragmentos de ceratocisto pós marsupialização, bem como um distanciamento entre os fragmentos de mucosa e de ceratocisto pré marsupialização, o que vai ao encontro da hipótese do estudo (FIGURA 9). Além disso, é possível observar uma menor tendência de agrupamento dos controles de qualidade das amostras no modo positivo, se comparadas ao modo negativo (FIGURA 9 A e B, respectivamente). Essa discreta separação observada não permite assegurar, portanto, a estabilidade analítica do instrumento utilizado (LC-MS). Dessa forma, recorreu-se à visualização do comportamento gráfico das curvas cromatográficas das amostras dos QC's em ambos os modos de ionização (positivo e negativo). É possível detectar uma nítida sobreposição dessas curvas, o que assegura a estabilidade instrumental durante a aquisição dos dados e garante a qualidade das análises realizadas (FIGURA 10).

Figura 9 – Gráfico de escores obtido através da análise de componente principal (PCA) das amostras nos modos positivo (A) e negativo (B). Mucosa (círculos vermelhos), CO pré marsupialização (círculos roxos), CO pós marsupialização (círculos azuis), QC's (círculos verdes).



Fonte: A autora.

Figura 10 – Curvas cromatográficas das amostras correspondentes aos controles de qualidade (QC'S) nos modos positivo (A) e negativo (B). A sobreposição dessas curvas assegura a qualidade das análises realizadas.



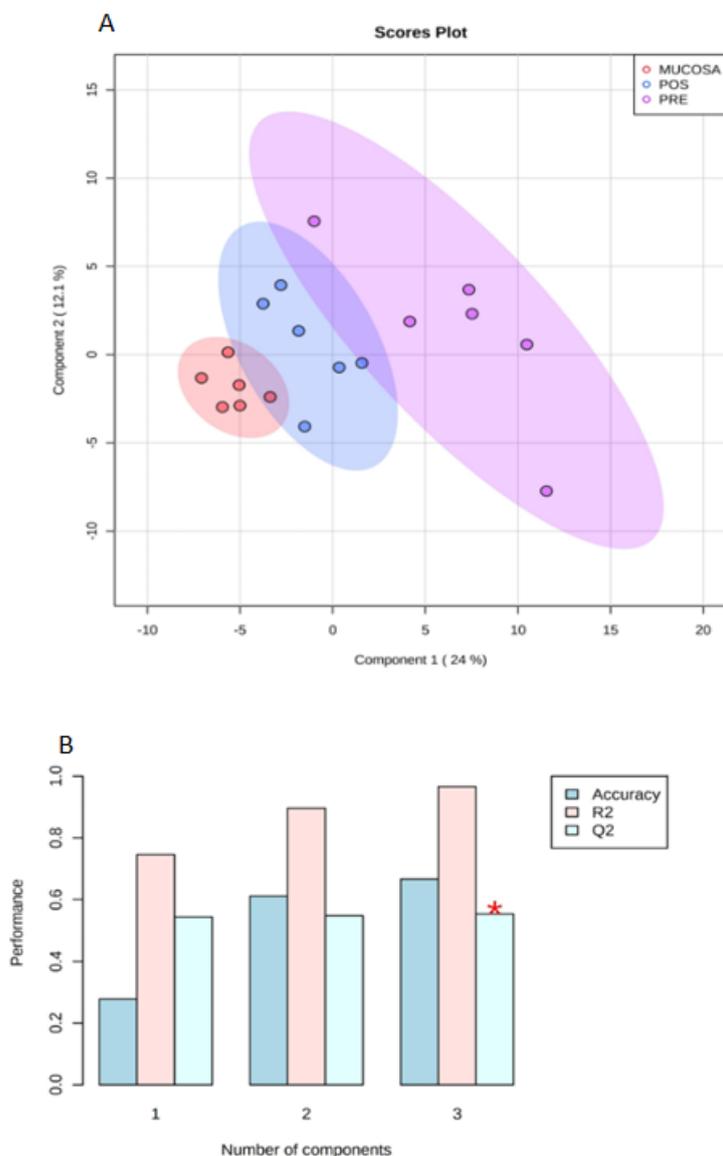
Fonte: A autora.

Assim como no PCA, foi possível observar no PLS-DA uma tendência de proximidade entre as amostras de mucosa e ceratocisto pós marsupialização, demonstradas pelas cores vermelha e azul, respectivamente (FIGURA 11A). Tal tendência corrobora mais uma vez nossa hipótese de que, quando submetido à marsupialização, os fragmentos de ceratocisto odontogênico tornam-se semelhantes à mucosa oral também sob o ponto de vista metabólico.

Quanto à validação cruzada do PLS-DA, uma informação importante e que está diretamente relacionada à previsibilidade do modelo estatístico é o valor

de q quadrado. Tem-se que valores positivos e mais próximos a 1 demonstram um modelo com maior previsibilidade. Em nossos achados, foram observados valores de q quadrado positivos quando avaliados os três grupos nos modos positivo e negativo (FIGURA 11B), o que confirma a acurácia do estudo.

Figura 11 – (A) Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) nos modos positivo e negativo. (B) Validação cruzada realizada pelo método de PLS-DA em ambos os modos de ionização. Parâmetros do modelo: $R^2= 0.966$; $Q^2= 0.553$.

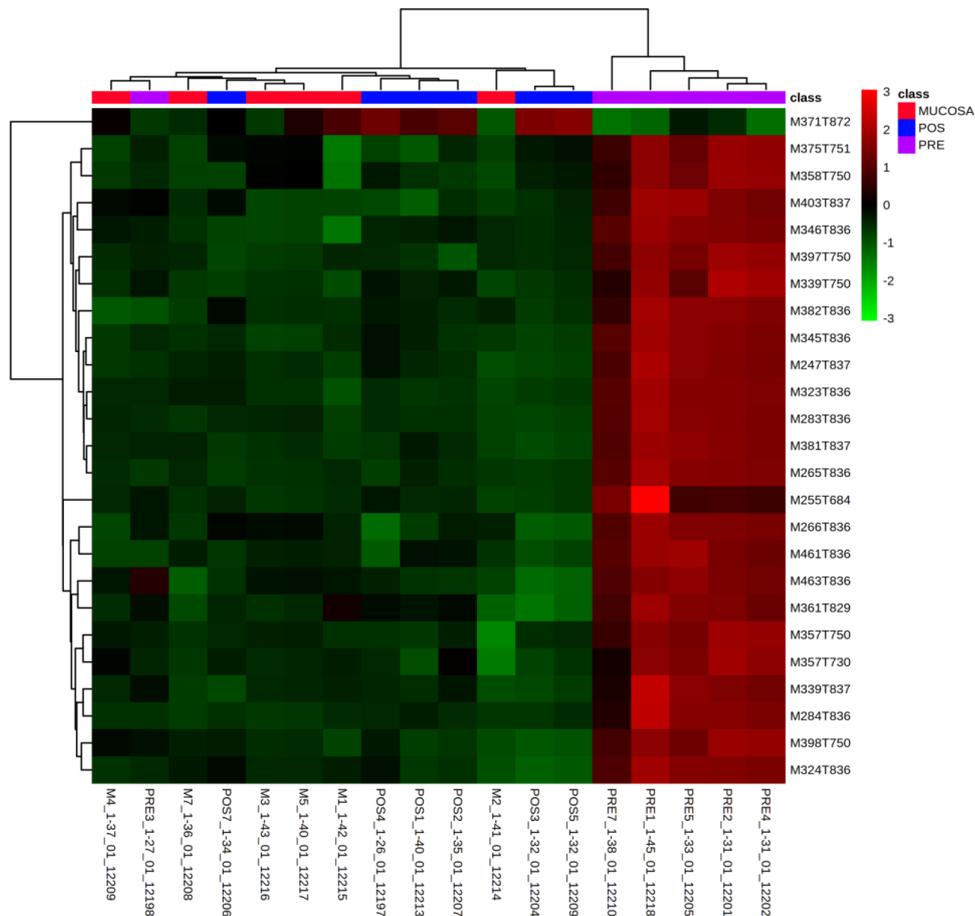


Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p. 5

A partir da análise estatística, foi possível a construção de um Heatmap ou mapa de calor, que gerou a informação acerca dos melhores 25 features estatisticamente significativos expressos na análise, quanto às suas tendências

