



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**



Vildeman Rodrigues de Almeida Junior

**EXPRESSÃO PROTEICA DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS EM  
CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Salvador – BA

2017

Vildeman Rodrigues de Almeida Junior

**EXPRESSÃO PROTEICA DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS EM  
CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia e Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão

Salvador – BA

2017

Junior, Vildeman Rodrigues de Almeida

Expressão Proteica de Fatores Osteoclastogênicos em Cistos e Tumores Odontogênicos / Vildeman Rodrigues de Almeida Junior.  
Salvador 2017.  
73 f.: il.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão.  
Dissertação ( Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde - Universidade Federal da Bahia) – Faculdade de Odontologia.  
Salvador 2017.

1.Reabsorção Óssea 2. Ameloblastoma. 3. Imuno-histoquímica . I.Leitão, Águida Cristina Gomes Henriques . II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ODONTOLOGIA E SAÚDE

## TERMO DE APROVAÇÃO

**C.D. VILDEMAN RODRIGUES DE ALMEIDA JÚNIOR**

**“EXPRESSÃO PROTEICA DE FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS  
EM CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS”**

**BANCA EXAMINADORA:**

*Aguida Henriques*

---

**Profa. Dra. Aguida Cristina Gomes Henriques Leitão (Orientadora)**  
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

*Flávia Caló de Aquino Xavier*

---

**Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier (Examinador Interno)**  
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

*Jurema Freire Lisboa de Castro*

---

**Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro (Examinador Externo)**  
Professora da Universidade Federal de Pernambuco

**“Sempre que puder, fale de amor e com amor para alguém. Faz bem aos ouvidos de quem ouve e à alma de quem fala.”**

Irmã Dulce

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, primeiramente a **Deus**, que nos guiou e nos guia a todo momento nesta trajetória da vida.*

*Dedico também à **toda minha família**, em especial minha **esposa Camila Rodrigues**, pela dedicação, carinho, amor e paciência diários e inesgotáveis. **Aos meus pais, Vildeman Rodrigues e Sueli Costa**, pela base de tudo e exemplos de vida, além do amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, sempre nos abençoando e caminhando ao nosso lado.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Águida Henriques, que possui a essência do ensinar e se tornou para mim um exemplo de como ser um professor. Deixo aqui registrado a eterna gratidão que tenho e sempre terei pela minha querida orientadora.*

*Aos professores do Programa de pós-graduação em Odontologia e Saúde, por toda a dedicação e carinho no ensino, em especial ao Prof. Dr. Jean Nunes e a Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flávia Caló, pela atenção, apoio, colaboração e o cuidado com o setor de patologia da FOUFBA.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Andréia Figueiredo, pelo grande conhecimento e disponibilidade em realizar toda análise estatística do trabalho.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Jurema Freire Lisboa de Castro e toda a sua equipe da UFPE, por colaborar com o nosso trabalho, cedendo casos de lesões odontogênicas do seu serviço.*

*À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Roseana de Almeida Freitas e toda a sua equipe da UFRN, por colaborar com o nosso trabalho, cedendo casos de lesões odontogênicas do seu serviço.*

*Ao Prof. Dr. Roberto Azevedo, coordenador do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial da UFBA/Hospital Santo Antônio pela oportunidade de formação e aprendizado em um dos melhores serviços do nosso país.*

*À todos os meus colegas do Programa de Pós Graduação, que seguiram firmes e unidos na busca pelo conhecimento.*

*Aos alunos de Iniciação Científica, Giele Tenisi, Rafael Rodrigues, Thalita Teixeira, Marcos Vinicius Rocha e Eder Gerardo Santos, que foram fundamentais para construção deste trabalho, muito obrigado!*

*Aos profissionais do Laboratório de Anatomopatologia e Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da UFBA, Táyla Pereira, Edilson Amancio e Mirian Gomes, pela auxílio fundamental nas etapas laboratoriais deste projeto de pesquisa.*

*Á Srta. Sueli Paixão, secretária do Programa de Pós Graduação, pelo apoio administrativo.*

*À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, por ter possibilitado e ter incentivado a minha formação acadêmica e científica.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e investimento na minha qualificação profissional.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por financiar parte desta pesquisa.*

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

### RESUMO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 LESÕES ODONTOGÊNICAS .....	4
2.1.1 Cisto Dentífero (CD) .....	4
2.1.2 Cisto Odontogênico Glandular (COG).....	5
2.1.3 Queratocisto Odontogênico (QO) .....	7
2.1.4 Ameloblastoma (AM) .....	9
2.2 FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS .....	12
2.2.1 Sistema RANK/RANKL/ OPG.....	12
2.2.2 Catepsina K (CatK) .....	16
2.2.3 MMP8 .....	18
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Considerações Éticas.....	23
4.2 Caracterização do Estudo .....	23
4.3 Variáveis Estudadas .....	23
4.4 População .....	23
4.5 Amostra .....	23
4.6 Análise clínica.....	24
4.7 Análise morfológica .....	24
4.8 Estudo Imunoistoquímico .....	25
4.8.1 Método da imunoistoquímica.....	25
4.8.2 Análise imunoistoquímica.....	26
4.9 Análise estatística.....	27
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>9 ANEXO.....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Fotomicrografia do CD corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note epitélio atrófico (setas) e ilha de epitélio odontogênico na cápsula (asterisco).....**31**
- Figura 2.** Fotomicrografias do Cisto Odontogênico Glandular corado em hematoxilina/eosina (H/E). Em A, note estrutura pseudocística e projeções papilares. Em B, note numerosas células mucosas.....**32**
- Figura 3.** Fotomicrografia do Queratocisto Odontogênico corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note área de desgarramento do epitélio da cápsula.....**32**
- Figura 4.** Fotomicrografia do AM folicular corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note áreas de degeneração cística (asterisco) e diferenciação escamosa (seta).....**33**
- Figura 5.** Imunoexpressão de RANKL, CatK, MMP8 e OPG em FD e CD e nos controles positivos (A, D e J: LCCG, G: CR) . Note expressão ausente do RANKL (B) e CatK (E) no FD e fraca no epitélio cístico e cápsula do CD (C e F). Expressão da MMP8 e OPG mais evidente no citoplasma e núcleo das células epiteliais e mesenquimais do FD (H e K) e CD (I e L).....**42**
- Figura 6.** Imunoexpressão de RANKL, CatK, MMP8 e OPG em COG, QO e AM. Note alta expressão do RANKL (C) e CatK (F) no parênquima e estroma do AM, seguido pelo epitélio cístico e cápsula do QO (B e E) e do COG (A e D). Expressão da MMP8 e OPG mais evidente no citoplasma e núcleo das células epiteliais e mesenquimais do COG (G e J) e QO (H e K).....**43**

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Tabela 1.** Especificações dos anticorpos utilizados. Salvador/ Bahia, 2017.....**27**

**Tabela 2.** Informações clínicas das lesões odontogênicas estudadas. Salvador/ Bahia, 2017.....**30**

**Tabela 3.** Distribuição da porcentagem de expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no epitélio do CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/Bahia, 2017.....**34**

**Tabela 4.** Comparação da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no epitélio entre o CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.....**37**

**Tabela 5.** Comparação da expressão imunoistoquímica entre as proteínas estudadas no tecido conjuntivo do CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.....**39**

**Tabela 6.** Comparação da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no tecido conjuntivo entre CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.....**40**

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AM – Ameloblastoma

BMP2 - Proteína morfogenética óssea-2

CatK – Catepsina K

CD – Cisto dentífero

COG – Cisto odontogênico glandular

CSF-1 - Fator estimulador de colônia 1

cm – centímetros

CR – Cisto radicular

CRR – Cisto radicular residual

DAB - Diaminobenzidina

FD – Folículo dentário

FOUFBA – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

HRP – Horseradish peroxidase (Peróxidase de rábano)

HE – Hematoxilina eosina

LCCG – Lesão central de células gigantes

LSAB - Labelled Streptavidin Biotin (Estreptoavidina-biotina marcada)

µm – micrometros

MMP – Metaloproteinase da matriz

mm – milímetros

Min - Minuto

ODN – Odenacatib

OPG – Osteoprotegerina

OPGL – Ligante da osteoprotegerina

ODF – Fator de diferenciação dos osteoclastos

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial hidrogeniônico

PTHrP - Hormônio da paratireoide

OMS – Organização mundial da saúde

QO – Queratocisto odontogênico

RANK - Receptor Ativador do Fator Nuclear  $\kappa\beta$

RANKL - Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear  $\kappa\beta$

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

TNF – Fator de necrose tumoral

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

## **RESUMO**

Os cistos e tumores odontogênicos apresentam evolução e comportamento biológicos variados relacionados ao potencial de reabsorção óssea destas lesões. A atividade osteolítica de uma lesão está associada diretamente ao seu crescimento e agressividade, existindo proteínas expressas por células epiteliais e mesenquimais que influenciam este evento biológico. O objetivo deste estudo foi investigar e comparar a expressão imunohistoquímica de fatores estimuladores, RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kB), CatK (Catepsina K), MMP8 (Metaloproteinase da matriz 8) e inibidor, OPG (Osteoprotegerina) da osteoclastogênese em lesões odontogênicas císticas e tumorais. Foram avaliadas 59 lesões odontogênicas, sendo 9 cistos dentígeros (CD), 9 cistos odontogênicos glandulares (COG), 20 queratocistos odontogênicos (QO), 21 ameloblastomas (AM) e 4 folículos dentários (FD), que serviram como controle. Cortes parafinados foram obtidos e submetidos à imunohistoquímica pela técnica da imunoperoxidase. As proteínas estudadas mostraram imunoposição nas células epiteliais e mesenquimais das lesões estudadas. No CD e FD foi observada maior expressão da OPG e MMP8 em relação aos outros marcadores ( $p < 0,005$ ). No COG, QO e AM foram encontradas as maiores expressões de RANKL e CatK ( $p < 0,005$ ). Ademais, foi observada uma correlação entre a maior expressão da OPG e os AMs de menor tamanho. Este estudo demonstrou que fatores que inibem e estimulam a reabsorção óssea têm participação diferencial no desenvolvimento do CD, COG, QO e AM, com maior expressão do RANKL e CatK nas lesões consideradas mais agressivas. A OPG parece ser uma das moléculas relacionadas ao menor crescimento das lesões.

**PALAVRAS-CHAVE:** reabsorção óssea, ameloblastoma, imuno-histoquímica.

## **ABSTRACT**

Odontogenic cysts and tumors present a varied evolution and biological behavior related to the bone resorption potential of these lesions. The osteolytic activity of an injury is directly associated with its growth and aggressiveness, and there are proteins expressed by epithelial and mesenchymal cells that influence this biological event. The aim of this study was to investigate and compare the immunohistochemical expression of stimulatory factors, RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), CatK (Cathepsin K), MMP8 (matrix metalloproteinase-8) and factors that inhibit osteoclastogenesis, OPG (osteoprotegerin), in odontogenic cysts and tumours. Fifty-nine odontogenic lesions were evaluated, being 9 dentigerous cysts (DC), 9 glandular odontogenic cysts (GOC), 20 odontogenic keratocysts (OK), 21 ameloblastomas (AM) and 4 dental follicles (DF), which served as controls. Paraffin-shaped sections were obtained and submitted to immunohistochemistry using the immunoperoxidase technique. The proteins studied showed immunoexpression in the epithelial and mesenchymal cells of the studied lesions. In DC and DF higher expression of OPG and MMP8 was observed in relation to the other markers ( $p < 0.005$ ). In GOC, OK and AM, the highest expressions of RANKL and CatK ( $p < 0.005$ ) were found. In addition, a correlation was observed between the greater expression of the OPG and the smaller AMs. This study demonstrated that factors that inhibit and stimulate bone resorption have a differential participation in the development of DC, GOC, OK and AM, with greater expression of RANKL and CatK in the lesions considered more aggressive. OPG appears to be one of the molecules related for the slower growth of the lesions.

**KEYWORDS:** bone resorption, ameloblastoma, immunohistochemistry

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a progressão de cistos e tumores odontogênicos estão relacionados a alguns eventos biológicos que afetam a atividade osteolítica, a proliferação celular e a degradação da matriz extracelular (MATOS *et al.*, 2013). A expressão de fatores estimuladores e inibidores da reabsorção óssea têm sido correlacionados ao variável comportamento biológico das lesões odontogênicas (OMAR *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016).

O cisto dentífero (CD) é o cisto odontogênico do desenvolvimento mais comum, possui patogênese desconhecida e acredita-se que o seu desenvolvimento esteja relacionado ao acúmulo de fluido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e a superfície da coroa dentária. Ele caracteriza-se por seu comportamento indolente e rara recorrência após remoção cirúrgica (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015; KOUHSOLTANI *et al.*, 2015). O cisto odontogênico glandular (COG) é uma rara apresentação de um cisto odontogênico do desenvolvimento, conhecido pelo seu crescimento, por vezes, agressivo e altas taxas de recorrência (FAISAL, AHMAD E ANSARI, 2015; BULUT *et al.*, 2016). O queratocisto odontogênico (QO) também é conhecido por seu crescimento agressivo e altas taxas de recorrência, especialmente em comparação com outros cistos odontogênicos, merecendo uma atenção especial quanto às suas características clínicas e histopatológicas (POGREL, 2015; LEUNG *et al.*, 2016). O ameloblastoma (AM) é um tumor odontogênico epitelial benigno que exhibe marcado potencial infiltrativo, conhecido por ser localmente agressivo e com histórico de altas taxas de recorrência, apesar de seu crescimento lento, o que o torna alvo de numerosas investigações (BANSAL *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016).

Fatores relacionados aos componentes epiteliais e mesenquimais participam da regulação do crescimento das lesões odontogênicas (MORAES *et al.* 2011). Dentre eles, a expressão alterada de proteínas que participam da atividade osteolítica associada à atuação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) podem influenciar o comportamento dessas lesões (SILVA *et al.* 2008). De fato, o fator determinante para expansão dessas lesões é a reabsorção dos ossos gnáticos, a qual é mediada por osteoclastos, MMPs e citocinas (SILVA *et al.* 2008, MORAES *et al.* 2011).

O equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea é encontrado em processos fisiológicos, para manutenção da integridade estrutural deste tecido. A reabsorção óssea é o maior evento biológico responsável pela progressão e agressividade dessas lesões e depende da formação e ativação de osteoclastos. A literatura demonstra que diversos fatores proteicos participam da regulação do metabolismo ósseo, ativando ou inativando osteoblastos e osteoclastos (CHEN *et al.*, 2014; GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014; SUN *et al.*, 2015). Uma nova perspectiva sobre a biologia da remodelação óssea surgiu com a identificação da tríade: Receptor Ativador do Fator Nuclear  $\kappa\beta$  (RANK), seu ligante RANKL e osteoprotegerina (OPG). Além da participação de outras moléculas, que contribuem com a degradação da matriz orgânica e /ou inorgânica do tecido ósseo, favorecendo o processo de osteoclastogênese (HUA *et al.*, 2015; GUHA *et al.*, 2016).