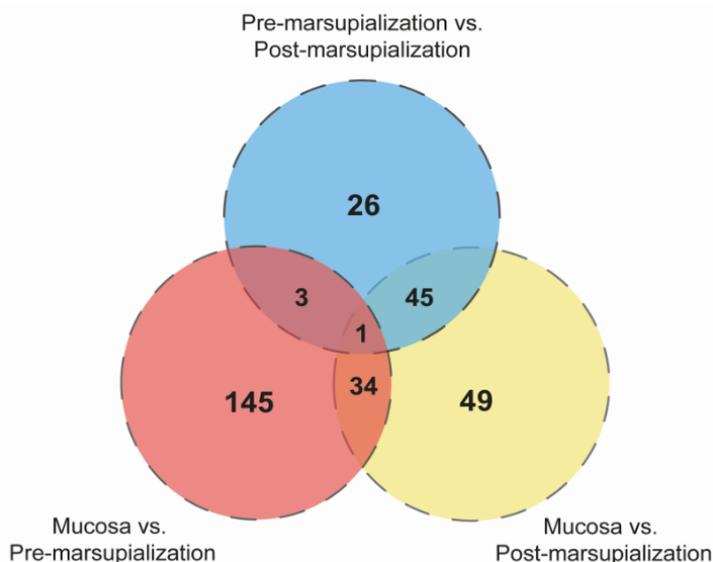
de agrupamento e intensidades. A tendência de agrupamento das amostras é demonstrada a partir dos dendogramas apresentados na parte superior e lateral esquerda do mapa, os quais corroboram a tendência de agrupamento entre os fragmentos de CO pré marsupialização bem como a aproximação entre os fragmentos de mucosa e CO pós marsupialização, exceto pela amostra “PRE3”. Tal exceção pode ser explicada por contaminação eventual dessa amostra com metabólitos de mucosa oral. As inferências sobre as intensidades dos features constituintes da amostra, por sua vez, são demonstradas por valores e cores que variam de -3 (verde claro – menor intensidade) a 3 (vermelho escuro - maior intensidade). Interessantemente, a intensidade desses 25 features alterados se mostraram maiores no CO pré marsupialização se comparados aos dois outros grupos, o que permite ilustrar a maior diferenciação entre esses e os fragmentos de mucosa (FIGURA 12).

Figura 12 – Mapa de calor (Heatmap) expresso a partir dos 25 melhores features expressos de maneira estatisticamente significativa, baseado na análise metabômica realizada.



Anteriormente à anotação dos metabólitos e à análise de enriquecimento de vias, a análise estatística univariada foi aplicada (2-way ANOVA e o post-hoc de Tukey) para identificar quais os features mostravam-se alterados em cada comparação estudada. Conforme observado na figura 13, o número de features exclusivos de cada comparação pareada (Mucosa x CO Pré marsupialização; Mucosa x CO Pós marsupialização; CO Pré x Pós marsupialização) foi de 145, 49 e 26, respectivamente. Tal achado nos permite concluir que a comparação entre os fragmentos de mucosa e os de CO pré marsupialização foi a que resultou em um maior número de features significativos. Esses features foram então utilizados para a análise de enriquecimento de vias, baseada na identificação putativa dos metabólitos e nos algoritmos preditivos.

Figura 13 – Resultados da análise estatística univariada. O teste de ANOVA de 2 vias com múltiplas comparações entre os grupos pareados resultou em 303 features estatisticamente significativos (não ajustado por FDR), de um total de 1038. Os features encontrados exclusivamente em cada comparação (Mucosa vs. Pré-marsupialização; Mucosa vs. Pós-marsupialização; Pré vs. Pós-marsupialização) foram 145, 49 e 26 respectivamente. A comparação que resultou em um maior número de features estatisticamente significativos foi a realizada entre os grupos de mucosa e CO pré marsupialização.



Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p. 7

A identificação putativa dos metabólitos em ambos os modos de ionização resultou em dezoito features, os quais foram relacionados com metabólitos no CEU Mass Mediator e resultaram na identificação de cinco vias metabólicas alteradas (TABELA 4). Já a identificação complementar baseada nos algoritmos resultou em onze vias metabólicas alteradas. A maioria deles pertence à classe dos glicerolipídios, glicerofosfolipídios e ácidos graxos. Além disso, também foram encontrados esteróides e seus derivados e carboidratos e seus conjugados.

A comparação entre a mucosa e CO pré marsupialização revelou dez vias metabólicas significativamente alteradas: metabolismo de oxilipina, ácido linoléico, vitamina E, ácido siálico, ômega-3 e galactose, glicólise e gliconeogênese, transporte de carnitina, biossíntese de ácidos graxos e degradação de α -tocoferol. A comparação entre mucosa e CO pós marsupialização mostrou cinco vias metabólicas alteradas: biossíntese de ubiquinona, glicosfingolipídios e metabolismo de nicotinato / nicotinamida, beta-oxidação de ácidos graxos di-insaturados e ferroptose. Quando comparados os fragmentos de CO antes e após a marsupialização, foram encontrados o metabolismo do nicotinato / nicotinamida, a degradação do α -tocoferol e a biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados como vias metabólicas significativamente alteradas (TABELA 5).

Tabela 5 – Vias metabólicas significativamente alteradas após a identificação putativa dos metabólitos e aplicação dos algoritmos preditivos.

Enriquecimento de vias		Identificação putativa	P-valor		
			Mummichog (Gamma P)	GSEA (Adj P)	Combinado (Meta P)
Mucosa x Pre marsupialização	Degradação de α -tocoferol	0.0026*	-	-	-
	Metabolismo de oxilipinas	0.0054*	-	-	-
	Metabolismo de ácido linoléico	0.0063*	-	-	-
	Metabolismo de vitamina E	-	0.024*	0.965	0.163
	Metabolismo de ácido siálico	-	0.027*	0.965	0.193
	Glicólise e gliconeogênese	-	0.033*	0.914	0.211
	Carnitina	-	0.034*	0.826	0.253
	Biossíntese de ácidos graxos	-	0.046*	0.766	0.156
	Metabolismo de ômega-3	-	0.048*	0.965	0.333
	Metabolismo de galactose	-	0.049*	0.965	0.528

Mucosa x Pós marsupialização	Metabolismo de nicotinato e nicotinamida	0.0004*	-	-	-
	Ferroptose	0.0209*	-	-	-
	Biossíntese de ubiquinona	-	0.034*	1	0.122
	Metabolismo de glicosfingolípídios	-	0.048*	1	0.225
	β-Oxidação de ácidos graxos di-insaturados	-	0.043*	1	0.179
Pre x Pós marsupialização	Metabolismo de nicotinato e nicotinamida	0.0001*	-	-	-
	Degradação de α-tocoferol	0.0026*	-	-	-
	Biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados	-	0.203	0.851	0.041*

*vias estatisticamente significativas (p<0.05)

Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p. 8

9 DISCUSSÃO

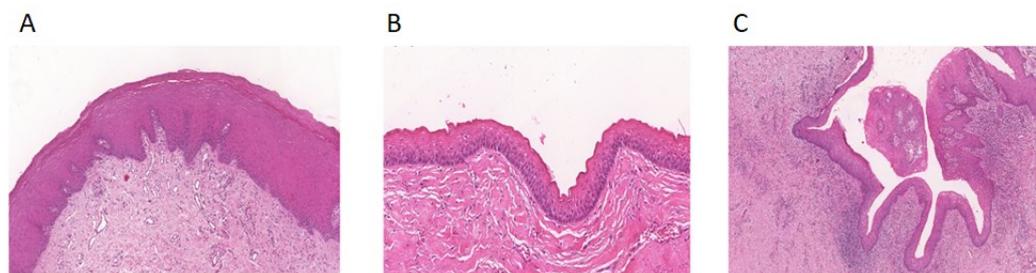
O ceratocisto odontogênico representa uma condição distinta das demais lesões císticas odontogênicas devido ao seu mecanismo de crescimento, comportamento clínico infiltrativo e tendência à recorrência. Assim, não há consenso sobre qual é a melhor modalidade de tratamento a ser adotada (CHRCANOVIC *et al.*, 2017). Nesse sentido, a marsupialização representa uma modalidade terapêutica conservadora para o CO que promove alterações biológicas que o tornam semelhante à mucosa oral adjacente (CSERNI *et al.*, 2019).