O RANK e RANKL têm sido associados a maior atividade osteolítica, sendo considerados fatores estimuladores da reabsorção óssea (DUTRA *et al.*, 2016). Por outro lado, a OPG demonstra efeito contrário, sendo conhecida como molécula inibidora da osteoclastogênese (RECHENBERG *et al.*, 2014). A razão entre RANK/RANKL/OPG tem sido correlacionada ao desenvolvimento dessas lesões odontogênicas (GAO *et al.*, 2013). A Catepsina K (CatK) e a MMP8, são importantes proteases que participam da degradação dos componentes proteicos da matriz óssea e a ação dessas moléculas associada à tríade pode potencializar a perda óssea e crescimento das lesões odontogênicas (GAO *et al.*, 2013; OMAR *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016).

Maiores expressões do RANKL são esperadas em lesões odontogênicas consideradas mais agressivas, como AM, QO, COG, quando comparadas às lesões menos agressivas, como CD, onde são observados maiores índices de expressão imunoistoquímica de OPG (TEKKESIN, MUTLU e OLGAC, 2011; MATOS *et al.*, 2013). A participação da CatK e da MMP8 no desenvolvimento das lesões odontogênicas é pouco abordada na literatura, podendo estes marcadores contribuir com a elucidação do comportamento biológicos das lesões.

Com base na premissa de que os fatores estimuladores e inibidores da osteoclastogênese podem determinar o crescimento e expansão das lesões odontogênicas intra-ósseas, este estudo comparou a expressão protéica do RANKL, CatK, MMP8 e OPG entre CD, COG, QO e AM.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LESÕES ODONTOGÊNICAS

#### 2.1.1 Cisto Dentífero (CD)

O cisto dentífero (CD) é o cisto odontogênico do desenvolvimento mais comum e está associado à coroa de um dente não erupcionado e/ou impactado. Representa 20% do total de cistos que acomete os maxilares (CONTAR *et al.*, 2015). A patogênese desta lesão é desconhecida e acredita-se que o seu desenvolvimento esteja relacionado ao acúmulo de fluido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e a superfície da coroa dentária (JAYAM *et al.*, 2014; DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015; KOUHSOLTANI *et al.*, 2015).

Acomete mais a região de terceiros molares em mandíbula, podendo se manifestar em outras regiões dos maxilares. Essa lesão pode ocorrer ao redor de dentes supranumerários e em associação com odontomas (KOUHSOLTANI *et al.*, 2015). Podem ser observados com maior frequência entre a primeira e terceira décadas de vida (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015). Existe uma leve predileção no gênero masculino (CONTAR *et al.*, 2015).

O CD é normalmente assintomático e se desenvolve em algumas situações por anos sem ser percebido, até que ocorra uma infecção secundária. Deve-se examinar ausências dentárias e/ou áreas com tumefações ósseas (JAYAM *et al.*, 2014). Com o estímulo de crescimento contínuo esta lesão pode atingir grandes dimensões, resultando em expansão de corticais ósseas e assimetrias faciais (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015; KOUHSOLTANI *et al.*, 2015).

Radiograficamente, o CD se apresenta como uma lesão radiolúcida unilocular, bem delimitada e com bordas escleróticas, circundando a coroa de um dente não irrompido e/ou impactado (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015; KOUHSOLTANI *et al.*, 2015). Quando um folículo dentário se apresentar radiograficamente maior que 5 mm pode existir a suspeita diagnóstica de CD (CONTAR *et al.*, 2015). Três variantes do CD são descritos radiograficamente: central (a cápsula cística circunda a coroa do dente, com a coroa se projetando para o interior do lúmen), Lateral (o cisto se desenvolve lateralmente ao longo da raiz do dente), Circunferencial (quando a cápsula

cística circunda a coroa, mas também se estende na superfície da raiz) (JAYAM *et al.*, 2014).

O exame histopatológico do CD pode variar, dependendo, principalmente, do fato de o cisto estar ou não inflamado. No CD não inflamado nota-se um delgado revestimento de epitélio escamoso estratificado não queratinizado, interface plana com a cápsula, podendo apresentar células de aspecto claro delimitando o lúmen cístico. A cápsula exhibe tecido conjuntivo fibroso, podendo conter algumas ilhotas inativas de epitélio odontogênico (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015). No CD inflamado, o epitélio usualmente demonstra hiperplasia e a cápsula fibrosa do cisto apresenta um infiltrado inflamatório (CONTAR *et al.*, 2015; KOUHSOLTANI *et al.*, 2015).

Diferentes opções de tratamento para o CD podem ser consideradas, avaliando a possibilidade de manutenção ou não do dente envolvido pela lesão. A enucleação cística com a remoção dentária é a mais utilizada e a que apresenta a menor taxa de recorrência (JAYAM *et al.*, 2014). Diante de grandes dimensões, pode-se lançar mão da marsupialização, a fim de descomprimir a pressão osmótica cística, induzindo em algumas situações a erupção do dente associado à lesão, e posterior enucleação capsular (CONTAR *et al.*, 2015; DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015).

### **2.1.2 Cisto Odontogênico Glandular (COG)**

O cisto odontogênico glandular (COG) é uma rara apresentação de um cisto odontogênico do desenvolvimento. Reconhecido, inicialmente, como cisto sialo-odontogênico, posteriormente foi classificado pela OMS como COG, devido às suas características histopatológicas específicas (MORAIS *et al.*, 2012; CANO *et al.*, 2012; STOELINGA, 2012; AKKAS *et al.*, 2015; FAISAL, AHMAD E ANSARI, 2015; BULUT *et al.*, 2016; CHANDRA *et al.*, 2016; GURUPRASAD and CHAUHAN, 2016).

O correto diagnóstico do COG é muito importante, devido a dois grandes atributos clínicos desta lesão: seu potencial de agressividade e altas taxas de recorrência (CANO *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; STOELINGA, 2012; TAMBAWALA *et al.*, 2014; BULUT *et al.*, 2016).

O COG se desenvolve em uma ampla faixa etária, com maior apresentação nas quartas e quintas décadas de vida. Existe uma predileção pelo gênero masculino. Pode

se desenvolver tanto na maxila quanto na mandíbula, sendo a região anterior da mandíbula a mais acometida, podendo cruzar a linha média (MORAIS *et al.*, 2012; STOELINGA, 2012; TAMBAWALA *et al.*, 2014; AKKAS *et al.*, 2015; FAISAL, AHMAD E ANSARI, 2015; BULUT *et al.*, 2016; CHANDRA *et al.*, 2016; GURUPRASAD and CHAUHAN, 2016).

Pacientes acometidos pelo COG podem apresentar dor, edema e/ou parestesia, porém, em algumas situações as lesões de menores dimensões podem ser assintomáticas, sendo descobertas em exames radiográficos de rotina (STOELINGA, 2012). Crescimento lento intraósseo e com expansão das corticais é uma característica comum ao COG (AKKAS *et al.*, 2015; BULUT *et al.*, 2016). Apresenta-se radiograficamente com bordas escleróticas bem delimitadas, de aspecto radiolúcido uni ou multilocular, contornando as raízes dentárias e basilares ósseas em algumas situações. Pode-se observar também perfuração de corticais ósseas (GURUPRASAD e CHAUHAN, 2016). Quando associado a dentes inclusos e/ou impactados, a reabsorção e o deslocamento dentário pode ser comum (MORAIS *et al.*, 2012; TAMBAWALA *et al.*, 2014).

O COG não possui achados clínicoradiográficos específicos, sendo por vezes difícil realizar um diagnóstico diferencial clínico com a lesão central de células gigantes, cisto odontogênico botrióide e ameloblastoma (STOELINGA, 2012; AKKAS *et al.*, 2015). Aspectos microscópicos também são compartilhados com algumas lesões, tais como cisto periodontal lateral, cisto odontogênico botrióide e carcinoma mucoepidermóide de baixo grau, existindo algumas características que favorecem mais o COG (CANO *et al.*, 2012; FAISAL, AHMAD E ANSARI, 2015; BULUT *et al.*, 2016).

As características morfológicas do COG sugerem a sua origem dos remanescentes da lâmina dentária (FAISAL, AHMAD e ANSARI, 2015; GURUPRASAD e CHAUHAN, 2016). Esta lesão exibe revestimento epitelial estratificado, com variações na sua espessura, cujas células superficiais tendem a ser cúbicas ou colunares, por vezes ciliadas. Podem ser identificados, no revestimento epitelial, espessamentos focais com células claras, projeções papilares, estruturas ductiformes, espaços microcísticos, células cuboidais eosinofílicas, bem como células

mucosas, ora dispostas em pequenas criptas ora circunscrevendo coleções de muco (MORAIS *et al.*, 2012; TAMBAWALA *et al.*, 2014; BULUT *et al.*, 2016).

Os tratamentos do COG incluem curetagem, enucleação, ostectomia periférica, porém, algumas vertentes preferem a ressecção com margem de segurança, devido às altas taxas de recorrência pós-curetagem e enucleação (MORAIS *et al.*, 2012; TAMBAWALA *et al.*, 2014; BULUT *et al.*, 2016).

### **2.1.3 Queratocisto Odontogênico (QO)**

O queratocisto odontogênico (QO) é uma das mais frequentes lesões císticas potencialmente agressivas, merecendo uma atenção especial quanto às suas características clínicas e histopatológicas (STOELINGA, 2012; POGREL, 2015; LEUNG *et al.*, 2016). Acredita-se que sua origem seja a partir dos restos de lâmina dentária ou de células basais do epitélio bucal (STOELINGA, 2012; LEUNG *et al.*, 2016).

O QO vinha sendo classificado como tumor odontogênico queratocístico, desde a publicação da 3ª edição da OMS em 2005, em função de seu comportamento biológico agressivo e devido às evidências científicas acumuladas ao longo dos anos, as quais demonstraram comportamento clínico agressivo, presença de alterações histopatológicas e moleculares, semelhante às encontradas em lesões tumorais (POGREL, 2015; LEUNG *et al.*, 2016). Recentemente, o QO foi novamente inserido na classificação dos cistos odontogênicos do desenvolvimento na 4ª edição da OMS publicada em janeiro de 2017 (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Fatores relacionados ao componente epitelial e mesenquimal podem determinar diferenças no grau de agressividade de algumas lesões. O potencial de crescimento, invasão e destruição do QO pode ser influenciado pela expressão alterada de proteínas pelas células epiteliais, mesenquimais e ainda por alterações dos componentes da matriz extracelular destas lesões (HENRIQUES *et al.*, 2011).

O QO pode acometer pacientes em qualquer fase da vida, sendo mais comum em indivíduos entre 10 e 40 anos de idade (STOELINGA, 2012; LEUNG *et al.*, 2016). A região posterior da mandíbula, corpo e ramo ascendente são os locais mais comuns de desenvolvimento da lesão. Quando localizado em mandíbula, há uma tendência de o

tumor atingir dimensões maiores. Existe uma leve predileção pelo gênero masculino (BARNES, 2005; STOELINGA, 2012).

A sintomatologia apresenta variações, que estão associadas ao tamanho da lesão. Os menores normalmente são assintomáticos, sendo descobertas em radiografias de rotina, enquanto as lesões maiores podem ocasionar algum incômodo (dor, tumefação ou drenagem). Todavia, pode ocorrer uma lesão extremamente grande e que seja assintomática (BARNES, 2005; STOELINGA, 2012). Múltiplos QO podem estar presentes em um mesmo paciente, devendo este ser avaliado para outras manifestações como a síndrome do carcinoma nevíide basocelular (Síndrome de Gorlin) (HASHMI *et al.*, 2016; LEUNG *et al.*, 2016).

Ao exame radiográfico, o QO aparece como área radiolúcida uni ou multilocular, com bordas bem definidas (PROBST *et al.*, 2016). Por possuir uma característica de crescimento medular em direção anteroposterior, em algumas situações, extensos QO podem não apresentar grandes expansões de corticais ósseas. Apesar dos aspectos radiográficos serem sugestivos, não são suficientes para o diagnóstico por conta da possibilidade de simular, por exemplo, cisto dentígero, cisto radicular, ameloblastoma, dentre outras lesões. Dessa forma, a análise histopatológica é fundamental no processo de construção do diagnóstico (BARNES, 2005; STOELINGA, 2012).

O QO apresenta características histopatológicas específicas. A cavidade cística é revestida por epitélio escamoso estratificado, em geral com seis a oito camadas de espessura, com camada corrugada de paraqueratina. As células da camada basal apresentam polaridade nuclear invertida e seus núcleos são hiper cromáticos. Não há a presença de cristas epiteliais na interface com o tecido conjuntivo. A cápsula é fina e friável, podendo ser observado no transoperatório. Cordões de células ou pequenos cistos satélites podem estar na cápsula fibrosa. Havendo a presença de inflamação, essas características podem sofrer alteração: revestimento luminal pode desaparecer, o epitélio pode proliferar formando projeções e alterando a característica da camada basal, antes em paliçada. No lúmen, encontra-se um líquido claro ou material caseoso (restos de queratina) (BARNES, 2005; STOELINGA, 2012; POGREL, 2015).

O tratamento de escolha para o QO é a enucleação e curetagem. A remoção inteira pode ser complicada, uma vez que a cápsula é fina e friável. A recorrência é

frequente. A fim de reduzir essa recorrência, muitos cirurgiões indicam ostectomia periférica da cavidade óssea, cauterização química e/ou crioterapia da cavidade após a remoção do tumor. Em algumas reabordagens cirúrgicas do QO devido às recorrências, deve-se pensar em um tratamento mais radical com ressecção com margens de segurança. O prognóstico para essas lesões, no geral, é bom. Cinco anos de acompanhamento, no mínimo, é recomendado para avaliar possíveis recorrências. Raros casos de carcinoma se desenvolveram nesses tumores (POGREL, 2015; LEUNG *et al.*, 2016).

#### **2.1.4 Ameloblastoma (AM)**

O ameloblastoma é o segundo tumor odontogênico benigno mais comum, conhecido por ser localmente agressivo, devido ao seu potencial de crescimento, invasão e destruição óssea, apesar do crescimento lento e contínuo, que o torna alvo de numerosas investigações. Esta lesão tem histogênese a partir de remanescentes da lâmina dentária, do órgão do esmalte em desenvolvimento, do revestimento epitelial de um cisto odontogênico ou das células da camada basal da mucosa bucal (CHAE *et al.*, 2014; JHAMB e KRAMER, 2014; ROSA *et al.*, 2014; BANSAL *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016).

O crescimento tumoral do ameloblastoma parece ser regulado por uma série de interações entre as células neoplásicas e do estroma, que podem influenciar direta ou indiretamente o comportamento biológico desta lesão. A regulação dos eventos de proliferação, invasão e reabsorção óssea, através da expressão e liberação de proteínas pelas células epiteliais e estromais são alguns dos mecanismos envolvidos nesse processo (JHAMB e KRAMER, 2014; ROSA *et al.*, 2014).

Quatro variantes clinicoradiográficas distintas do ameloblastoma são reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde em 2017: ameloblastoma, ameloblastoma unicístico, ameloblastoma periférico e ameloblastoma metastizante (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A variante ameloblastoma é a mais comumente observada, representando cerca de 90% (CHAE *et al.*, 2014; MILMAN *et al.*, 2016).

Uma ampla faixa etária pode ser acometida pelo ameloblastoma, sendo raro em crianças menores de 10 anos e relativamente incomum na faixa entre 10 e 19 anos, apresentando prevalência aproximadamente igual entre a terceira e sétima década de vida, sem haver predileção por sexo. Quanto à localização anatômica preferencial,

aproximadamente 85% dos ameloblastomas acometem a mandíbula, particularmente na região dos molares e do ramo ascendente, seguida por 15 % dos casos que ocorrem na maxila, também nas regiões posteriores (BANSAL *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016).

Barnes *et al.* (2005) relataram que frequentemente o tumor é assintomático e lesões menores apenas são detectadas durante um exame radiográfico de rotina. Apresentam tumefação indolor e/ou expansão das corticais ósseas como manifestações clínicas comuns. A dor e a parestesia são raras mesmo em tumores grandes. O comportamento do ameloblastoma tende a ser bastante agressivo nas recidivas, com maior potencial de invasão e destruição óssea do que a lesão primária. É importante ressaltar também a capacidade do ameloblastoma de desenvolver recidivas tardias. A forma localmente agressiva e as formas recidivantes podem ter aspectos semelhantes aos das neoplasias malignas.

No aspecto radiográfico, a lesão pode apresentar-se com área radiolúcida uni ou multilocular, com expansão das corticais ósseas, podendo existir perfuração óssea e invasão aos tecidos moles adjacentes. A perda da lâmina dura, a reabsorção e erosão das raízes dentárias, além de deslocamento de dentes adjacentes ao tumor também são relatados (MILMAN *et al.*, 2016). Esse comportamento pode ser explicado pelo crescimento padrão desses tumores, que caracteristicamente infiltram-se nos espaços medulares da periferia do tumor (JHAMB e KRAMER, 2014).

Microscopicamente, os ameloblastomas podem exibir arranjos histopatológicos distintos, que incluem o padrão acantomatoso, de células granulares, células basais, desmoplásico, plexiforme e folicular (EL-NAGGAR *et al.*, 2017), sendo os dois últimos de maiores ocorrências. No entanto, estes aspectos microscópicos têm pouco significado no comportamento do tumor e podem aparecer isoladamente ou apresentarem combinações em uma lesão de maiores dimensões (JHAMB e KRAMER, 2014; CHAE *et al.*, 2014).

O padrão folicular é o mais comum e reconhecível, consistindo de ilhotas de epitélio odontogênico que lembram o epitélio do órgão do esmalte em meio a um estroma de tecido conjuntivo fibroso maduro. Tipicamente, as células basais dessas ilhotas são cilíndricas, hipercromáticas, alinhadas em paliçada, com o núcleo no polo oposto à membrana basal (polaridade invertida), semelhante aos ameloblastos. Ao centro, as células podem se apresentar frouxamente arranjadas, lembrando o retículo

estrelado do órgão do esmalte. Geralmente, essas áreas tornam-se císticas e, por vezes, chegam a confluir (CHAE *et al.*, 2014). No padrão plexiforme as células epiteliais encontram-se arranjadas em feixes anastomosados com a caracterização das células basais, bem como o aspecto de retículo estrelado inconspícuo. Usualmente, o estroma é delicado, muitas vezes exibindo degeneração cística (JHAMB e KRAMER, 2014). Em ambos os padrões histológicos, a atividade mitótica e o pleomorfismo celular são raras vezes notados (BARNES *et al.*, 2005).

Extensas áreas de metaplasia escamosa podem ser observadas no componente epitelial, caracterizando o padrão acantomatoso, quando é predominante no parênquima tumoral. A presença de células de citoplasma abundante, preenchido por numerosos grânulos eosinofílicos remete ao ameloblastoma de células granulares. Ademais, em alguns casos, as ilhas tumorais são constituídas por células basalóides uniformes (ameloblastoma de células basais), sem apresentar áreas semelhantes ao retículo estrelado e com inconspícua paliçada nuclear nas células da periferia. O tipo desmoplásico contém pequenas ilhas e cordões estreitos de epitélio odontogênico em um estroma densamente colagenizado, exibindo graus de desmoplasia (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

No que se refere às modalidades terapêuticas indicadas para o ameloblastoma, há uma gama de tratamentos que variam desde curetagem a ressecção em bloco com margem de segurança (BANSAL *et al.*, 2015). A escolha do método mais eficaz vem sendo motivo de controvérsias há vários anos. A verdadeira margem do tumor muitas vezes se estende além da aparente margem clínica ou radiográfica e a tentativa de remover o tumor por curetagem deixa pequenas ilhas do tumor no osso, o que mais tarde se manifesta como recorrências. A forma de tratamento mais utilizada é a ressecção marginal ou em bloco, embora também apresente uma taxa de recorrência de 15% (MILMAN *et al.*, 2016). A margem da ressecção deve ser de pelo menos 1.0 cm além dos limites radiográficos do tumor. As lesões que envolvem ossos da maxila demonstram o pior prognóstico devido à dificuldade de obtenção da margem cirúrgica de segurança e delimitação do tumor (BARNES *et al.*, 2005; MILMAN *et al.*, 2016).



## 2.2 FATORES OSTEOCLASTOGÊNICOS

A reabsorção óssea é um dos eventos biológicos responsáveis pelas diferenças no comportamento biológico das lesões odontogênicas. Quanto maior a atividade osteolítica que ocorre em uma lesão, maior o seu potencial de crescimento e agressividade (MATOS *et al.*, 2013). A literatura demonstra que diversos fatores proteicos participam da regulação do metabolismo ósseo, ativando ou inativando osteoblastos e osteoclastos (CHEN *et al.*, 2014; GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014; SUN *et al.*, 2015). Outras moléculas contribuem com a degradação da matriz orgânica e /ou inorgânica do tecido ósseo, favorecendo o processo de osteoclastogênese (HUA *et al.*, 2015; GUHA *et al.*, 2016). Dentre estas moléculas, se destacam a tríade RANK/RANKL/OPG que são reconhecidas como reguladoras centrais do processo de diferenciação dos osteoclastos (KOBAYASHI *et al.*, 2009 ;LIU *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2015); a CatK e a MMP8, são proteases que participam da degradação dos componentes proteicos da matriz óssea (GAO *et al.*, 2013; OMAR *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016).

### 2.2.1 Sistema RANK/RANKL/ OPG

O processo de reabsorção óssea é coordenado pela ação de receptores e ligantes relacionados à grande família TNF (Fator de Necrose Tumoral), representados pelas proteínas RANK, seu ligante RANKL e OPG (RECHENBERG *et al.*, 2014). A tríade RANK/RANKL/OPG é representada por moléculas chaves reguladoras do processo de remodelação óssea e são essenciais no desenvolvimento e ativação do processo de osteoclastogênese, tendo papel decisivo no equilíbrio entre reabsorção e formação óssea (RONG *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015; ; GONG *et al.*, 2016).

O RANK é uma proteína com 616 aminoácidos, sendo expressa pelo gene TNFRSF11a, encontrado na membrana de células precursoras dos osteoclastos e quando ativadas, promovem e orientam a diferenciação destes, aumentando sua atividade celular, como também retardando o seu processo de apoptose (TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011; GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014).

O RANKL também conhecido como OPGL (ligante da osteoprotegerina) ou ODF (fator de diferenciação dos osteoclastos) é uma proteína codificada pelo gene TNFSF11 com 317 aminoácidos, se apresentando em duas formas: ligada a membrana (a mais comum), com 40-45 kDa e a forma solúvel, com 31kDa (CHEN *et al.*, 2014; GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014; GONG *et al.*, 2016). Ele foi descoberto em 1998, sendo considerada a mais importante citocina, atuando como indutor fisiológico da osteoclastogênese, onde se liga diretamente ao RANK na superfície celular dos pré-osteoclastos e osteoclastos. Ao ativar o RANK, participa ativamente no processo de maturação e desenvolvimento de células osteoclásticas (TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011; RECHENBERG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2015). O RANKL é expresso por osteoblastos, fibroblastos, linfócitos T e B e macrófagos (GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014; SIAR *et al.*, 2015; GONG *et al.*, 2016). Segundo Honma *et al.* (2014) estudos recentes sugerem que os osteócitos são fonte principal de RANKL em processos patológicos e fisiológicos da osteoclastogênese. Osteócitos irão fornecer RANKL aos precursores de osteoclastos através de interação direta de suas extremidades dendríticas. Em contrapartida, o papel de RANKL com os osteoblastos ainda não está claro e precisa ser elucidada.

Osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel, representada por 380 aminoácidos, expressa pelo gene TNFRSF11b. Ela funciona como receptor e tem propriedades antagônicas ao RANKL, pois, age como inibidor ao interagir com alta afinidade com o RANKL, impedindo sua ligação ao RANK, levando assim, a diminuição da osteoclastogênese (TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011; GUERRINI e TAKAYANAGI, 2014). Como o RANKL, a OPG é modulada por citocinas inflamatórias. A OPG é expressa por osteoblastos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais (TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011; SUN *et al.*, 2015; SIAR *et al.*, 2015).

Desequilíbrios na proporção RANKL/OPG constituem a base de diversas patologias, locais ou sistêmicas, que se caracterizam pela reabsorção do tecido ósseo (MATOS *et al.*, 2013). Alterações na expressão de RANKL e OPG, decorrentes de um aumento nos níveis de RANKL e/ou de uma diminuição nos níveis de OPG, podem resultar no estímulo da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, a reabsorção óssea. (SARA *et al.*, 2006; MATOS *et al.*, 2013)

Pesquisas preliminares demonstraram que a razão entre RANKL/OPG e entre outros mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios determinam a estabilização ou progressão das lesões inflamatórias crônicas, sendo a patogenicidade delas influenciadas também por várias outras citocinas (GRAVES, OATES e GARTLET, 2011; ARAÚJO-PIRES *et al.*, 2014; SIAR *et al.*, 2015). Pode-se observar que a progressão da artrite reumatoide esta ligada também à desregulação das proporções RANKL/OPG, sendo observados nos casos mais avançados, maiores expressões do RANKL (LIU *et al.*, 2015). Menezes *et al.* (2006) em um estudo com humanos constataram que o aumento da razão RANKL/OPG está diretamente relacionado ao processo de destruição óssea em cistos e granulomas periapicais. Demonstraram, ainda, que há expressão de RANK, RANKL e OPG no epitélio de revestimento da parede de cistos odontogênicos, incluindo os cistos radiculares.

Diversos distúrbios metabólicos ósseos podem se manifestar com os desequilíbrios decorrentes de uma maior expressão de RANKL. A expressão dessas moléculas tem sido investigada em cistos e tumores odontogênicos (TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011). Lesões consideradas mais agressivas, como AM, QO, COG, normalmente expressam o fator RANKL em maiores proporções quando comparadas às lesões menos agressivas, como CD e cisto radicular (MATOS *et al.*, 2013). Potenciais de agressividade distintos podem variar em uma mesma lesão, sendo explicado em muitas situações pelas variadas manifestações da tríade RANK/RANKL/OPG (SUN *et al.*, 2015). O AM e QO tendem a expressar mais RANKL que OPG, quando comparadas ao CD, por exemplo (SARA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; SIAR *et al.*, 2015).

De acordo com os resultados de Siar *et al.* (2015), em tumores primários de AM tendem a exibir uma proporcionalidade entre RANKL/ OPG, já em lesões recorrentes nota-se maiores expressões do RANKL. Muitos mediadores envolvidos na osteoclastogênese foram identificados no AM e QO, como o TNF alfa, Interleucinas 1-alfa e 1- beta, interleucina-6, prostaglandinas, que podem influenciar a regulação dos níveis do RANK/ RANKL/OPG (SILVA *et al.*, 2008; TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011).

Moraes *et al.* (2011) desenvolveram um estudo para avaliar a participação dos fatores osteoclastogênicos, RANK, RANKL e OPG, na expansão de cistos

odontogênicos. Foram realizadas análises imunoistoquímicas destes fatores tanto no epitélio como na cápsula fibrosa em 40 cistos (20 cistos inflamatórios e 20 cistos dentígeros). Os resultados sugeriram que a relação entre RANKL e OPG na cápsula cística estava associada com as diferentes etapas de progressão da lesão. Houve casos que pareceu haver equilíbrio homeostático ( $OPG=RANKL$ ) e alguns casos onde houve mínima atividade osteoclástica ( $OPG >RANKL$ ). Estes autores acreditam que a relação entre RANKL/OPG seria mais desfavorável, com maiores índices do RANKL no início da formação da cavidade cística. Por outro lado, no epitélio, houve aumento da concentração de OPG comparada a de RANKL, que segundo estes autores, a OPG teria a função de criar uma barreira contra a expansão cística.

Matos *et al.* (2013) realizaram uma comparação da expressão imunoistoquímica do RANKL e da OPG em cistos radiculares, CD, AM e QO. Foram obtidos maiores resultados na expressão do RANKL comparados a OPG nos AM e QO, já a maior proporção de OPG foi detectada no CD. Com estes resultados pôde-se concluir que os níveis de RANKL e OPG estão diretamente relacionados ao comportamento biológico dos cistos e tumores odontogênicos.

Tekkesin, Mutlu e Oglac (2011) avaliaram a evolução da expressão imunoistoquímica de moléculas envolvidas na osteoclastogênese, RANK, RANKL e OPG, em QO, comparando com os cistos radiculares e AM. A maior expressão do RANK foi observada no QO, seguido do AM, com a menor expressão nos cistos radiculares. O RANKL foi observado em todas as lesões, sem diferenças significativas entre elas. A expressão de OPG foi muito baixa em todos os grupos de lesões. A tríade RANK, RANKL e OPG apresentou uma variabilidade de expressões entre os grupos das lesões estudadas e parecem estar envolvidos no mecanismo de osteoclastogênese, principalmente em QO e AM.