No presente estudo, foram utilizadas amostras pareadas de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), divididas em três grupos de comparação submetidas a uma análise metabolômica *untargeted*. Nossos resultados sugeriram que as vias metabólicas do CO marsupializado apresentam mais semelhanças com a mucosa oral do que com a lesão antes de ser submetida a esse procedimento. A mucosa oral adjacente e o CO pré marsupialização são tecidos distintos e, por esse motivo, quando comparados apresentaram um maior número de vias metabólicas alteradas de forma significativa e os 25 principais features com maiores intensidades. Por outro lado, a semelhança entre o CO marsupializado e mucosa oral já descrita a partir de outros aspectos biológicos foi ainda mais reforçada no estudo pelo menor

número de vias alteradas com menores intensidades de features correspondentes.

A marsupialização induz um processo inflamatório que promove alterações na cápsula e no revestimento epitelial cístico do CO (Figura 14A, B e C) (OH *et al.*, 2018; TELLES *et al.*, 2013). A cápsula se torna mais fibrosa e espessa, enquanto o epitélio fino passa a apresentar cristas, aumentando a área de contato com a cápsula (AWNI *et al.*, 2017). Além disso, podem ser observados graus variados de hiperplasia epitelial, perda de paraqueratinização e até mesmo a ausência de revestimento epitelial ceratocístico típico. A camada de células basais também sofre alterações histológicas caracterizadas pela perda do aspecto em paliçada (CSERNI *et al.*, 2019; NAKAMURA *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2018).

Figura 14 – Fotomicrografias representando as alterações morfológicas do ceratocisto odontogênico pré (B) e pós (C) marsupialização e sua comparação à mucosa oral (A).



Fonte: LEITE-LIMA *et al.*, 2021, p.6

Várias vias metabólicas encontradas na análise como: ferroptose, metabolismo de nicotinato/nicotinamida, glicosfingolipídios, ubiquinona e beta-oxidação de ácidos graxos di-insaturados, foram relacionadas ao processo biológico e as diferenças fenotípicas observadas após a marsupialização do CO, em comparação com a mucosa oral adjacente. Seus papéis contribuintes na inflamação, estresse oxidativo, adesão de queratinócitos à membrana basal, diferenciação e habilidades de proliferação celular são brevemente discutidos, embora seu impacto em cada uma dessas funções deva ser completamente explorado e confirmado por pesquisas futuras.

A ferroptose é uma forma de morte celular regulada (DIXON *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2020) dependente de um conjunto de reações enzimáticas de

ação positiva, incluindo a biossíntese de ácido graxo poli-insaturado (PUFA) contendo fosfolipídios (STOCKWELL *et al.*, 2017). Este tipo peculiar de morte celular regulada já é associado a várias doenças (por exemplo, lesão renal aguda, câncer e doença cardiovascular, neurodegenerativa e hepática) (HAN *et al.*, 2020). Curiosamente, ela parece ser impactada pelo fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADPH), um dos agentes redutores mais importantes em células com papel protetor contra dano oxidativo excessivo (HAN *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020). De fato, por anotação putativa dos metabólitos, o metabolismo do nicotinato e da nicotinamida também foi encontrado como uma via enriquecida estatisticamente significativa comparando a mucosa oral e o ceratocisto marsupializado. Essa via é vital para todas as células eucarióticas, pois a nicotinamida é um precursor principal do dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD⁺), que é necessário para a glicólise, reparo do DNA e fosforilação oxidativa (CANTÓ *et al.*, 2015).

Os glicosfingolipídeos (GSLs) são conhecidos como mediadores da adesão celular e moduladores da transdução de sinais (HAKOMORI, 1993), além de suas funções classicamente conhecidas como antígenos e receptores (HAKOMORI *et al.*, 1998). Eles modulam o crescimento e a proliferação celular por meio de sua interação com moléculas de sinalização transmembrana, como os receptores de fatores de crescimento (MEUILLET *et al.*, 1999; PONTIER *et al.*, 2012). É importante ressaltar que o papel dos GSLs na sinalização de EGF-EGFR já foi demonstrado (COSKUN *et al.*, 2011; MERRILL *et al.*, 2011; MEUILLET *et al.*, 1999) e pode ser crucial no metabolismo e patogênese do ceratocisto, uma vez que o processo de sinalização de EGF tem papel pronunciado no desenvolvimento e persistência das lesões císticas odontogênicas, estando envolvido na diferenciação, homeostase e manutenção do tecido epitelial (GONÇALVES *et al.*, 2012).

As atividades diferenciais das vias relacionadas à ubiquinona e à beta-oxidação de ácidos graxos diinsaturados podem estar ligadas à resposta ao estresse oxidativo à inflamação induzida pela marsupialização (AWNÍ *et al.*, 2017). A ubiquinona é um produto da via de síntese do colesterol que atua na cadeia respiratória mitocondrial. Apresenta funções antioxidantes que estão aumentadas na carcinogênese (ACIMOVIC *et al.*, 2012), e uma função protetora contra o dano celular causado pela autoxidação de ácidos graxos poli-

insaturados (MORRÉ *et al.*, 2011). Além disso, algumas células inflamatórias, como células T e macrófagos envolvidos na resolução da inflamação, usam a oxidação de ácidos graxos para a produção de energia (SOTO-HEREDERO *et al.*, 2020). Em conjunto, a observação dessas vias metabólicas alteradas no contexto do ceratocisto marsupializado pode estar de acordo com o infiltrado inflamatório geralmente observado no exame histológico da lesão quando submetida a esta modalidade terapêutica.

Considerando as comparações entre mucosa oral e o CO pré marsupialização, foram encontradas vias metabólicas alteradas relacionadas ao desenvolvimento, manutenção e capacidade de invasão da lesão, como vitamina E, ácido siálico, oxilipinas, ácido linoléico, glicose e metabolismo da galactose.

A família da vitamina E inclui oito isoformas lipossolúveis, dentre elas o α -tocoferol. Ela atua como um antioxidante natural das membranas celulares através da inibição dos radicais livres cancerígenos (BEHARKA *et al.*, 2002; BRIGELIUS-FLOHE *et al.*, 1999; IQUBAL *et al.*, 2014). O ácido siálico, por sua vez, pertence à família dos monossacarídeos e é encontrado na superfície celular de eucariotos na forma de glicanos ou como componente da cápsula de algumas bactérias. É um componente importante do ponto de vista biológico e patológico que parece estar envolvido em processos de interação celular, estabilidade de glicoproteínas de membrana, metástase e invasividade tumoral (LI *et al.*, 2012; SCHWARZKOPF *et al.*, 2002).

O ácido linoléico é um ácido graxo necessário para a formação epidérmica (VIČANOVÁ *et al.*, 1999) e está associado a alguma carcinogênese tumoral por peroxidação lipídica (MOLLERUP *et al.*, 1996). As oxilipinas, por sua vez, são compostos oxigenados derivados do metabolismo do ácido linoléico (LU *et al.*, 2017) envolvidos em eventos imunoestimuladores (ZIVKOVIC *et al.*, 2011).

Proteínas transportadoras de glicose como o GLUT-I envolvidas na regulação metabólica dos níveis de glicose, são expressas no CO (VASCONCELOS *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014). Corroborando esse achado, observamos regulação alterada da glicólise e gliconeogênese em nossa análise metabolômica, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento do ceratocisto. A carnitina também pode estar associada a este contexto, uma vez que atua

como uma “molécula de transporte” que promove a oxidação de ácidos graxos mitocondriais, que serve como um poderoso substrato energético para o crescimento celular (CONSOLE *et al.*, 2020).

Além disso, o metabolismo da galactose está relacionado ao desprendimento e diferenciação dos queratinócitos no modelo de cultura celular ao nível de RNA (BANNO *et al.*, 2014). O desprendimento de queratinócitos no CO é sugerido como o resultado de alterações em proteínas constituintes dos desmossomos (DINIZ *et al.*, 2020). De forma consistente, nossa análise revelou que o ceratocisto pré marsupialização exibiu regulação significativamente alterada do metabolismo da galactose. Embora o metabolismo da galactose possa estar relacionado à fraca aderência da interface epitélio-conjuntivo, mais estudos são necessários para testar essa hipótese. Um melhor entendimento de como todas essas vias atuam na patogênese do CO pode levar ao desenvolvimento de opções terapêuticas relacionadas à menor morbidade e melhoria consequente da qualidade de vida dos pacientes afetados.