De acordo com os estudos de Sun *et al.* (2015), foram avaliados os níveis de RANKL e OPG em folículos dentais humanos, juntamente com alguns fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea-2 (rh-BMP2), a proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (PTHrP) e o fator estimulador de colônia 1 (CSF-1). Foram observados, através do método da imunoistoquímica e da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa, que os fatores de crescimento estudados influenciam na regulação do sistema biológico RANK, RANK/L e OPG. PTHrP e CSF-1 regulam

similarmente a elevação do RANKL e a diminuição do OPG, já a rh-BMP2 trabalha de forma oposta.

A descoberta e a avaliação dos níveis de RANK/RANKL/OPG são importantes para explicações biológicas mais precisas na patogênese da perda óssea. Desta forma, medicações que inibam o RANKL ou que aumentem os níveis de OPG estão sendo estudadas e desenvolvidas no auxílio do controle da reabsorção óssea. (TEKKESIN, MUTLU e OGLAC, 2011). Moléculas inibidoras do RANKL, Denosumab, estão sendo aplicadas para o tratamento da osteoporose e metástases ósseas, com resultados terapêuticos positivos (GONG *et al.*, 2016).

### 2.2.2 Catepsina K (CatK)

A CatK é uma abundante proteinase cisteína lisossômica, da família da papaína, envolvida na solubilização da matriz óssea (BITU *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2014). Ela é expressa seletivamente pelos osteoclastos e é ativa em pH ácido, o que a torna ideal para a degradação do colágeno presente no compartimento formado entre os osteoclastos e a superfície óssea, a chamada lacuna de reabsorção (AGUDA *et al.*, 2014; HUA *et al.*, 2015; ALAN *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2015; GUHA *et al.*, 2016).

Inicialmente a CatK é sintetizada como uma pró-enzima antes de ser transportada para os lisossomos, onde será clivada para transformar-se em enzima ativa. Ela é produzida de forma intensa pelos osteoclastos, sendo regulada pelo RANKL. O RNAm da CatK já foi encontrado em ovário, coração, pulmão, músculos e intestino (BONNEN *et al.*, 2012; DUONG, 2012; HUA *et al.*, 2015)

De um total de 11 tipos de Catepsina cisteína humana, somente a CatK exerce a atividade de clivagem da tripla hélice do colágeno tipo I. Ela é a mais secretada e importante protease capaz de desintegrar as fibras colágenas ósseas compactas (AGUDA *et al.*, 2014).

Na zona de selamento, onde ocorrerá o processo de reabsorção óssea, serão secretados prótons e enzimas lisossomais, que irão formar hemivacúolos digestivos extracelulares. Nestes hemivacúolos, os prótons irão solubilizar os componentes minerais, expondo as fibras colágenas, que correspondem a 90% da matriz óssea orgânica. Uma vez que este colágeno fique exposto, estará disponível para a degradação pela CatK, que vai degradar o colágeno tipo I (AGUDA *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2015).

Pacientes portadores de uma rara condição de osteopetrose, conhecida como picnodisostose, possuem uma deficiência na reabsorção óssea, com aumento da densidade óssea, baixa estatura e fragilidade óssea, causada por uma mutação genética da CatK (GUHA *et al.*, 2016). Notou-se que apesar da reabsorção óssea está deficiente em altas expressões de CatK, a formação óssea se mantém ativa e algumas vezes aumentada. Alta atividade de CatK em humanos pode está associada à osteoporose, artrites, tumores malignos ósseos e à progressão de metástases tumorais (BITU *et al.*, 2013; AGUDA *et al.*, 2014).

O papel osteoclástico da CatK é importante para entendimento sobre a reabsorção óssea e diferenciação celular. Esta protease tem sido um atrativo alvo terapêutico para inibição da reabsorção óssea (AGUDA *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2015; GUHA *et al.*, 2016).

Guha *et al.* (2016), elucidaram um mecanismo de ativação do gene CatK induzida por hipóxia mitocondrial. Desta forma, conseguiram demonstrar que condições de hipóxia induzem uma maior expressão de marcadores osteoclásticos como a CatK.

Em seus estudos, Hao *et al.* (2015) avaliaram fatores relacionados a artrite reumatoide e periodontite em modelos de rato. Foram observados vários fatores patológicos em comum entre essas doenças. Dentre os fatores comuns, notou-se que a deficiência genética da CatK resultou em redução da inflamação e erosão óssea, além de diminuição dos osteoclastos, macrófagos, células dendríticas e células T. Os autores concluíram que a inibição da CatK pode se tornar um alvo no tratamento da artrite reumatoide e da periodontite.

Um trabalho *in vitro*, realizado por Leung *et al.* (2011), demonstrou a importância da CatK em relação a sua ação estimuladora da reabsorção óssea. Estes autores utilizaram a Odenacatib (ODN), uma potente e seletiva medicação, utilizada em pacientes do sexo feminino, no período pós-menopausa, contra a osteoporose. Este estudo demonstrou que ODN é um inibidor importante na ação da CatK. Como conclusão, após o uso da ODN, observou-se uma seletiva ação da CatK sobre os osteoclastos, reduzindo o processo de reabsorção óssea, bloqueando a desmineralização e degradação do colágeno tipo I nas zonas de reabsorção, como também retardou a transcritose para futuros processos de degradação proteica.

A CatK também tem sido utilizada como parâmetro bioquímico na avaliação das perdas ósseas periimplantares, a partir da análise do líquido crevicular da região periimplantar (ALAN *et al.*, 2015).

Kim *et al.* (2014) avaliaram a expressão imunoistoquímica de diversos marcadores no ameloblastoma periférico e no carcinoma oral basocelular. Dentre os marcadores estudados foi obtida elevada expressão da CatK no ameloblastoma periférico, quando comparado com o carcinoma, que apresentou alta expressão de outros marcadores de agressividade, como o TNF alfa,  $\beta$ -catenina e MMPs. Os achados deste estudo sugerem que as lesões apresentam diferente tumorigênese e que biomarcadores, como a CatK, podem ser importantes para o diagnóstico diferencial entre elas.

A expressão da CatK parece ser bem elucidada em várias situações. Na osteoporose, progressão de metástases ósseas, artrite reumatoide, periodontite, são alguns exemplos que mostram uma relação direta da alta expressão desta colagenase com a progressão da doença. No entanto, sua participação em lesões odontogênicas císticas e tumorais ainda é pouco abordada na literatura, podendo ser também um importante fator elucidativo para o comportamento biológico destas lesões.

### 2.2.3 MMP8

As metaloproteinases da matriz (MMP) são proteínas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e regulam o desenvolvimento, a remodelação e a degradação dos tecidos (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015). As MMPs fazem parte da família de endopeptidases zinco dependentes, capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno e proteoglicanos (LAWAL *et al.*, 2015; OMAR *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016; THIERBACH *et al.*, 2016).

Em humanos, existe um total de 28 tipos de MMPs. Elas são classificadas em grupos de acordo com seus substratos específicos: colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), matrilisina (MMP7), estromalisinas (MMP3 e MMP10), tipo membrana (MMPs 14-17) e outras MMPs (MMP11, MMP19 e MMP20) (TSILINGARIDIS *et al.*, 2013; LAWAL *et al.*, 2015; OMAR *et al.*, 2015).

As MMPs estão associadas ao desenvolvimento de diversos processos fisiológicos e patológicos através da regulação de atividades biológicas, como a angiogênese, proliferação celular, apoptose, alteração da mobilidade celular, efeitos no sistema imune e na produção de citocinas (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; LAWAL *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016).

Sabe-se que as MMPs possuem efeitos pro e antitumorais, através da ativação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (LINDBERG *et al.*, 2013; LAWAL *et al.*, 2015; OMAR *et al.*, 2015). Importantes processos inflamatórios periodontais, pulpares e do tecido periapical parecem ter a participação das MMPs (EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015; THIERBACH *et al.*, 2016).

A MMP8 (colagenase 2) é uma das mais importantes endopeptidases capaz de degradar vários tipos de colágeno, I,II, III, V e XI. A maior degradação diz respeito ao colágeno tipo I (LINDBERG *et al.*, 2013; LAWAL *et al.*, 2015). Dentre todas as MMPs, a MMP8 parece ser a mais envolvida em processos inflamatórios periapicais e periimplantares, presente com grandes expressões nesses sítios e também em processos tumorais malignos (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015; OMAR *et al.*, 2015; THIERBACH *et al.*, 2016).

A expressão de MMP8 em células normais é baixa, contribuindo na saúde da remodelação tecidual. Em condições patológicas, porém, os níveis de expressão da MMP8 crescem consideravelmente, resultando em grande destruição tecidual (EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015; THIERBACH *et al.*, 2016). A MMP8 pode ser expressa por leucócitos polimorfonucleares (PMN), células inflamatórias associadas a tumores, células epiteliais e mesenquimais tumorais, podendo também ser encontrada na mucosa oral normal (OMAR *et al.*, 2015).

Polimorfismos genéticos em metaloproteinases têm sido associados a condições patológicas, como periodontite e periimplantite (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; THIERBACH *et al.*, 2016). Alguns polimorfismos genéticos têm sido descobertos como eventos regulatórios das MMPs, como por exemplo, o polimorfismo -799 C/T no gene da MMP8, que parece estar associado a uma maior expressão desta (EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015).



Omar *et al.* (2015), demonstraram que existe uma relação entre a expressão positiva de MMP8 com a diminuição do reparo ósseo e um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias malignas, como o carcinoma escamocelular oral e carcinomas da pele.

Costa-Junior *et al.* (2013), investigaram a frequência do polimorfismo genético da MMP8 em indivíduos com falhas em implantes dentários, buscando relacionar este polimorfismo à dificuldade na osseointegração. Com os resultados, pôde-se constatar que o polimorfismo da MMP8 é um fator de risco importante em situações de perdas de implantes dentários.

Foram avaliados nos estudos de Thierbach *et al.* (2016), os níveis de expressão da MMP8 nos fluidos do sulco periimplantar, em pacientes com quadro de periimplantite. Foram observados altos índices de expressão da MMP8, mostrando uma redução desses índices em pacientes que cursavam com tratamento e melhora do processo inflamatório. Desta forma, a MMP8 pode ser um importante marcador biológico na avaliação da saúde tecidual e cicatrização da região periimplantar.

Avaliações das expressões de MMP2 e MMP8 em carcinoma escamocelular oral foram realizadas por Lawal *et al.* (2015). Altas expressões da MMP-2 e MMP-8 foram detectadas nessas lesões. A expressão destas metaloproteinases foi sugerida como uma importante ferramenta auxiliar na determinação do prognóstico do carcinoma escamocelular oral.

O mecanismo de crescimento de cistos odontogênicos, assim como o potencial de infiltração e destruição de alguns tumores odontogênicos podem ser influenciados pela secreção das MMPs, proteínas que podem ser produzidas tanto por células epiteliais quanto por células mesenquimais. O estudo de componentes da matriz extracelular se faz necessário na identificação da distribuição e expressão dessas proteínas (MMPs). Menores expressões têm sido encontradas em cistos de crescimento lento e maiores expressões em tumores odontogênicos mais agressivos (HENRIQUES *et al.*, 2011).

Henriques *et al.* (2011), realizaram uma análise comparativa da expressão imunoistoquímica da MMP9 em cistos e tumores odontogênicos. Foram selecionados 20 casos de AM, 20 QO, 20 CD e 20 cistos radiculares para avaliar a expressão da

MMP9. Foi observada expressão da MMP9 em todas as lesões nos componentes epiteliais e mesenquimais. As maiores expressões foram observadas no AM (95%) e QO (90%), seguidos do cisto radicular (75%) e CD (65%). Esses achados sugerem que a expressão do MMP9 está ligada ao potencial de crescimento e reabsorção óssea da lesão.

Dutra *et al.* (2016), compararam a expressão imunoistoquímica das MMP1, MMP2 e MMP9 em diferentes tipos clínicos de AM, juntamente com a expressão em folículos pericoronários. Foram selecionados 30 casos de AM, 5 de AM unicístico e 8 de folículos pericoronários. Foram observados maiores expressões das três MMPs avaliadas em AM, seguido do AM unicístico e dos folículos pericoronários. Nesse estudo foi possível relacionar as expressões das MMP1, 2 e 9 com o comportamento biológico das lesões odontogênicas.

Suojanen *et al.* (2014) estudaram de forma comparativa a expressão de diversas MMPs (8, 9, 25 e 26) em 10 CDs e 10 folículos dentários. Foi observado que as diferentes expressões de MMPs não estavam relacionadas a expansão dos CDs, sugerindo que outros mecanismos osteolíticos estariam potencialmente envolvidos.

A MMP8 está presente na maior parte dos tecidos, associada ao desenvolvimento de diversos processos fisiológicos e patológicos, como foi abordado. No entanto, até o momento, existe apenas um estudo da sua expressão em lesões odontogênicas císticas (SUOJANEN *et al.*, 2014), não existindo trabalhos em lesões odontogênicas tumorais e sua participação na reabsorção óssea, juntamente ao RANKL, OPG e CatK.

Diante do exposto, constata-se que diversas moléculas participam do processo de reabsorção óssea e possivelmente podem estar envolvidas na patogênese e crescimento dos cistos e tumores odontogênicos, ora estimulando a atividade osteoclastogênica ora inibindo este processo. Alguns destes fatores osteoclastogênicos têm sido estudados em lesões odontogênicas, enquanto outros como a CatK e MMP8 ainda necessitam de investigações. Ademais, é relevante comparar o perfil de expressão dessas proteínas entre as lesões odontogênicas mais agressivas (COG, QO e AM) e a lesão cística de comportamento indolente (CD), para entender melhor o comportamento biológico diferenciado dessas lesões.

### 3 OBJETIVOS

#### **GERAL**

Investigar a expressão de proteínas estimuladoras (RANKL, CatK e MMP8) e inibidora (OPG) de atividade osteoclastogênica em uma série de casos de cistos (CD, COG e QO) e tumor odontogênico (AM).

#### **ESPECÍFICOS**

- Avaliar, através da imunohistoquímica, a expressão proteica diferencial de RANKL, CatK, MMP8 e OPG em CD, COG, QO e AM;
- Comparar a expressão proteica do RANKL, CatK, MMP8 e OPG entre o CD, COG, QO e AM ;
- Verificar correlação da expressão do RANKL, CatK, MMP8 e OPG com o tamanho das lesões;

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas**

O presente projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres Humanos da FOUFBA sob número de parecer 1.091.779 (Relatoria: 02/06/2015).

### **4.2 Caracterização do Estudo**

O presente estudo foi caracterizado por uma pesquisa retrospectiva e descritiva, constituída pela análise e registro da expressão imunoistoquímica do RANKL, CatK, MMP8 e OPG em CD, COG, QO e AM.

### **4.3 Variáveis Estudadas**

- Dependentes: expressão de RANKL, expressão de CatK, expressão de MMP8 e expressão de OPG.
- Independentes: CD, COG, QO e AM, tamanho da lesão.

### **4.4 População**

A população foi constituída por todos os casos registrados, diagnosticados e armazenados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) de 2002 a 2017, no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) de 2005 até 2016 e no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) de 2002 até 2016.

### **4.5 Amostra**

A amostra foi constituída por 59 casos de lesões odontogênicas, assim distribuídas: 9 CDs, 9 COGs, 20 QOs e 21 AMs . Quatro amostras de folículos dentários (FDs) serviram como controle para tecido odontogênico normal.

De uma maneira geral, como critérios de inclusão foram considerados os seguintes aspectos para cada caso: (1) quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina arquivado; e (2) condições de armazenamento do bloco, critérios estes necessários para a realização do estudo imunoistoquímico.

Para os casos de CD e FD, foram incluídos somente os espécimes que apresentavam moderado, discreto ou nenhum infiltrado inflamatório. No caso dos QOs, foram excluídos os casos associados à Síndrome do Carcinoma Nevóide Basocelular. Para os AMs, foram selecionados apenas o tipo clínico-radiográfico convencional, anteriormente denominado como sólido ou multicístico, diagnosticados como folicular, plexiforme, acantomatoso, células granulares e células basais. No diagnóstico de todas as lesões odontogênicas foram considerados as características radiográficas e os critérios morfológicos da OMS (2017).

A distinção entre FD e CD foi realizada através dos achados radiográficos, clínico-cirúrgicos e microscópicos: CD foi predominantemente revestido por epitélio escamoso estratificado e a exploração cirúrgica revelou cavidade óssea contendo o cisto; O FD foi predominantemente revestido por epitélio reduzido do órgão do esmalte e nenhuma cavitação óssea ou conteúdo cístico foi detectado.

#### **4.6 Análise clínica**

A partir de fichas clínicas de requisição de biópsia arquivadas nos Laboratórios de Patologia foram obtidos dados referentes à idade e sexo dos pacientes, além da localização da lesão, hipótese clínica e aspectos radiográficos. Dados referentes ao tamanho da lesão foram obtidos por meio da descrição macroscópica de cada espécime.

#### **4.7 Análise morfológica**

Com a finalidade de caracterizar a amostra de lesões odontogênicas incluídas nesta pesquisa, esta análise foi realizada em cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela técnica de rotina da hematoxilina e eosina (HE), em lâminas confeccionadas e arquivadas nos laboratórios de Anatomia Patológica, sob microscopia de luz. Nos CDs, foram considerados presença ou ausência do infiltrado inflamatório, células mucosas no limitante epitelial, ilhas de epitélio odontogênico na cápsula e o

epitélio foi classificado em predominantemente atrófico ou hiperplásico. O COG foi avaliado com relação à presença ou ausência de projeções papilares, espessamentos nodulares, células colunares ciliadas, células mucosas, estruturas pseudocísticas, células claras e infiltrado inflamatório. Para o QO, foram descritos presença ou ausência de desgarramento epitelial, ilhas ou cistos satélites e infiltrado inflamatório. Foram descritos os aspectos referentes aos padrões característicos do epitélio e cápsula das lesões císticas, além do tipo microscópico do ameloblastoma (folicular, plexiforme, acantomatoso, células basais e células granulares).

## **4.8 Estudo Imunoistoquímico**

### **4.8.1 Técnica da imunoistoquímica**

As reações imunoistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica da FOUFBA pela método da imunoperoxidase. Foram montadas secções de 3 µm de espessura em lâminas de vidro previamente tratadas com solução 2% de organossilano (3-aminopropiltritoxi-silano, A3648, 100 ml, Sigma Chemical Co.). As secções histológicas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas numa série decrescente de álcool. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação das secções com peróxido de hidrogênio a 3% em solução tampão (PBS, pH 7,4) durante 45 min. As secções foram lavadas duas vezes em PBS / Triton e incubadas com tampão citrato (pH 6,0), durante 20 min num banho de água a 95°C para a recuperação antigênica. Em seguida, foram resfriadas durante 20 min à temperatura ambiente e depois lavadas duas vezes em PBS. Foram tratados com leite 4% para os anticorpos anti-RANKL, anti-OPG, anti-CatK e anti-MMP8 e protein block isento de soro (k0909, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) 10 min para bloqueio de reações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com os anticorpos primários – hospedeiro mouse (Tabela 1), diluídos em diluentes de anticorpo (S3022, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), por 18 horas (overnight) a 4°C. Após este período, as secções foram lavadas duas vezes em PBS/0,1% Triton. O kit LSAB + System-HRP (K0690, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) foi aplicado para a detecção de RANKL, OPG e CatK. O sistema ADVANCED HRP (K4069, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) foi aplicado para detecção MMP8. As reações foram reveladas com 0,03% de diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrato, Dako) como cromógeno e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer por 2 min. Finalmente, as secções

foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol para montagem em resina Permout (Fisher Scientific). A lesão central de células gigantes (LCCG) foi utilizada como controle positivo nas reações de RANKL, OPG e CatK, já para MMP8 foi utilizado cisto radicular (CR) como controle positivo. As secções incubadas com soro diluente não imune, substituindo os anticorpos primários, serviram como controle negativo.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos utilizados. Salvador/ Bahia, 2017.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação	Diluição	Incubação	Controle Positivo
RANKL <i>Policlonal</i>	Santa Cruz	N-19	Citrato	1:150	<i>Overnight</i>	LCCG
CatK <i>Monoclonal</i>	Abcam	2F1	Citrato	1:750	<i>Overnight</i>	LCCG
MMP8 <i>Policlonal</i>	Santa Cruz	MM0023-7 A11	Citrato	1:50	<i>Overnight</i>	CR
OPG <i>Policlonal</i>	Santa Cruz	N-22	Citrato	1:150	<i>Overnight</i>	LCCG

LCCG: Lesão Central de Células Gigantes, CR: Cisto Radicular

#### 4.8.2 Análise imunoistoquímica

As lâminas coradas pela imunoistoquímica foram analisadas em microscópio de luz e as características da expressão de cada fator relacionado com a osteoclastogênese em cada lesão estudada foram registradas em fichas individuais, sendo analisados os seguintes aspectos:

- **Presença de imunorreatividade:** determinada pela cor marrom em núcleo, citoplasma e/ou membrana nas células epiteliais e/ou mesenquimais;
- **Tipo de célula mesenquimal positiva:** fibroblasto, célula endotelial e célula inflamatória;
- **Porcentagem da imunomarcção:** a imunoexpressão foi avaliada no revestimento epitelial/parênquima e cápsula fibrosa/estroma de acordo com Moraes et al. (2011), Sá et al. (2016) e Santos et al. (2017). A imunoexpressão no epitélio foi analisada semiquantitativamente por dois observadores num

aumento de 100x, sendo categorizada como: 0 ou nenhuma imunomarcção (<10% de células positivas), 1 (11-25% de células positivas), 2 (26-50 % de células positivas), 3 (51-75 % de células positivas) e 4 (> 75 %). Na cápsula/estroma, a análise foi quantitativa e o número de células positivas e negativas foi contado em cinco campos histológicos representativos, correspondendo as áreas hotspots para cada marcador, num aumento final de 400x. A porcentagem de células positivas foi obtida para cada campo e posteriormente foi obtida a porcentagem média, que representou a porcentagem de células positivas de cada caso. A imagem de cada campo foi capturada com um fotomicroscópio Nikon E200. As células imunomarcadas foram contadas utilizando o software Image J para Windows (versão 3.0).

- **Razão entre os fatores estimuladores e inibidor:** foi calculada a razão entre cada fator estimulador da osteoclastogênese (RANKL, CatK e MMP8) e o inibidor (OPG) para cada lesão estudada. Para este cálculo foi utilizado o valor da porcentagem média da expressão imunoistoquímica de cada marcador no tecido conjuntivo para cada lesão.

#### 4.9 Análise estatística

Os dados numéricos referentes às análises realizadas foram tabulados e tratados estatisticamente com o auxílio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparar a expressão das proteínas estudadas no epitélio/parênquima. O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar a imunomarcção na cápsula/estroma, com o intuito de testar as hipóteses a seguir. O teste de Spearman foi utilizado para verificar a correlação da expressão imunoistoquímica com o tamanho da lesão. O nível de significância utilizado na decisão dos testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

**H<sub>0</sub>** - Não existem diferenças estatisticamente significativas na expressão dos fatores osteoclastogênicos entre as lesões odontogênicas estudadas.

**H<sub>1</sub>** – Existem diferenças estatisticamente significativas na expressão dos fatores osteoclastogênicos entre as lesões odontogênicas estudadas.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Clínica

A média de idade dos pacientes acometidos pelo CD, COG, QO e AM foi de 14, 58, 36 e 40 anos, respectivamente, sendo os homens mais acometidos que as mulheres (Tabela 2). O tamanho médio dos CDs foi de 2,1 cm e o sítio mais acometido foi a mandíbula posterior (66%, n:6). O tamanho médio dos COGs foi de 3,2 cm e a região anterior da mandíbula foi o sítio mais afetado (66%, n:6). A média de tamanho para os casos de QO foi de 2,9 cm e a localização de maior ocorrência foi a região posterior da mandíbula (82%, n:16). Para o AM, o tamanho médio da lesão foi de 4,6 cm e o sítio de maior acometimento também foi a região posterior da mandíbula (97%, n: 20) (Tabela 2).

Em todos os casos de CD a lesão exibiu aspecto radiolúcido unilocular e a hipótese clínica inicial foi de CD. O aspecto radiográfico predominante do COG foi radiolúcido multilocular (77%, n:7), seguido do aspecto radiolúcido unilocular (23%, n:2). Os diagnósticos clínicos sugeridos foram de cisto radicular (55%, n: 5), AM (23%, n:2), QO (11%, n:1) e CD (11%, n:1) (Tabela 2). No QO, os aspectos radiográficos apresentados variaram entre radiolúcido multilocular (50%, n:10) e unilocular (50%, n:10). A maioria dos casos tiveram a hipótese clínica inicial de QO (90%, n:18), seguido do CD (5%, n:1) e cisto radicular (5%, n:1) (Tabela 2). Para o AM, o aspecto radiolúcido multilocular foi o mais comumente observado (90%, n:19). A suspeita clínica inicial na maioria dos casos foi de AM (86%, n:18), seguido pela lesão central de células gigantes (9%, n:2) e cisto radicular residual (5%, n:1) (Tabela 2).

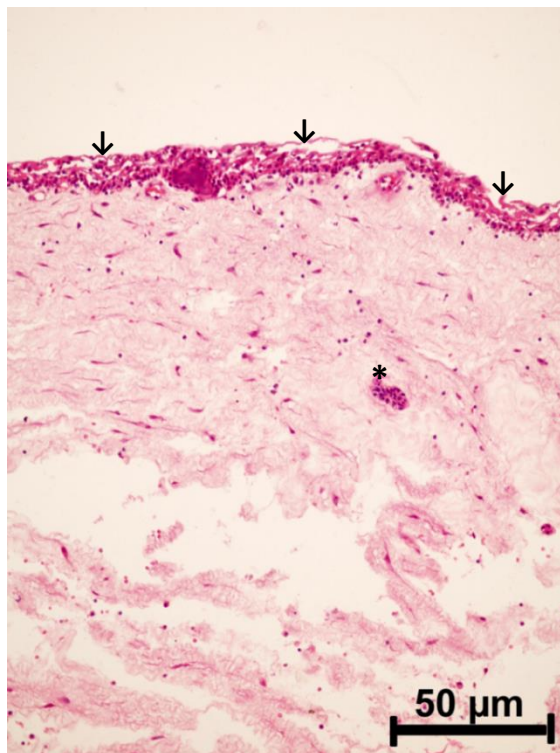
Tabela 2. Informações clínicas das lesões odontogênicas estudadas. Salvador/ Bahia, 2017.

<b>Lesão (n)</b>	<b>Sexo n (%)</b>	<b>Média de idade (anos)</b>	<b>Tamanho médio (cm)</b>	<b>Localização n (%)</b>	<b>Hipótese diagnóstica n (%)</b>
<b>CD (9)</b>	Maculino 7 (77) Feminino 2 (23)	14	2,1	Mandíbula posterior 6 (66) Maxila anterior 3 (34)	CD 9 (100)
<b>COG (9)</b>	Maculino 5 (55) Feminino 4 (45)	58	3,2	Mandíbula anterior 6 (66) Maxila posterior 1 (11) Maxila anterior 2 (23)	CR 5 (56) AM 2 (22) QO 1 (11) CD 1 (11)
<b>QO (20)</b>	Maculino 11 (56) Feminino 9 (44)	36	2,9	Mandíbula posterior 16 (82) Maxila posterior 1 (4) Mandíbula anterior 1 (4) Mandíbula/Maxila posterior 2 (10)	QO 18 (90) CR 1 (5) CD 1 (5)
<b>AM (21)</b>	Maculino 12 (57) Feminino 9 (43)	40	4,6	Mandíbula posterior 20 (97) Maxila posterior 1 (3)	AM 18 (87) LCCG 2 (9) CRR 1 (4)

CD: Cisto Dentígero, CR: Cisto Radicular, CRR: Cisto Radicular Residual, COG: Cisto Odontogênico Glandular, QO: Queratocisto Odontogênico, AM: Ameloblastoma, LCCG: Lesão Central de Células Gigantes, FD: Folículo Dentário

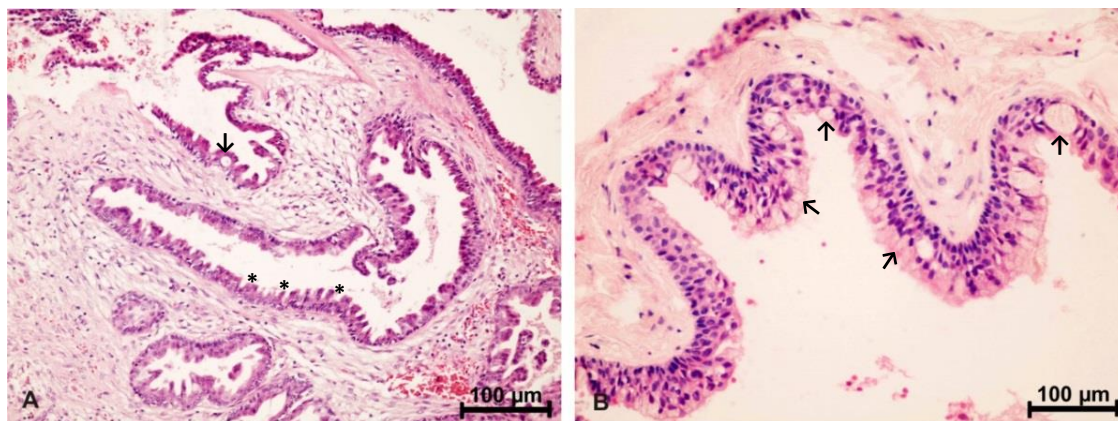
## 5.2 Análise Morfológica

O CD exibiu epitélio atrófico na maioria dos casos (80%, n:7). Ilhas de epitélio na cápsula foram encontradas em 80% (n:7) dos casos (Figura 1), enquanto que as células mucosas no limitante epitelial foram vistas em apenas dois casos. Foi observado infiltrado inflamatório discreto em 5 lesões, moderado em 3 e ausente em 1 CD.