Esse estudo apresenta várias limitações que devem ser consideradas durante a interpretação e validação dos dados. Uma das principais limitações foi o número reduzido das amostras utilizadas na análise metabolômica, o que dificultou a construção de modelos multivariados com significância estatística. Desta forma, features com significância estatística foram acessados por meio de análise univariada, seguida da anotação dessas espécies por meio de busca em bibliotecas públicas e avaliação dos resultados por análise de enriquecimento de vias. Essas estratégias nos permitiram descrever algumas hipóteses sobre as alterações no ceratocisto odontogênico marsupializado. Embora o CO represente o terceiro cisto odontogênico mais prevalente, foi difícil recuperar uma coorte maior de amostras pareadas (mucosa, pré-marsupialização e pós-marsupialização). Para superar esse problema com relação ao acompanhamento dos pacientes, empregamos amostras parafinizadas (FFPE). Elas são alternativas promissoras em estudos metabolômicos (DONCZO *et al.*, 2018), mas a fixação em formalina e a inclusão em parafina reduzem os níveis de várias classes de metabólitos. Outro gargalo é a falta de padrões analíticos relativos à cromatografia líquida para confirmar a fase de enriquecimento das vias.

Independentemente das limitações, o presente estudo é o primeiro a investigar a semelhança entre CO marsupializado e amostras de mucosa oral adjacente sob a perspectiva metabólica. Nós encorajamos estudos futuros que considerem o uso de cortes maiores por colaborações multicêntricas ou análises prospectivas. O uso de amostras frescas congeladas também seria benéfico para superar as limitações técnicas.

10 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho revelou pela primeira vez possíveis vias metabólicas envolvidas nas alterações metaplásicas observadas após a marsupialização do CO. Nossos dados mostram maior semelhança do ceratocisto após a marsupialização com a mucosa oral quando comparado com a lesão antes desse procedimento. Quanto melhor entendermos as alterações metabólicas subjacentes a esse processo, mais nos aproximaremos de melhora em seu manejo, permitindo o desenvolvimento de biomarcadores específicos e até mesmo de terapias direcionadas.

11 FINANCIAMENTO

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [código 001] e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, W.A. Surgical treatment of keratocystic odontogenic tumour: A review article. **The Saudi Dental Journal**, v. 23, n. 2, p. 61-65, 2011.

ACIMOVIC, J.; LÖVGREN-SANDBLOM, A.; ERIKSSON, L.C.; BJÖRKHEM-BERGMAN, L. The anti-carcinogenic effect of statins in a rat model correlates with levels and synthesis of ubiquinone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, p. 348-352, 2012.

ALBÓNIGA, O.E.; GONZÁLEZ, O.; ALONSO, R.M.; XU, Y.; GOODACRE, R. Optimization of XCMS parameters for LC-MS metabolomics: an assessment of automated versus manual tuning and its effect on the final results. **Metabolomics**, v. 16, n. 14, p. 2-12, 2020.

AL-MORAISSI, E. A.; DAHAN, A. A.; ALWADEAI, M.S. *et al.* What surgical treatment has the lowest recurrence rate following the management of keratocystic odontogenic tumor? : A large systematic review and meta-analysis. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 1, p. 131–144, 2017.

AL-MORAISSI, E. A.; POGREL, M. A.; III, E. E. Does the Excision of Overlying Oral Mucosa Reduce the Recurrence Rate in the Treatment of the Keratocystic Odontogenic Tumor ? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 10, p. 1974–1982, 2016.

AUGUST, M.; FAUQUIN, W.C.; TROULIS, M.; KABAN, L.B. Dedifferentiation of odontogenic keratocyst epithelium after decompression. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, p. 678–683, 2003.

AWNI, S.; CONN, B. Decompression of keratocystic odontogenic tumors leading to increased fibrosis, but without any change in epithelial proliferation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 123, n. 6, p. 634-644, 2017.

BANNO, T.; BLUMENBERG, M. Keratinocyte detachment-differentiation connection revisited, or *Anoikis-Pityriasi Nexus Redux*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100279, 2014.

BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHARD, P.; SIDRANSKY, D. (Eds.)(2005). *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*, 3rd ed. Lyon, France: IARC Press.

BEHARKA, A.A.; WU, D.; SERAFINI, M.; MEYDANI, S.N. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 6, p. 502-511, 2002.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB Journal**, v.13, n.10, p.1145-1155, 1999.

BRAJIĆ, I.; ŠKODRIĆ, S.; TEPAVČEVIĆ, Z.; SOLDATOVIĆ, I.; MILAŠIN, J.; ANDRIĆ, M. Survivin, cyclin D1, and p21ras in keratocystic odontogenic tumors before and after decompression. **Oral Diseases**, v. 22, n. 3, p. 220–225, 2016.

BERGE, T.I.; HELLAND, S.B.; SÆLEN, A.; ØREN, M.; JOHANNESSEN, A.C.; SKARTVEIT, L.; GRUNG, B. Pattern of recurrence of nonsyndromic keratocystic odontogenic tumours. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.122, p.10-16, 2016.

CAIXETA, C. A.; RIBEIRO, C. M.; DE CARLI, M. L.; SPERANDIO, F. F.; PEREIRA, A. A. C.; HANEMANN, J. A. C. Decompression of an extensive Keratocystic Odontogenic Tumor in an elderly patient. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology**, v. 29, n. 3, p. 284–287, 2017.

CANTÓ, C.; MENZIES, K.J.; AUWERX, J. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. **Cell Metabolism**, v. 22, n.1, p. 31-53, 2015.

CANUTO, G.A.B. Avaliação metabólica comparativa *in vitro* de fármaco candidato ao tratamento de leishmaniose. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 27, 2016.

CANUTO, G.A.B.; DA COSTA, J.L.; DA CRUZ, P.L.R.; DE SOUZA, A.R.L.; FACCIO, A.T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.T.; TAVARES, M.F.M. Metabólica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CHRCANOVIC, B.R.; GOMEZ, R.S. Recurrence probability for keratocystic odontogenic tumours: An analysis of 6427 cases. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 45, n. 2, p. 244-251, 2017.

CHONG, J.; WISHART, D.S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, p. 1-128, 2019.

CONSOLE, L.; SCALISE, M.; MAZZA, T.; POCHINI, L.; GALLUCCIO, M.; GIANGREGORIO, N.; TONAZZI, A.; INDIVERI, C. Carnitine traffic in cells. Link with cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1-16, 2020.

CORNELISSEN, L.A.M.; BLANAS, A.; VAN DER HORST, J.C.; KRUIJSSEN, L.; ZAAL, A.; O'TOOLE, T.; WIERCX, L. VAN KOOYK, Y.; VAN VLIET, S.J. Disruption of sialic acid metabolism drives tumor growth by augmenting CD8+ T cell apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 144, p. 2290–2302, 2019.

COSKUN, Ü.; GRZYBEK, M.; DRECHSEL, D.; SIMONS, K. Regulation of human EGF receptor by lipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. 9044-9048, 2011.

CRUZ, A.F.; VITÓRIO, J.G.; DUARTE-ANDRADE, F.F.; DINIZ, M.G.; CANUTO, G.A.B.; DE TOLEDO, J.S.; FONSECA, F.P.; FERNANDES, A.P.; ANDRÉ, L.C.; GOMES, C.C.; GOMEZ, R.S. Reticular and erosive oral lichen planus have a distinct metabolomic profile: A preliminary study using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 48, p. 400–405, 2019.

CSERNI, D.; ZOMBORI, T.; STÁJER, A.; RIMOVSZKI, A.; CSERNI, G.; BARÁTH, Z. Immunohistochemical Characterization of Reactive Epithelial Changes in Odontogenic Keratocysts. **Pathology and Oncology Research**. v. 26, n. 3, p. 1717-1724, 2019.

CUNHA, J. F.; GOMES, C.; MESQUITA, A. DE. Clinicopathologic features associated with recurrence of the odontogenic keratocyst : a cohort retrospective analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 121, n. 6, p. 629–635, 2016.

DE CASTRO, M.S.; CAIXETA, C.A.; DE CARLI, M.L.; RIBEIRO JÚNIOR, N.V.; MIYAZAWA, M.; PEREIRA, A.A.C.; SPERANDIO, F.F.; HANEMANN, J.A.C.

Conservative surgical treatments for nonsyndromic odontogenic keratocysts: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, p. 2089–2101, 2018.

DE RESENDE, T.A.C.; BERNARDES, V.F.; DA SILVA, J.C.; DE MARCO, L.A.; GOMEZ, R.S.; GOMES, C.C.; DINIZ, M.G. Loss of heterozygosity of *MIR15A/MIR16-1*, negative regulators of the antiapoptotic gene *BCL2*, is not common in odontogenic keratocysts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, p. 313–316, 2018.

DIAS, G.; MARQUES, T.; COELHO, P. Treatment options for keratocyst odontogenic tumour (KCOT): a systematic review. **Oral Surgery**, v. 10, n. 4, p. 193–209, 2017.

DIETERLE, F.; ROSS, A.; SCHLOTTERBECK, G.; SENN, H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in H NMR Metabonomics. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 4281-4290, 2006.

DI GUIDA, R.; ENGEL, J.; ALLWOOD, J.W.; WEBER, R.J.M.; JONES, M.R.; SOMMER, U.; VIANT, M.R.; DUNN, W.B. Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. **Metabolomics**, v. 12, n. 93, p. 1-14, 2016.

DINIZ, M.G.; BORGES, E.R.; GUIMARÃES, A.L.S.; MOREIRA, P.R.; BRITO, J.A.R.; GOMEZ, M.V.; DE MARCO, L.; GOMEZ, R.S. PTCH1 isoforms in odontogenic keratocysts. **Oral Oncology**, v. 45, n. 3, p. 291–295, 2009.

DINIZ, M.G.; GOMES, C.C.; CASTRO, W.H.; *et al.* MiR-15 a/16-1 influences *BCL2* expression in keratocystic odontogenic tumors. **Cell Oncology**, v. 35, p. 285-291, 2012.

DINIZ, M.G.; DUARTE-ANDRADE, F.F.; STUSSI, F. VITÓRIO, J.G.; FONSECA, F.P.; DOMINGUES, R.R.; LEME, A.F.P.; GOMES, C.C.; GOMEZ, R.S. Deregulation of desmosomal proteins and extracellular matrix proteases in odontogenic keratocyst. **Oral Diseases**, v. 00, p. 1–10, 2020.

DIXON, S.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E.M.; GLEASON, C.E.; PATEL, D.N.; BAUER, A.J.; CANTLEY, A.M.; YANG, W.S.; MORRISON III, B.; Stockwell, B.R. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DOMINGO-ALMENARA, X., SIUZDAK, G. (2020). Metabolomics data processing using XCMS. In S. Li (Ed.), *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics* (pp.11-24), New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_2

DONCZO, B.; GUTTMAN, A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. **155**, p. **125-134**, 2018.

DUARTE-ANDRADE, F.F.; SILVA, A.M.B.; VITÓRIO, J.G.; CANUTO, G.A.B.; COSTA, S.F.S.; DINIZ, M.G.; FERNANDES, A.P.; DE TOLEDO, J.S.; ANDRÉ, L.C.; GOMES, C.C.; GOMEZ, R.S.; FONSECA, F.P. The importance of BRAF-V600E mutation to **ameloblastoma** metabolism. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 48, p. 307–314, 2019.

DUDZIK, D.; BARBAS-BERNARDOS, C.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 149–173, 2018.

EL- NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. WHO Classification of Head and Neck Tumours. (4th ed. - 2017). Lyon, IARC Press.

FIDELE, N.B.; ZHAO, Y.; TIANFU, W.; SUN, Y.; MAN, Q.; LIU, B. Treatment of multiple odontogenic keratocysts involving the Chinese patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 77, n. 10, p. 2044-2054, 2019.

GIL-DE-LA-FUENTE, A.; GODZIEN, J.; SAUGAR, S.; GARCIA-CARMONA, R.; BADRAN, H.; WISHART, D.S.; ... Otero, A. CEU Mass Mediator 3.0: A metabolite annotation tool. *Journal of Proteome Research*, v. 18, n. 2, p. 797-802, 2019.

GOMES, C.C.; GUIMARÃES, L.M.; DINIZ, M.G.; GOMEZ, R.S. Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 46, n. 10, p. 877–882, 2017.

GONÇALVES, C.K.; FREGNANI, E.R.; LEON, J.E.; SILVA-SOUSA, Y.T.C.; PEREZ, D.E.C. Immunohistochemical expression of p63, epidermal growth factor receptor (EGFR) and notch-1 in radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 4, p. 337-343, 2012.

GOODACRE, R.; BROADHURST D.; SMILDE, A.K.; KRISTAL, B.S.; BAKER, J.D.; BEGER, R.; BESSANT, C.; CONNOR, S.; CAPUANI, G.; CRAIG, A.; EBBELS, T.; KELL, D.B.; MANETTI, C.; NEWTON, J.; PATERNOSTRO, G.; SOMORJAI, R.; SJÖSTRÖM, M.; TRYGG, J.; WULFERT, F. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p. 231-241, 2007.

GROMSKI, P.S.; XU, Y.; HOLLYWOOD, K.A.; TURNER, M.L.; GOODACRE, R. The influence of scaling metabolomics data on model classification accuracy. **Metabolomics**, v. 11, p. 684-695, 2015.

HADDEN, MK. Hedgehog and vitamin D signaling pathways in development and disease. **Vitamins & Hormones**, v. 100, p. 231-253, 2016.

HADZIABDIC, N.; DZINOVIC, E.; UDOVICIC-GAGULA, D.; SULEJMANAGIC, N.; OSMANOVIC, A.; HALILOVIC, S.; KURTOVIC-KOZARIC, A. Nonsyndromic Examples of Odontogenic Keratocysts: Presentation of interesting cases with a literature review. **Case Reports in Dentistry**, v. 2019, p.1-12, 2019.

HAKOMORI, S. Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signaling and cell-cell interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 3, p. 583-595, 1993.

HAKOMORI, S.; HANDA, K.; IWABUCHI, K.; YAMAMURA, S.; PRINETTI, A. New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain", a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. **Glycobiology**, v. 8, n. 10, p. 11-18, 1998.

HAN, C.; LIU, Y.; DAI, R.; ISMAIL, N.; SU, W.; LI, B. Ferroptosis and its potential role in human diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 1-19, 2020.

HEIKINHEIMO, K.; KURPPA, K. J.; LAIHO, A.; PELTONEN, S.; BERDAL, A.; BOUATTOUR, A.; RUHIN, B.; CATÓN, J.; THESLEFF, I.; LEIVO, I.; Morgan, P. R. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from

keratocystic odontogenic tumor. **Journal of Dental Research**, v. 94, p. 101–111, 2015.

IQUBAL, M.A.; KHAN, M.; KUMAR, P.; KUMAR, A.; AJAI, K. Role of vitamin E in prevention of oral cancer: - A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, p. Z305-ZE07, 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.

KARAMAN, I. (2017). *Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis*. In Sussulini, A. (Eds.) *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications: Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp.3-18). Campinas: Ed. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_1

KATAJAMAA, M.; ORESIĆ, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p. 318–328, 2007.

KINARD, B.; HANSEN, G.; NEWMAN, M.; DENNIS, P.; HAEFFS, T.; PEREZ, S.; HAMAOKA-SAKAMOTO, A.; STEED, M.; HUGHES, P.; AUGUST, M.; ABRAMOWICZ, S. How well do we manage the odontogenic keratocyst ? A multicenter study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 127, n. 4, p. 282–288, 2019.

KLASSEN, A., FACCIIO, A.T., CANUTO, G.A.B., DA CRUZ, P.L.R., RIBEIRO, H.C., TAVARES, M.F.M., SUSSULINI, A. (2017). Metabolomics: definitions and significance in systems biology. In Sussulini, A. (Eds.), *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications: Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp.3-18). Campinas: Ed. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_1

KOHL, S.M.; KLEIN, M.S.; HOCHREIN, J.; OEFNER, P. J.; SPANG, R.; GRONWALD, W. State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 146-160, 2012.

LEITE-LIMA, F.; BASTOS, V.C.; VITÓRIO, J.G.; DUARTE-ANDREADE, F.F.; PEREIRA, T.S.F.; MARTINS-CHAVES, R.R.; CRUZ, A.F.; DE LACERDA, J.C.T.; LEBRON, Y.A.R.; MOREIRA, V.R.; SANTOS, L.V.S.; GOMES, C.C.; DE CASTRO, W.H.; CANUTO, G.B.; GOMEZ, R.S. Unveiling metabolic changes in marsupialized odontogenic keratocyst: A pilot study. **Oral Diseases**, v.00, p. 1-11, 2021.

LEUNG, Y.Y.; LAU, S.L.; TSOI, K.Y.Y.; MA, H.L.; NG, C.L. Results of the treatment of keratocystic odontogenic tumours using enucleation and treatment of the residual bony defect with Carnoy's solution. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 9, p. 1154-1158, 2016.