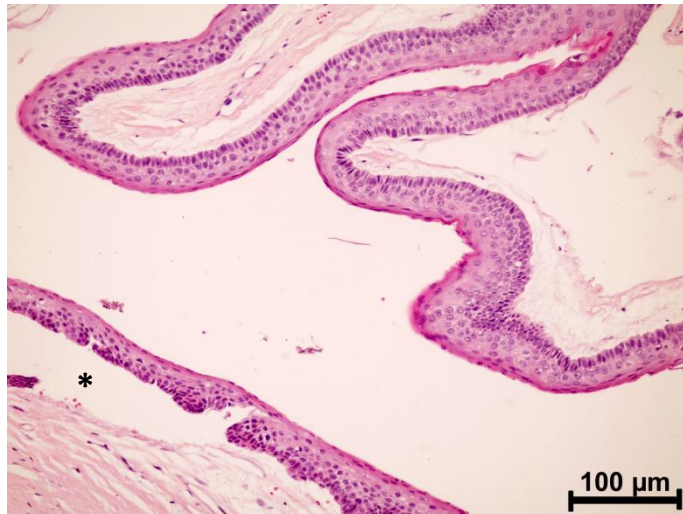
**Figura 1.** Fotomicrografia do CD corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note epitélio atrófico (setas) e ilha de epitélio odontogênico na cápsula (asterisco).

No COG, alguns aspectos morfológicos foram mais comuns, tais como estruturas pseudocísticas (88%, n:8) e projeções papilares (55%, n:5) (Figura 2A), células mucosas no revestimento epitelial (100%, n:9) (Figura 2B) e áreas de espessamento nodular (88%, n:8). A presença de células colunares ciliadas (33%, n:3) e células claras (11%, n:1) foram achados infrequentes. Com relação ao infiltrado inflamatório, foi encontrado em 4 casos (44%).



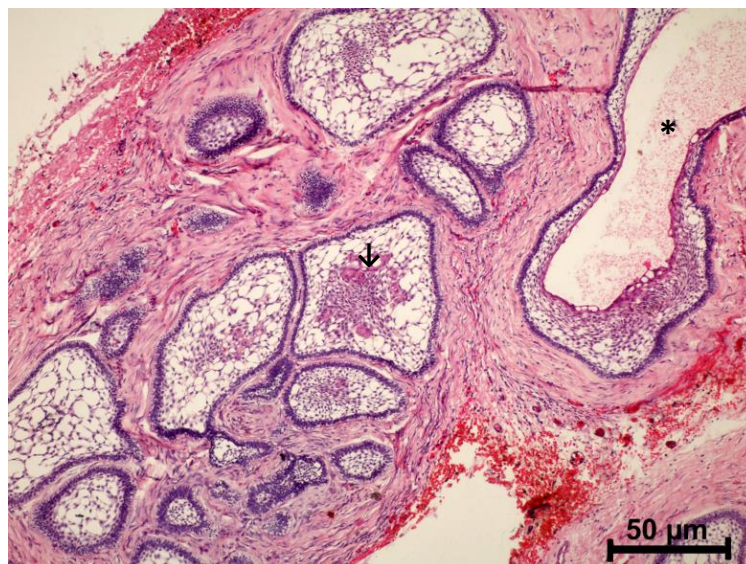
**Figura 2.** Fotomicrografias do COG corado em hematoxilina/eosina (H/E). Em **A**, note estrutura pseudocística (seta) e projeções papilares (asterisco). Em **B**, note numerosas células mucosas (setas).

No que diz respeito ao QO, de uma forma geral, foram evidenciados camada basal em paliçada, núcleos hipercromáticos, polaridade nuclear invertida, camada superficial corrugada de paraqueratina e interface epitélio/conjuntivo plana. A presença de desgarramento epitelial da cápsula foi observado em 97% (n:20) dos QOs (Figura 3). Ilhas satélites foram observadas em 24% (n:5) e em apenas 1 caso foi observado cistos satélites. O infiltrado inflamatório estava presente em 72% (n:15) dos QOs estudados.



**Figura 3.** Fotomicrografia do QO corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note área de desgarramento do epitélio da cápsula (asterisco).

A análise morfológica do AM mostrou que o padrão folicular foi predominante (Figura 4), representando 91% (n:19) dos AMs estudados, seguido pelo padrão plexiforme (4,5%, n:1) e de células granulares (4,5%, n:1). O infiltrado inflamatório estava presente em 39% (n:8) dos AMs.



**Figura 4.** Fotomicrografia do AM folicular corado em hematoxilina/eosina (H/E). Note áreas de degeneração cística (asterisco) e diferenciação escamosa (seta).

### 5.3 Análise da Imunoexpressão

Em geral, marcação imunoistoquímica positiva foi observada principalmente no citoplasma das células epiteliais e mesenquimais das lesões estudadas. Os tipos de células que expressaram as proteínas estudadas no tecido conjuntivo/estroma das lesões foram fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias.

Comparando a expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no componente epitelial de cada lesão (Tabela 3), foi observado para o CD uma expressão superior de OPG (88,9% dos casos classificados no escore 4), seguido pela MMP8, RANKL e CatK, com uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,007$ ). No COG (MMP8 > CatK > RANKL > OPG) e no QO (RANKL > OPG > CatK > MMP8) não foi observada diferença estatisticamente significativa na imunomarcação epitelial entre as proteínas estudadas. Para o AM, foi verificada maior expressão do RANKL (61,9% dos casos classificados no escore 4), seguido da OPG, CatK e MMP8, com uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). O FD exibiu expressão superior de OPG (100% das amostras com escore 4) e MMP8 (75% das amostras no escore 4), enquanto a CatK esteve ausente e o RANKL teve baixa expressão.

Tabela 3. Distribuição da porcentagem de expressão imunohistoquímica das proteínas estudadas no epitélio do CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.

CD	Escore em epitélio					<i>p</i>
	0 (< 10%) n (%)	1 (11 a 25%) n (%)	2 (26 a 50%) n (%)	3 (51 a 75%) n (%)	4 (> 75%) n (%)	
<b>Proteína</b>						
RANKL	0 (0)	1 (11,1)	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	
CatK	2 (22,2)	3 (33,3)	2 (22,2)	1 (11,1)	1 (11,1)	0,007
MMP8	0 (0)	1 (11,1)	1 (11,1)	5 (55,6)	2 (22,2)	
OPG	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	8 (88,9)	
<b>COG</b>						
RANKL	0 (0)	1 (11,1)	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	
CatK	1 (11,1)	1 (11,1)	0 (0)	4 (44,4)	3 (33,3)	0,051
MMP8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22,2)	7 (77,8)	
OPG	1 (11,1)	2 (22,2)	4 (44,4)	2 (22,2)	0 (0)	
<b>QO</b>						
RANKL	0 (0)	0 (0)	1 (5)	4 (20)	15 (75)	
CatK	0 (0)	0 (0)	2 (10)	10 (50)	8 (40)	0,152
MMP8	0 (0)	0 (0)	3 (15)	10 (50)	7 (35)	
OPG	0 (0)	0 (0)	2 (10)	5 (25)	13 (65)	

<b>AM</b>	RANKL	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (38,1)	13 (61,9)	
	CatK	6 (28,6)	1 (4,8)	8 (38,1)	2 (9,5)	4 (19)	<0,001
	MMP8	7 (33,3)	5 (23,8)	5 (23,8)	3 (14,3)	1 (4,8)	
	OPG	0 (0)	1 (4,8)	8 (38,1)	5 (25)	13 (61,9)	
<b>FD</b>	RANKL	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	CatK	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,015
	MMP8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	
	OPG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	

---

CD: Cisto Dentígero, COG: Cisto Odontogênico Glandular, QO: Queratocisto Odontogênico, AM: Ameloblastoma, FD: Folículo Dentário

A comparação da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no componente epitelial entre as lesões (Tabela 4) revelou diferença estatisticamente significativa para o RANKL ( $p < 0,001$ ). A maior imunomarcção foi encontrada no QO (75% dos casos classificados no escore 4), seguido pelo AM (61,9% dos casos classificados no escore 4). Expressão inferior foi observada para o CD e COG, ambos com 66,6% dos casos igualmente distribuídos entre os escores 2 e 3. No FD, a expressão do RANKL foi ausente em 75% dos casos. Também com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), a CatK obteve a maior expressão no QO (50% dos casos no escore 3), seguido do COG, AM e CD. No FD não houve expressão para CatK. Pôde-se observar que para a MMP8 a maior expressão foi encontrada no COG (77,8% dos casos classificados no escore 4), seguido do FD, QO, CD e AM, com uma diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ). O FD mostrou a maior expressão da OPG (100% dos casos no escore 4), seguido do CD (88,9% no escore 4), QO, AM e COG, com diferença estatística significativa ( $p = 0,002$ ).

Diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão dos marcadores ( $p < 0,05$ ) também foram observadas no tecido conjuntivo/estroma das lesões estudadas (Tabela 5). Na cápsula do CD foi verificada uma maior expressão da MMP8 (mediana: 63,0), seguida do RANKL (mediana: 40,0) e OPG (mediana: 27,0), sendo para CatK a menor expressão observada (mediana: 4,0). A expressão mais alta no COG foi da MMP8 (mediana: 46,0), seguida pelo RANKL (mediana: 25,0), ficando as expressões mais baixas para a Catps K e OPG com medianas de 8,0 e 3,0, respectivamente. Na cápsula do QO foi observada expressão superior do RANKL (mediana: 85,0), seguida da MMP8 (mediana: 78,5). Imunomarcção semelhante foi observada para CatK (mediana: 53,5) e OPG (mediana: 52,0). Para o AM, a maior imunoexpressão no estroma foi evidenciada para o RANKL (mediana: 80,0), seguido da CatK (mediana: 29,0), MMP8 (mediana: 17,0) e OPG (mediana: 13,0). Na avaliação do tecido conjuntivo do FD, a expressão da OPG foi superior (mediana: 48,0), seguida da MMP8 (mediana: 16%) e CatK e RANKL, os quais não foram expressos neste tecido.



Tabela 4. Comparação da expressão imunohistoquímica das proteínas estudadas no epitélio entre o CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.

Proteína	Escore em epitélio					p
	0 (< 10%) n (%)	1 (11 a 25%) n (%)	2 (26 a 50%) n (%)	3 (51 a 75%) n (%)	4 (> 75%) n (%)	
<b>RANKL</b>						
CD	0 (0)	1 (11,1)	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	
COG	0 (0)	1 (11,1)	3 (33,3)	3 (33,3)	2 (22,2)	<0,001
QO	0 (0)	0 (0)	1 (5)	4 (20)	15 (75)	
AM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (38,1)	13 (61,9)	
FD	3 (75)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>CatK</b>						
CD	2 (22,2)	3 (33,3)	2 (22,2)	1 (11,1)	1 (11,1)	
COG	1 (11,1)	1 (11,1)	0 (0)	4 (44,4)	3 (33,3)	<0,001
QO	0 (0)	0 (0)	2 (10)	10 (50)	8 (40)	
AM	6 (28,6)	1 (4,8)	8 (38,1)	2 (9,5)	4 (19)	
FD	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>MMP8</b>						
CD	0 (0)	1 (11,1)	1 (11,1)	5 (55,6)	2 (22,2)	
COG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22,2)	7 (77,8)	<0,001
QO	0 (0)	0 (0)	3 (15)	10 (50)	7 (35)	
AM	7 (33,3)	5 (23,8)	5 (23,8)	3 (14,3)	1 (4,8)	

	FD	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	
<b>OPG</b>							
	CD	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	8 (88,9)	
	COG	1 (11,1)	2 (22,2)	4 (44,4)	2 (22,2)	0 (0)	
	QO	0 (0)	0 (0)	2 (10)	5 (25)	13 (65)	0,002
	AM	0 (0)	1 (4,8)	8 (38,1)	7 (33,3)	5 (23,8)	
	FD	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	

---

CD: Cisto Dentígero, COG: Cisto Odontogênico Glandular, QO: Queratocisto Odontogênico, AM: Ameloblastoma, FD: Folículo Dentário

Tabela 5. Comparação da expressão imunohistoquímica entre as proteínas estudadas no tecido conjuntivo do CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.

<b>CD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>	<b>p</b>
RANKL	40,0	20,5 – 58,5	<i>&lt;0.001</i>
CatK	4,0	0,5 – 6,0	
MMP8	63,0	27,5 – 92,0	
OPG	27,0	17,0 – 59,5	
<b>COG</b>			
RANKL	25,0	1,5 – 48,5	<i>0.001</i>
CatK	8,0	2,0 – 13,0	
MMP8	46,0	31,0 – 64,0	
OPG	3,0	0,0 – 13,0	
<b>QO</b>			
RANKL	85,0	40,25 – 92,0	<i>&lt;0.001</i>
CatK	53,5	33,25 – 69,0	
MMP8	78,5	66,75 – 84,25	
OPG	52,0	33,5 – 57,75	
<b>AM</b>			
RANKL	80,0	74,5 – 87,5	<i>&lt;0.001</i>
CatK	29,0	0,0 – 70,0	
MMP8	17,0	10,0 – 33,0	
OPG	13,0	1,5 – 20,0	
<b>FD</b>			
RANKL	0	0,0 – 3,0	<i>0.004</i>
CatK	0	0,0 – 0,0	
MMP8	16,0	10,75 – 43,0	
OPG	48,0	39,75 – 58,5	

CD: Cisto Dentígero, COG: Cisto Odontogênico Glandular, QO: Queratocisto Odontogênico, AM: Ameloblastoma, FD: Folículo Dentário

A comparação da expressão imunohistoquímica das proteínas estudadas no tecido conjuntivo entre as lesões (Tabela 6), revelou uma maior expressão do RANKL no QO (mediana: 85,0) e no AM (mediana: 80,0), seguido do CD (mediana: 40,0) e do COG (mediana: 25,0) ( $p < 0,001$ ). Não houve expressão do RANKL no FD. Para a CatK, o QO (mediana: 53,0) e o AM (mediana: 29,0) apresentaram as mais altas expressões, ficando o COG (mediana: 8,0) e o CD (mediana: 4,0) com marcação inferior ( $p < 0,001$ ). Não houve expressão da CatK no FD. A MMP8 teve expressão superior no QO (mediana: 78,5) e CD (mediana: 63,0), seguida pelo COG (mediana: 46,0). As menores expressões foram do AM (mediana: 17,0) e do FD (mediana: 16,0), com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). As maiores expressões da

OPG foram observadas no QO (mediana: 52,0), FD (mediana: 48,0) e CD (mediana: 27,0), sendo as menores atribuídas ao AM e COG, com medianas de 13,0 e 3,0, respectivamente, revelando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Tabela 6. Comparação da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas no tecido conjuntivo entre CD (n:9), COG (n:9), QO (n:20), AM (n:21) e FD (n:4). Salvador/ Bahia, 2017.