LI, N.; SONG, Y.P.; TANG, H.; WANG, Y. Recent developments in sample preparation and data pre-treatment in metabonomics research. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 589, p. 4-9, 2016.

LI, S.; PARK, Y.; DURAISINGHAM, S.; STROBEL, F.H.; KHAN, N.; SOLTOW, Q.A.; JONES, D.P.; PULENDRAN, B. Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 7, p. 1-11, 2013.

LI, X.Z.; YANG, X.Y.; WANG, Y.; ZHANG, S.N.; ZOU, W.; WANG, Y.; LI, X.N.; WNANG, L.S.; ZHANG, Z.G.; XIE, L.Z. Urine metabolic profiling for the pathogenesis research of erosive oral lichen planus. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 206-213, 2017.

LI, Y.; CHEN, X.I. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 887-905, 2012.

LILAND, K.H. Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1-15, 2011.

LIU, X.; ZHANG, M.; LIU, X.; SUN, H.; GUO, Z.; TANG, X.; WANG, Z.; LI, J.; HE, L.; ZHANG, W.; WANG, Y.; LI, H.; FAN, L.; TSANG, S.X.; ZHANG, Y.; SUN, W. Investigation of Plasma Metabolic and Lipidomic Characteristics of a Chinese Cohort and a Pilot Study of Renal Cell Carcinoma Biomarker. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p.1-13, 2020.

LU, Y.; FANG, J.; ONG, C.N.; CHEN, S., LI, N., CUI, L., HUANG, C.; LING, Q.; CHIA, S.E.; CHEN, M. Targeted analysis of omega-6-derived oxylipins and parent polyunsaturated fatty acids in serum of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma patients. **Metabolomics**, v. 13, n. 6, p. 1-7, 2017.

MAGIC, M.; ZELJIC, K.; JOVANDIC, S.; STEPIC, J.; PEJOVIC, M.; COLIC, S. MAGIC, Z.; SUPIC, G. Hedgehog signaling pathway and vitamin D receptor

gene variants as potential risk factors in odontogenic cystic lesions. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, p. 2675-2684, 2019.

MALČIĆ, A.I.; BREEN, L.; JOSIĆ, D.; KRMEK, J.; DŽOMBETA, T.; MATIJEVIĆ, J.; GRGUREVIĆ, L.; PAVELIĆ, K.; KRUŠLIN, B.; PAVELIĆ, S.K. Proteomics profiling of keratocystic odontogenic tumours reveals AIDA as novel biomarker candidate. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 44, p. 367 – 377, 2015.

MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.C.; VAN DER WAAL, I. Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features. **Oral oncology**, v. 46, n. 5, p. 219-225, 2010.

MENDES, R.A.; CARVALHO, J.F.C.; VAN DER WAAL, I. Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment – An overview. **Oral Oncology**, v. 46, n. 1, p. 19-24, 2010.

MERCHAN, B.B.; MORCILLO, S.; MARTIN-NUÑEZ, G.M.; TINAHONES F.J.; MACÍAS-GONZÁLEZ, M. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 167, p. 203-218, 2017.

MERRILL, A.H.J. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6387-6422, 2011.

MEUILLET, E.J.; KROES, R.; YAMAMOTO, H.; WARNER, T.G.; FERRARI, J.; MANIA-FARNELL, B.; GEORGE, D.; REBBAA, A.; MOSKAL, J.R.; BREMER, E.B. Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431. **Cancer Research**, v. 59, p. 234-240, 1999.

MOLLERUP, S.; HAUGEN, A. Differential effect of polyunsaturated fatty acids on cell proliferation during human epithelial in vitro carcinogenesis: involvement of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **British Journal of Cancer**, v. 74, p. 613-618, 1996.

MORRÉ, D.J.; MORRÉ, D.M. Non-mitochondrial coenzyme Q. **BioFactors**, v. 37, n. 5, p. 355-360, 2011.

NAKAMURA, N.; MITSUYASU, T.; MITSUYASU, Y.; TAKETOMI, T.; HIGUCHI, Y.; OHISHI, M. Marsupialization for odontogenic keratocysts: Long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 94, n. 5, p. 543-53, 2002.

NAZ, S.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 99–105, 2014.

NINOMIYA, T.; KUBOTA, Y.; KOJI, T.; SHIRASUNA, K. Marsupialization inhibits interleukin-1 α expression and epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 31, p. 526–533, 2002.

ODELL, E. (2017). *Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine*, 9th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

OH, J.S.; YOU, J.S.; KIM, S.G. Clinical and histomorphometric evaluation of decompression followed by enucleation in the treatment of odontogenic keratocyst. **Journal of Dental Sciences**, v. 13, p. 329-333, 2018.

PANG, Z.; CHONG, J.; LI, S.; XIA, J. MetaboAnalystR3.0: Toward and optimized workflow for global metabolomics. **Metabolites**, v. 10, n. 5, p. 186, 2020.

PEREIRA, K.M.A.; COSTA, S.F.S.; PEREIRA, N.B; DINIZ, M.G; CASTRO, W.H; GOMES, C.C; GOMEZ, R.S. DNA methylation profiles of 22 apoptosis-related genes in odontogenic keratocysts before and after marsupialization. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 124, n. 5, p. 483–489, 2017.

PITAK-ARNNOP, P.; CHAINE, A.; OPREAN, N.; DHANUTHAI, K.; BERTRAND, J.C.; BERTOLUS, C. Management of odontogenic keratocysts of the jaws: A ten-year experience with 120 consecutive lesions. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surg**, v. 38, n. 5, p. 358-364, 2010.

POGREL, M.A.; JORDAN, R.C.K. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 651-655, 2004.

PONTIER, S.M.; SCHWEISGUTH, F. Glycosphingolipids in signaling and development: from liposomes to model organisms. **Developmental Dynamics**, v. 241, p. 92-106, 2012.

QU, J., YU, F., HONG, Y., GUO, Y., SUN, L., LI, X., LI, T. Underestimated PTCH1 mutation rate in sporadic keratocystic odontogenic tumors. **Oral Oncology**, v. 51, n. 1, p. 40–45, 2015.

QU, J.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; LI, X.; HONG, Y.; ZHAI, J.; WANG, Y.; CHEN, F.; LI, T. PTCH1 alterations are frequent but other genetic alterations are rare in sporadic odontogenic keratocysts. **Oral Diseases**, v. 25, n. 6, p. 1600-1607, 2019.

SCHWARZKOPF, M.; KNOBELOCH, K.P.; ROHDE, E.; HINDERLICH, S.; WIECHENS, N.; LUCKA, L.; HORAK, I.; REUTTER, W.; HORSTKORTE, R. Sialylation is essential for early development in mice. **PNAS**, v. 99, n. 8, p. 5267-5270, 2002.

SHUDOU, H.; SASAKI, M.; YAMASHIRO, T.; TSUNOMACHI, S.; TAKENOSHITA, Y.; KUBOTA, Y.; NINOMIYA, T.; KAWAZU, T.; MORI, Y. Marsupialization for keratocystic odontogenic tumours in the mandible: longitudinal image analysis of tumour size using 3D visualized CT scans. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, p. 290–296, 2012.

SIGUA-RODRIGUEZ, E.A.; GOULART, D.R.; SVERZUT, A.; ASPRINO, L.; DE MORAES, M. Is surgical treatment based on a 1-step or 2-step protocol effective in managing the odontogenic keratocyst? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 77, n. 6, p. 1210.e1-1210.e7, 2019.

SMITH, C.A.; WANT, E.J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 779-787, 2006.

SOTO-HEREDERO, G.; GÓMEZ DE LAS HERAS, M. M.; GABANDÉ-RODRÍGUEZ, E.; OLLER, J.; MITTELBRUNN, M. Glycolysis – a key player in the inflammatory response. **FEBS Journal**, v. 287, n. 16, p. 3350-3369, 2020.

STEUER, A.E.; KAELIN, D.; BOXLER, M.I.; EISENBEISS, L.; HOLZE, F.; VIZELI, P.; CZERWINSKA, J.; DARGAN, P.I.; ABBATE, V.; LIECHTI, M.E.; KRAEMER, T. Comparative Untargeted Metabolomics Analysis of the Psychostimulants 3,4-Methylenedioxy- Methamphetamine (MDMA), Amphetamine, and the Novel Psychoactive Substance Mephedrone after Controlled Drug Administration to Humans. **Metabolites**, v. 10, n. 306, p. 1-20, 2020.