PROTEINA	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	P
<b>RANKL</b>			
CD	40,0	20,5 – 58,5	<0.001
COG	25,0	1,5 – 48,5	
QO	85,0	40,25 – 92,0	
AM	80,0	74,5 – 87,5	
FD	0	0,0 – 3,0	
<b>CatK</b>			
CD	4,0	0,5 – 6,0	<0.001
COG	8,0	74,5 – 87,5	
QO	53,5	33,25 – 69,0	
AM	29,0	0,0 – 70,0	
FD	0	0,0 – 0,0	
<b>MMP8</b>			
CD	63,0	27,5 – 92,0	<0.001
COG	46,0	31,0 – 64,0	
QO	78,5	66,75 – 84,25	
AM	17,0	10,0 – 33,0	
FD	16,0	10,75 – 43,0	
<b>OPG</b>			
CD	27,0	17,0 – 59,5	<0.001
COG	3,0	0,0 – 13,0	
QO	52,0	33,5 – 57,75	
AM	13,0	1,5 – 20,0	
FD	48,0	39,75 – 58,5	

CD: Cisto Dentífero, COG: Cisto Odontogênico Glandular, QO: Queratocisto Odontogênico, AM: Ameloblastoma, FD: Folículo Dentário

As figuras 5 e 6 ilustram a imunomarcção do RANKL, CatK, MMP8 e OPG no componente epitelial e mesenquimal do CD, COG, QO, AM e FD, bem como seus respectivos controles positivos.

No tecido conjuntivo das lesões foi possível avaliar a razão entre os fatores estimuladores (RANKL, CatK e MMP8) e o fator inibidor (OPG). Para o CD foi observado uma expressão de RANK e MMP8, nos valores de 1,5 e 2,3 maior que a OPG, respectivamente. Por outro lado, a expressão de OPG foi 9 vezes maior que a da CatK nos CDs avaliados. No COG, a expressão de todos os fatores estimuladores da osteoclastogênese estudados foi maior que a da OPG, revelando ser 8,3 maior para o RANKL, 2,7 para CatK e 15,3 para a MMP8. O QO exibiu uma razão da expressão do RANKL 1,6 maior, seguido de da MMP8 1,5 vezes maior, quando comparadas a OPG. A razão da expressão entre a CatK e OPG foi semelhante para os QOs estudados. No AM, o RANKL exibiu uma expressão 6,2 vezes maior que a OPG, já a CatK e a MMP8, revelaram expressões 2,2 e 1,3 vezes maiores que a OPG, respectivamente. Por último, para o FD houve apenas expressão para o fator inibidor (OPG), comparado aos marcadores RANKL e CatK. Para a MMP8, a OPG foi 7 vezes mais expressa nos FDs avaliados.

Através do teste de Spearman foi avaliada a possível correlação da expressão das proteínas no epitélio e conjuntivo das lesões com o tamanho das lesões estudadas. Observou-se que uma maior expressão da OPG no parênquima ( $p = 0,003$ ) e no estroma ( $p = 0,037$ ) do AM esteve associada à lesões de menor tamanho. Uma distribuição similar do tamanho do CD, COG e QO foi observada entre as diferentes categorias de escores e diferentes porcentagens de marcação utilizadas para quantificar a expressão das proteínas do epitélio e conjuntivo das lesões, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

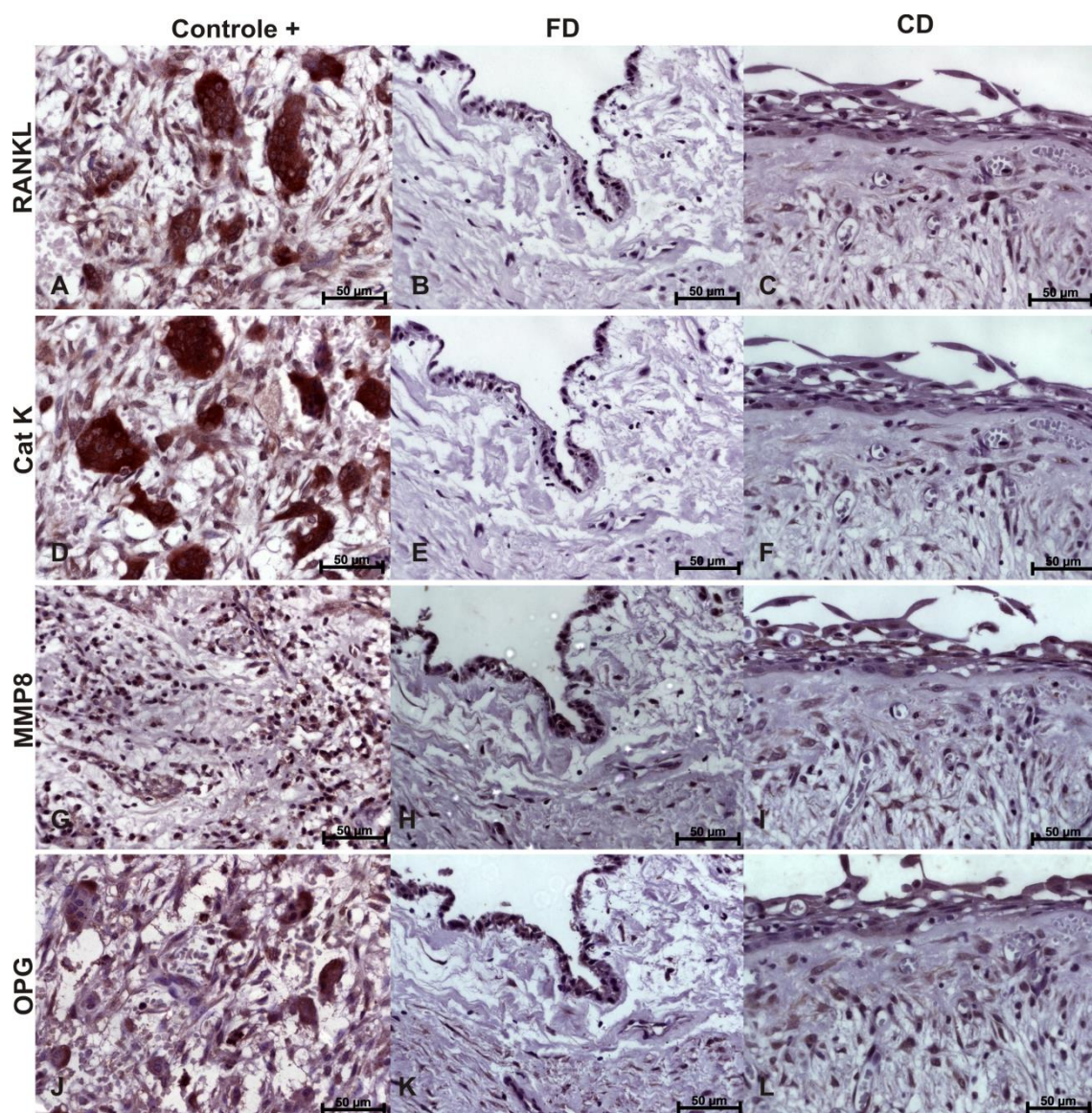


Figura 5. Imunoexpressão de RANKL, CatK, MMP8 e OPG em FD e CD e nos controles positivos (**A, D e J**: LCCG, **G**: CR) . Note expressão ausente do RANKL (**B**) e CatK (**E**) no FD e baixa no epitélio cístico e cápsula do CD (**C e F**). Expressão da MMP8 e OPG mais evidente no citoplasma e núcleo das células epiteliais e mesenquimais do FD (**H e K**) e CD (**I e L**).

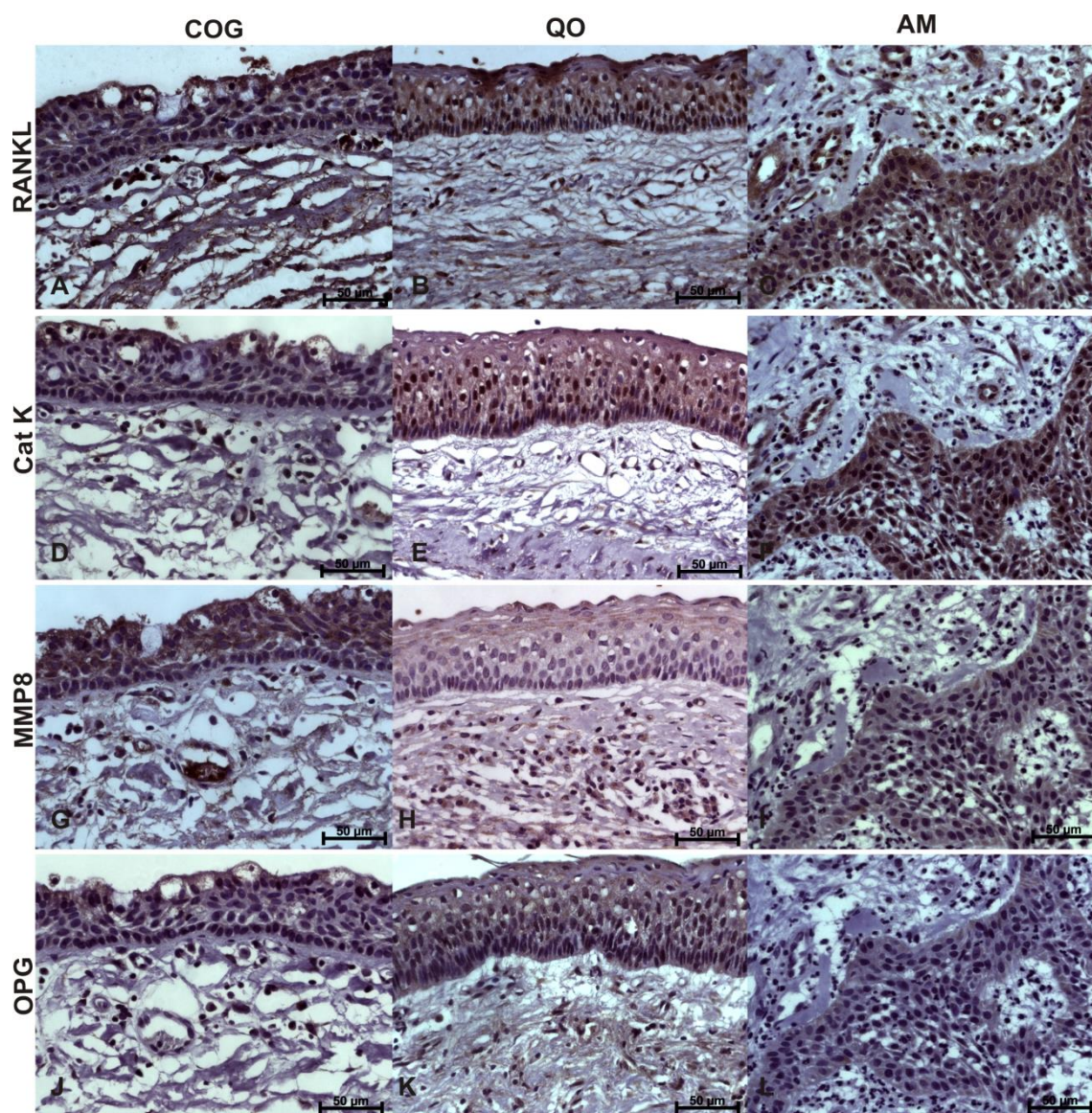


Figura 6. Imunoexpressão de RANKL, CatK, MMP8 e OPG em COG, QO e AM. Note alta expressão do RANKL (C) e CatK (F) no parênquima e estroma do AM, seguido pelo epitélio cístico e cápsula do QO (B e E) e do COG (A e D). Expressão da MMP8 e OPG mais evidente no citoplasma e núcleo das células epiteliais e mesenquimais do COG (G e J) e QO (H e K).

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento das lesões odontogênicas resulta da ativação dos remanescentes epiteliais e/ou ectomesenquimais da odontogênese que permanecem nos pertuitos ósseos e voltam a ser estimulados por proteínas capazes de ativar eventos biológicos essenciais para crescimento e progressão das lesões. Dentre esses eventos, destaca-se a osteoclastogênese, a qual está diretamente ligada ao estabelecimento das lesões intraósseas. O exato mecanismo da reabsorção óssea das lesões odontogênicas não está completamente compreendido, mas estudos têm demonstrado que algumas proteínas parecem influenciar a atividade osteolítica dessas lesões. O presente estudo sugere a participação diferenciada do RANKL, CatK, MMP8 e OPG no desenvolvimento do CD, COG, QO e AM.

As lesões estudadas apresentaram de uma forma geral, aspectos clínicos condizentes com os relatados na literatura. Em todas as lesões estudadas o gênero masculino foi mais acometido que o feminino, compatível com os estudos de Stoelinga (2012), Morais *et al.* (2012), Contar *et al.* (2015), para QO, COG e CD, respectivamente. Diferente dos nossos achados, Bansal *et al.* (2015) não observaram predileção pelo gênero no AM.

O CD apresentou uma idade média de 14 anos e a região posterior de mandíbula mais acometida, sendo compatível com a maioria dos trabalhos (DEMIRIZ, MISIR e GORUR, 2015; CONTAR *et al.*, 2015). Já o COG obteve média de idade de 58 anos com a região anterior de mandíbula predominante, corroborando os estudos de Morais *et al.* (2012), Stoelinga (2012), Tambawala *et al.* (2014), Akkas *et al.* (2015) e Faisal, Ahmad e Ansari (2015). Para o QO a média de idade foi de 36 anos, com maior apresentação na região posterior de mandíbula, sendo semelhante aos relatos de Barnes (2005), Stoelinga (2012), Leung *et al.* (2016). Com uma ampla faixa etária acometida pelo AM relatada na literatura, nosso trabalho apresentou uma idade média de 40 anos, sendo coerente com a maioria dos estudos, juntamente com localização predominante na mandíbula posterior (JHAMB e KRAMER, 2014; ROSA *et al.*, 2014; BANSAL *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016).