STOCKWELL, B.R.; ANGELI, J.P.; F.; BAYIR, H.; BUSH, A.I.; CONRAD, M.; DIXON, S.J.; FULDA, S.; GASCÓN, S.; HATZIOS, S.K.; KAGAN, V.E.; NOEL, K.; JIANG, X.; LINKERMANN, A.; MURPHY, M.E.; OVERHOLTZER, M.; OYAGI, A.; PAGNUSSAT, G.C.; PARK, J.; ... Zhang, D.D. (2017). Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 273-285, 2017.

TABRIZI, R.; OMIDI, M. DEHBOZORGI, M; HEKMAT, M. Correlation of Radiographic Features and Treatments With the Frequency of Recurrence in Odontogenic Keratocysts of the Mandible. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 25, n. 5, p. 413–417, 2014.

TELLES, D.C.; CASTRO, W.H.; GOMEZ, R. S.; SOUTO, G.R.; MESQUITA, R.A. Morphometric evaluation of keratocystic odontogenic tumor before and after marsupialization. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 496–502, 2013.

TSUJI, K.; WATO, M.; HAYASHI, T.; YASUDA, N.; MATSUSHITA, T.; ITO, T.; GAMOH, S.; YOSHIDA, H.; TANAKA, A.; MORITA, S. The expression of cytokeratin in keratocystic odontogenic tumor, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, radicular cyst and dermoid cyst. **Medical Molecular Morphology**, v. 47, p.156–161, 2014.

VALLEJO-ROSETO, K.A.; CAMOLESI, G.V.; DE SÁ, P.L.D.; BERNAOLA-PAREDES, W.E. Conservative management of odontogenic keratocyst with long-term 5-year follow-up: Case report and literature review. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 66, p. 8-15, 2020.

VASCONCELOS, R.C.; MOURA, J.M.B.O.; BRASILEIRO JÚNIOR, V.L.; DA SILVEIRA, E.J.D.; DE SOUZA, L.B. Immunohistochemical expression of GLUT-1, GLUT-3, and carbonic anhydrase IX in benign odontogenic lesions. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 45, p. 712-717, 2016.

VIČANOVÁ, J.; WEERHEIM, A.M.; KEMPENAAR, J.A.; PONEC, M. Incorporation of linoleic acid by cultured human keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 291, p. 405–412, 1999.

VILLAS-BÔAS, S.G.; BRUHEIM, P. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. **OMICS**, v. 11, n. 3, p. 305-13, 2007.

VINAIXA, M.; SAMINO, S.; SAEZ, I.; DURAN, J.; GUINOVART, J.J.; YANES, O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. **Metabolites**, v. 2, p. 775-795, 2012.

XIA, J.; WISHART, D.S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature protocols**, v. 6, n. 6, p.743-760, 2011.

WISHART, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p. 473-84, 2016.

WRIGHT, J. M.; VERED, M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours : Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head and Neck Pathology**, v. 11, n. 1, p. 68–77, 2017.

YAN, S.K.; WEI, B.J.; LIN, Z.Y.; YANG, Y.; ZHOU, Z.T.; ZHANG, W.D. A metabolomic approach to the diagnosis of oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus and oral leukoplakia. **Oral Oncology**, v. 44, p. 477-483, 2008.

ZHANG, P.; TU, B.; WANG, H.; CAO, Z.; TANG, M.; ZHANG C.; GU, B.; LI, Z.; WANG, L.; YANG, Y.; ZHAO, Y.; WANG, H.; LUO, J.; DENG, C.X.; GAO, B.; ROEDER, R.G.; ZHU, W.G. Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. **PNAS**, v. 111, n. 29, p. 10684- 10689, 2014.

ZHAO, Y.; LIU, B.; HAN, Q.B.; WANG, S.P.; WANG, Y.N. Changes in bone density and cyst volume after marsupialization of mandibular odontogenic keratocysts (keratocystic odontogenic tumors). **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 1361- 1366, 2011.

ZHENG, J.; CONRAD, M. The metabolic underpinnings of ferroptosis. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 6, p. 920-937, 2020.

ZIVKOVIC, A.M.; TELIS, N.; GERMAN, J.B.; HAMMOCK, B.D. Dietary omega-3 fatty acids aid in the modulation of inflammation and metabolic health. **California agriculture**, v. 65, n. 3, p. 106-111, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COEP/UFMG N° CAAE 33541820.3.0000.5149

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico do ceratocisto odontogênico pré e pós marsupialização e comparação à mucosa oral

Pesquisador: Ricardo Santiago Gomez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33541820.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.233.302

Apresentação do Projeto:

O ceratocisto odontogênico é um dos cistos odontogênicos mais prevalentes da cavidade bucal e o seu tratamento está relacionado a altas taxas de recidiva. Trata-se de uma lesão que apresenta comportamento clínico e características histopatológicas específicas, diferentes dos demais cistos odontogênicos. Embora não exista consenso sobre a melhor forma de tratamento da lesão, a marsupialização é um procedimento amplamente utilizado. Estudos microscópicos, imunohistoquímicos e moleculares mostram que o epitélio do ceratocisto, após a marsupialização, sofre modificações após o contato com a mucosa oral, mostrando semelhanças importantes com o revestimento da mucosa. Por outro lado, não sabemos se essas mudanças envolvem também o perfil metabólico da lesão. Dessa forma, o presente estudo visa comparar, qualitativa e quantitativamente, o perfil metabólico do epitélio do ceratocisto odontogênico antes da marsupialização com aquele presente após esse procedimento e com a

mucosa oral do mesmo indivíduo. A amostra será constituída por casos de ceratocistos odontogênicos tratados nos serviços de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital municipal Odilon Behrens. O revestimento do Ceratocisto odontogênico será analisado em dois momentos: antes e após a marsupialização da lesão. Os metabólitos resultantes

de tal análise serão comparados aos constituintes da mucosa oral dos mesmos indivíduos. Com

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad. SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.233.302

isso poderemos responder à pergunta se o epitélio do cisto deixado em contato com a mucosa oral durante a marsupialização apresenta expressão metabólica similar à mucosa oral ou se ele preserva o perfil da lesão presente antes do procedimento cirúrgico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se há alterações metabólicas no revestimento epitelial do Ceratocisto odontogênico pré e pós marsupialização e compará-lo ao revestimento da mucosa oral.

Objetivo Secundário:

- Avaliar o grau de metaplasia sofrido pelo revestimento do ceratocisto ao ser submetido à marsupialização.
- Correlacionar o grau de metaplasia do revestimento do ceratocisto à possível recidiva da lesão.
- Analisar comparativamente o metabóloma do ceratocisto pré e pós marsupialização, frente à mucosa oral.
- Desenvolver ensaios funcionais baseados nos resultados obtidos na análise molecular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados:

Riscos de perda da confidencialidade dos dados dos participantes, relativos à sua identificação. Para evitar que isso ocorra, as amostras serão identificadas e nomeadas através de siglas e numeradas sequencialmente. Cada participante será identificado por um número (de 1 a 7) e suas respectivas amostras nomeadas da seguinte forma: blocos de fragmentos de mucosa receberão a nomenclatura de "muc", aqueles de ceratocisto prévio à marsupialização receberão o nome de "pré" e aqueles do momento posterior à marsupialização de "pós". Dessa forma, teremos amostras identificadas como: muc1 a muc7; pré1 a pré7 e pós1 a pós7.

Benefícios:

O presente estudo poderá ser um norteador na definição de novas abordagens terapêuticas da lesão estudada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante na área de Ciências da Saúde. Conta com apoio financeiro do CNPq.

Estudo observacional/experimental retrospectivo utilizando amostras de ceratocisto odontogênico

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.233.302

obtidas através de levantamento dos casos submetidos à marsupialização do Hospital das Clínicas da UFMG e do Hospital municipal Odilon Behrens, realizados até o segundo semestre de 2019.

Nesta versão, os pesquisadores apresentam as seguintes respostas às recomendações realizadas por este CEP:

Respostas à recomendação 1: Trata-se de uma pesquisa retrospectiva cujo objetivo consiste em avaliar o perfil metabólico do ceratocisto odontogênico quando submetido à modalidade terapêutica de marsupialização e sua comparação à mucosa oral. Para atingir tal objetivo, serão utilizados blocos de tecido parafinado armazenados no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, obtidos a partir da realização de biópsia para confirmação de diagnóstico e tratamento da lesão dos participantes. Tais procedimentos (biópsia e tratamento da lesão) já foram realizados em momento prévio. -Não haverá nova realização desses procedimentos para construção do presente projeto. -Os termos (TCLE) serão aplicados para obtenção de autorização para a utilização desses blocos por parte dos pesquisadores, garantida a confidencialidade dos participantes.

Resposta à recomendação 2) Após nova conferência das datas de nascimento dos participantes contidas nos prontuários, foi observado que todos se enquadram na faixa etária de 18 anos ou mais. Dessa forma realizamos a exclusão do TALE e acrescentamos nos critérios de inclusão do estudo pacientes maiores de idade.

Resposta à recomendação 3) Foi descrito o risco de perda de confidencialidade das amostras, que se encontra tanto na sessão "Riscos" referente às informações básicas do projeto quanto no item 5.2 constituinte da sessão "Materiais e Métodos" intitulado "Riscos relacionados à pesquisa" adicionado ao projeto.

O presente projeto apresenta o risco de perda da confidencialidade dos dados dos participantes, relativos à sua identificação. Para evitar que isso ocorra, as amostras serão identificadas e nomeadas através de siglas e numeradas sequencialmente. Cada participante será identificado por um número (de 1 a 7) e suas respectivas amostras nomeadas da seguinte forma: blocos de fragmentos de mucosa receberão a nomenclatura de "muc", aqueles de ceratocisto prévio à marsupialização receberão o nome de "pré" e aqueles do momento posterior à marsupialização de "pós". Dessa forma, teremos amostras identificadas como: muc1 a muc7; pré1 a pré7 e pós1 a pós7.

Resposta à recomendação 4) No item "Propõe dispensa do TCLE?", adicionamos a seguinte explicação:

Trata-se de um estudo retrospectivo que envolverá a análise de fragmentos de tecidos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 4.233.302

parafinizados resultantes da realização de biópsia para definição do diagnóstico e fragmentos de tecido parafinado correspondentes ao momento do tratamento da lesão. Ambos já foram realizados. Os blocos de parafina encontram-se no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Os participantes serão contatados para que possamos obter a autorização para utilização dos respectivos blocos de parafina, e dessa forma responderão ao TCLE por se tratarem de participantes maiores de 18 anos.

Propõe-se dispensa do termo para os casos em que não for possível localizá-los, seja por motivo de mudança de telefone ou endereço. Para esse fim enviaremos o TCUD (termo de compromisso de uso de dados), de acordo com o qual nos comprometemos em garantir o sigilo dos dados dos participantes.

Resposta à recomendação 5) O cronograma do Projeto de pesquisa estava desatualizado e agora encontra-se em conformidade com o cronograma apresentado no formulário de

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta versão, foram anexados:

- Carta resposta às recomendações do CEP;
- Informações básicas do projeto atualizadas;
- Projeto de pesquisa completo;
- TCUD;
- TCLE para maiores de 18 anos.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou, SMJ, favorável à aprovação do projeto "Título da Pesquisa: Análise do perfil metabólico do ceratocisto odontogênico pré e pós marsupialização e comparação à mucosa oral" Pesquisador Responsável: Ricardo Santiago Gomez.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.233.302

notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1571308.pdf	07/08/2020 16:03:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento_livreesclarecido_maiores.docx	07/08/2020 16:01:20	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcud_cep_ufrmg.docx	07/08/2020 15:59:38	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	carta_resposta.docx	07/08/2020 15:58:42	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_de_pesquisa_metabolomica_cerato_final.docx	07/08/2020 15:57:36	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	parecer_homologado.pdf	05/06/2020 18:21:51	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao_manuseio.docx	05/06/2020 18:20:08	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_biorepositorio.docx	05/06/2020 18:19:39	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	05/06/2020 18:15:21	Ricardo Santiago Gomez	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufrmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.233.302

BELO HORIZONTE, 24 de Agosto de 2020

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICES

APÊNDICE A – Comandos utilizados na fase de tratamento dos dados realizada no software XCMS

- 1) Conversão dos dados brutos para formato mZXML:
 - Software Proteowizard (ms convert)
- 2) Software R (XCMS):
 - 2.1) Peak peaking (deconvolução de picos):


```
data1<-xcmsSet()
```
 - 2.2) Agrupamento de dados:


```
data2<-group(data1,bw=30)
```
 - 2.3) Correção do tempo de retenção:


```
data3<-retcor(data2,family="S",plotype="m")
```
 - 2.4) Reagrupamento de dados:


```
data4<-group(data3,bw=10)
data4
```
 - 2.5) Remoção de valores perdidos:


```
data5<-fillpeaks(data4)
```
 - 2.6) Salvar tabelas de dados:


```
Reporttab<-diffreport(data5, "convpositmucosa", "convpositpre",
"tabelainicial",100)
```

APÊNDICE B – Melhores parâmetros após primeira rodada no XCMS prévios à otimização

```
xset1 <- xcmsSet(
  method = "centWave",
  peakwidth = c(24.8, 32.2),
  ppm = 36.5,
  noise = 149.5,
  snthresh = 5.68,
  mzdiff = -0.0065,
  prefilter = c(9, 270),
  mzCenterFun = "wMean",
  integrate = 1,
  fitgauss = FALSE,
  verbose.columns = FALSE)
```

```
xset2 <- group(
```

```
xset1,
  method = "density",
  bw = 0.25,
  mzwid = 0.042,
  minfrac = 0.94,
```

```

minsamp = 1,
max     = 50)

xset3 <- retcor(
  xset2,
  method      = "obiwarp",
  plottype    = "deviation",
  distFunc    = "cor_opt",
  profStep    = 1,
  center      = 1,
  response    = 1,
  gapInit     = 0.16,
  gapExtend   = 2.64,
  factorDiag  = 2,
  factorGap   = 1,
  localAlignment = 0)

```

APÊNDICE C – Comandos de otimização dos dados no IPO

```

ppParams<-getDefaultXcmsSetStartingParams("centWave")
ppParams
ppParams$ppm<-c(30,40)
ppParams$min_peakwidth<-c(24,30)
ppParams$max_peakwidth<-c(35,45)
ppParams$value_of_prefilter<-c(200,400)
ppParams$prefilter<-c(3,9)
ppParams$snthresh<-c(4,8)
ppParams$mzdiff<--0.0065
ppParams$noise<-c(140,160)
ppResults<-optimizeXcmsSet(params = ppParams,nSlaves = 1,subdir = "IPO")

```

```

rgParams<-getDefaultRetGroupStartingParams("obiwarp")
rgParams
rgParams$bw<-c(0.1,3)
rgParams$profStep<-c(0.7,1)
rgParams$gapInit<-c(0.4,0.7)
rgParams$gapExtend<-c(2.4,2.8)
rgParams$minfrac<-c(0.6,1)
rgParams$mzwid<-c(0.030,0.050)
rgResult<-
optimizeRetGroup(xset=ppResults$best_settings$xset,params=rgParams,nSlaves=1,
subdir="IPO")

```

APÊNDICE D – Comandos utilizados após a otimização dos dados no IPO

```

xset <- xcmsSet(
  method = "centWave",
  peakwidth = c(24.6, 36),

```

```
ppm      = 36,  
noise    = 134,  
snthresh = 5.6,  
mzdiff   = -0.0065,  
prefilter = c(7, 284),  
mzCenterFun = "wMean",  
integrate = 1,  
fitgauss  = FALSE,  
verbose.columns = FALSE)
```

```
xset <- group(  
  xset,  
  method = "density",  
  bw     = 0.97,  
  mzwid  = 0.05,  
  minfrac = 0.84,  
  minsamp = 1,  
  max    = 50)
```

```
xset <- retcor(  
  xset,  
  method      = "obiwarp",  
  plottype    = "deviation",  
  distFunc    = "cor_opt",  
  profStep    = 0.7,  
  center      = 1,  
  response    = 1,  
  gapInit     = 0.7,  
  gapExtend   = 2.8,  
  factorDiag  = 2,  
  factorGap   = 1,  
  localAlignment = 0)
```

```
xset <- group(  
  xset,  
  method = "density",  
  bw     = 0.97,  
  mzwid  = 0.05,  
  minfrac = 0.84,  
  minsamp = 1,  
  max    = 50)  
xset <- fillPeaks(xset)
```

```
reporttab<-  
diffreport(xset,"convpositpos","convpositpre","dadosdefaultIPODoE2",100)
```