Os aspectos radiográficos em todas as lesões estudadas também acompanharam o padrão relatado na literatura. As maiores dimensões foram observadas para o AM, sendo o esperado, por se tratar de uma lesão tumoral e mais agressiva, comparada às outras lesões císticas estudadas. Jhamb e Kramer (2014) confirmam essa capacidade do



AM de atingir grandes dimensões, devido ao maior potencial de reabsorção óssea e evolução quando comparado às lesões císticas.

Os casos de CD, COG, QO e AM, incluídos neste trabalho, preencheram os critérios histopatológicos propostos para o diagnóstico dessas lesões (OMS, 2017). No entanto, alguns aspectos morfológicos foram infrequentes, tais como a presença de células mucosas no CD, células colunares ciliadas e células claras no COG, ilhas e cistos satélites no QO, padrão de células basais no AM.

Na análise imunoistoquímica realizada, vários tipos celulares exibiram imunopositividade para as proteínas estudadas, tais como células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias. Estes achados estão de acordo com alguns relatos da literatura que investigaram a imunopositividade do RANKL e OPG em lesões odontogênicas. Tekkesin, Mutlu e Oglac (2011) observaram imunopositividade nos fibroblastos, linfócitos, osteoclastos e osteoblastos em CRs, QOs e AMs. Siar *et al.* (2015) também relataram em seu estudo a positividade em células epiteliais e mesenquimais, tais como fibroblastos, células inflamatórias, osteoblastos e osteoclastos no CR, QO e AM. Estes resultados indicam que esta grande variedade de células parece estar envolvida no processo da osteoclastogênese e relacionada intimamente com a expressão de proteínas que podem contribuir com o desenvolvimento e crescimento das lesões odontogênicas.

O resultado da imunopositividade dos fatores estimuladores (RANKL, CatK e MMP8) e inibidor (OPG) da osteoclastogênese no CD, demonstrou alta expressão da OPG no epitélio e cápsula. No entanto, expressões significativas de MMP8 e RANKL também foram observadas neste cisto. É de se esperar que a OPG estivesse com expressão superior no CD, uma vez que se trata de uma lesão indolente, quando comparada ao AM e QO. A OPG é uma molécula que inibe a proliferação e diferenciação dos osteoclastos, competindo com o RANKL ao impedir que este se ligue ao RANK, inibindo, dessa forma, a atividade osteolítica (SUN *et al.*, 2015; SIAR *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2008) encontraram expressão superior de OPG nos CDs estudados, quando comparado ao QO e AM, corroborando os nossos resultados.

Por sua vez, a MMP8 obteve a maior expressão na cápsula do CD. A MMP8 é uma das mais importantes endopeptidases, capaz de degradar principalmente o colágeno I (LAWAL *et al.*, 2015). Assim, atuando juntamente com outros fatores que estimulam a atividade osteolítica, ela estaria contribuindo com o crescimento e progressão de lesões intraósseas. Por outro lado, vale salientar que a MMP8 além de ser expressa por

células epiteliais e fibroblastos em diversas patologias (OMAR *et al.*, 2015), ela é também expressa por células inflamatórias (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015; THIERBACH *et al.*, 2016). Considerando que alguns CDs incluídos na amostra do presente estudo exibiam infiltrado inflamatório, acredita-se que este achado parece não ter relação com agressividade da lesão. Trabalhos referentes à MMP8 em lesões odontogênicas são escassos na literatura. Apenas um trabalho foi publicado e este envolve o CD (SUOJANEN *et al.*, 2014). Nossos achados são consistentes com os resultados de Suojanen *et al.* (2014), que também encontraram alta imunexpressão de MMP8 nos CDs e FDs avaliados.

Foram observados altos índices de expressão do RANKL na cápsula do CD, contrapondo-se aos estudos de Matos *et al.* (2013), que encontraram baixa imunexpressão de fatores como RANKL na cápsula do CD. Altas expressões de RANKL na cápsula do CD também parecem estar relacionadas à presença de infiltrado inflamatório, uma vez que as células inflamatórias expressam o RANKL (MORAES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2017).

Com relação à CatK, sua expressão foi ausente no epitélio e conjuntivo dos CDs, demonstrando que esta proteína, possivelmente, não influencie o desenvolvimento desta lesão. A CatK pode ser considerada um marcador de agressividade, pois a literatura demonstra que sua alta expressão tem sido associada a condições como osteoporose, progressão de metástases ósseas, artrite reumatoide e periodontite (LEUNG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014). Leung *et al.* (2011) demonstraram que a CatK atua como uma molécula estimuladora da reabsorção óssea. Os autores constataram que a Odenacatib ODN parece inibir a ação da CatK sobre os osteoclastos, reduzindo o processo de reabsorção óssea. Kim *et al.* (2014) observaram que o crescimento e progressão do ameloblastoma periférico estava associado à alta expressão da CatK. Assim, espera-se que em lesões menos agressivas, como o CD, a sua marcação seja baixa ou inexistente como aconteceu neste trabalho. Não existem estudos prévios da avaliação da imunexpressão da CatK no CD.

No COG, a expressão imunohistoquímica dos marcadores estudados seguiu um padrão similar tanto no epitélio cístico, quanto na cápsula. Fatores estimuladores da osteoclastogênese (MMP8, RANKL e CatK) exibiram maiores expressões quando comparados a OPG. A alta positividade da MMP8, RANKL e CatK pode ser um dos fatores que justificam a natureza mais agressiva deste cisto. As MMPs são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e regulam o desenvolvimento, a remodelação e a

destruição dos tecidos, estando associadas à angiogênese, proliferação celular, apoptose e invasão em diversas patologias (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2013; LAWAL *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2016). Guimarães *et al.* (2015) avaliaram a expressão das MMPs 2, 7 e 20 no COG, QO, AM, tumor odontogênico cístico calcificante e tumor odontogênico adenomatóide, obtendo baixa positividade para estes marcadores no COG quando comparado às lesões mais agressivas como QO e AM, com diferença estatística significativa. A imunexpressão do RANKL reforça que essa lesão, parece ter comportamento mais agressivo do que outras lesões císticas. Matos *et al.* (2013) encontraram baixa expressão do RANKL no cisto radicular e no CD, quando comparado ao AM. Por sua vez, a baixa imunexpressão da OPG sugere que na amostra do presente estudo os fatores estimuladores da atividade osteolítica predominaram no COG diferente do que se observa em outras lesões císticas. Santos *et al.* (2017), observaram alta expressão de OPG nos cistos radiculares. Silva *et al.* (2008) realizaram uma comparação da expressão imunistoquímica da OPG e do RANKL em CD, AM e QO e observaram uma maior expressão da OPG no CD. Assim, a expressão da OPG, que normalmente se observa em lesões císticas como CD e cisto radicular, não é vista no COG.

Por ser uma lesão rara, poucos estudos investigaram o COG, que parece diante destes resultados tratar-se de um cisto biologicamente agressivo, por apresentar maiores expressões das moléculas que favorecem a reabsorção óssea.

O QO apresentou as maiores imunexpressões para o RANKL tanto no componente epitelial quanto na cápsula. Este resultado é coerente, uma vez que o QO é considerado uma lesão mais agressiva comparada aos outros cistos odontogênicos (POGREL, 2015; LEUNG *et al.*, 2016), estando associado a maiores reabsorções ósseas (BARNES, 2005; STOELINGA, 2012). Estes achados se confirmam em diversos estudos, como os de Andrade *et al.* (2008), Silva *et al.* (2008), Tekkesin, Mutlu e Oglac (2011), Matos *et al.* (2013) e Siar *et al.* (2015), que obtiveram elevada imunexpressão de RANKL para o QO. Pôde-se observar no componente epitelial do QO uma expressão significativa da OPG. Este resultado levanta a possibilidade do QO, apesar de ser considerada uma lesão agressiva, normalmente possuir crescimento inferior que uma lesão tumoral como o AM, por exemplo. Estes dados são semelhantes aos resultados de Silva *et al.* (2008), que avaliaram os níveis de RANKL/OPG em QO, obtendo maiores expressões da OPG em comparação ao RANKL em 62,4% dos QOs.

Em contrapartida, na cápsula do QO, a OPG se expressou de forma mais discreta em comparação ao RANKL, CatK e MMP8. Acredita-se que as diferentes proporções entre os fatores estimuladores e inibidores favoreçam a maior ou menor reabsorção óssea que está associada ao desenvolvimento dessas lesões. Matos *et al.* (2013) avaliaram a expressão imunistoquímica do RANKL e da OPG em cistos e tumores odontogênicos, incluindo CD, CR, QO e AM. Foi observada uma menor expressão da OPG no QO quando comparado à outras lesões císticas, como o cisto radicular e CD, sendo o RANKL expresso de forma mais evidente no AM.

Em relação à imunoexpressão da CatK no QO, houve marcação significativa tanto em epitélio quanto na cápsula, sugerindo ser uma proteína favorável a reabsorção óssea e importante para o desenvolvimento desta lesão. A expressão imunistoquímica da MMP8 no QO foi mais significativa na cápsula, o que pode ser justificado pela possível presença de células inflamatórias. Não existem estudos prévios que avaliaram a expressão da CatK e MMP8 em QO. Mas, existem estudos que demonstram a relação dessas proteínas com a maior reabsorção óssea. Hao *et al.* (2015) avaliaram fatores relacionados à progressão da artrite reumatoide e periodontite em modelos de rato. Notou-se que a deficiência genética da CatK resultou em redução da inflamação e erosão óssea, sugerindo que a inibição da CatK pode se tornar um alvo no tratamento da artrite reumatoide e da periodontite. Omar *et al.* (2015) demonstraram que existe uma relação entre a expressão positiva de MMP8 com a diminuição do reparo ósseo e um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias malignas, como o carcinoma escamocelular oral e carcinomas da pele. Altas expressões da MMP-2 e MMP-8 foram detectadas por Lawal *et al.* (2015) no carcinoma escamocelular oral, sendo a expressão destas MMPs sugerida como uma importante ferramenta auxiliar na determinação do prognóstico dessa lesão.

O parênquima e estroma do AM revelaram elevados níveis de RANKL. O AM é uma neoplasia benigna, porém apresenta características clínicas e radiográficas compatíveis com uma lesão agressiva e que pode resultar em sérias complicações para o paciente (BANSAL *et al.*, 2015; MILMAN *et al.*, 2016). Dessa forma, era esperado que os fatores estimuladores da osteoclastogênese, como o RANKL, exibissem expressão significativa nesta lesão, sendo inclusive superior às lesões císticas estudadas (CD, COG e QO). Estes resultados corroboram diversos estudos na literatura (SILVA *et al.*,

2008, ANDRADE *et al.*, 2008, TEKKESIN, MUTLU E OGLAC, 2011, MATOS *et al.*, 2013, JHAMB e KRAMER, 2014).

Foi observado no estroma dos AMs, baixa expressão da OPG, sendo coerente por se tratar de uma proteína inibidora da osteoclastogênese. Jhamb e Kramer (2014), Tekkesin, Mutlu e Oglac (2011) encontraram expressão superior do RANKL em relação à OPG no estroma do AM. Kumamoto *et al.* (2004), encontraram maior expressão do RANKL em relação a OPG no parênquima dos AMs.

Houve marcação significativa para CatK tanto no parênquima quanto no estroma do AM. Trata-se de um marcador biológico favorável a osteoclastogênese, assim, juntamente ao RANKL pode justificar o potencial de reabsorção óssea desta lesão. Kim *et al.* (2014) avaliaram a imunoexpressão da CatK em ameloblastomas periféricos e no carcinoma basocelular oral. Foi obtida expressão superior da CatK no ameloblastoma periférico, quando comparado com o carcinoma, o qual exibiu expressão elevada de outros marcadores de agressividade, como o TNF alfa,  $\beta$ -catenina e MMPs. Apesar de se tratar de outro tipo de AM, os resultados da expressão da CatK nos AMs da presente pesquisa foram semelhantes ao encontrado por Kim *et al.* (2014). Não existem estudos anteriores avaliando a expressão da CatK em AM intraósseo.

A expressão imunoistoquímica da MMP8 no AM foi mais significativa no estroma quando comparada ao parênquima tumoral, possivelmente pela presença secundária de algumas células inflamatórias em alguns casos incluídos em nossa amostra. Os estudos publicados até o momento não investigaram a participação da MMP8 na patogênese do AM. Porém, outras MMPs têm sido abordadas e têm demonstrado participação importante no estabelecimento e crescimento desta neoplasia (HENRIQUES *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2016). Henriques *et al.* (2011) relataram maior expressão da MMP9 no AM, quando comparado ao QO, CD e cisto radicular. Dutra *et al.* (2016) compararam a expressão imunoistoquímica das MMP1, MMP2 e MMP9 em diferentes tipos clínicos de AM, sendo observado maiores expressões das três MMPs avaliadas em AM sólidos, seguido do AM unicístico. De uma forma geral, alta expressão das MMPs parece estar relacionada à reabsorção óssea e potencial de crescimento das lesões.

Ao comparar as expressões imunoistoquímicas entre lesões investigadas na presente pesquisa, constata-se que o RANKL e CatK parecem ter maior participação na patogênese do QO, AM e COG do que no CD e FD. Este resultado pode ser um fator importante que justifica a maior reabsorção óssea, crescimento e agressividade

associado ao AM, QO e COG, uma vez que o RANKL e CatK favorecem a atividade osteolítica (TEKKESIN, MUTLU e OGLAC, 2011, ALAN *et al.*, 2015, SUN *et al.* 2015, DUTRA *et al.*, 2016). Vale ressaltar que o QO exibiu expressão superior ao AM e COG. Tekkesin, Mutlu e Oglac (2011) avaliaram a expressão imunoistoquímica do RANK, RANKL e OPG, em QO, AM e cisto radicular. A expressão do RANKL foi alta e semelhante no AM e QO, sendo inferior no CR. RANK foi superior no QO e a OPG mostrou baixa expressão, sem diferenças entre as lesões. Silva *et al.* (2008) realizaram uma comparação da expressão imunoistoquímica do RANKL e da OPG em CD, AM e QO, observando uma maior expressão do RANKL no AM, seguido pelo QO e CD, o qual apresentou a maior imunoexpressão da OPG. Juntos, esses resultados demonstram que a atividade osteolítica parece similar no QO e AM, apesar da natureza neoplásica controversa do QO. Como esperado, a expressão do RANKL e CatK foi ausente no FD, utilizado como controle. De forma semelhante, Matos *et al.* (2013), relataram baixa imunoexpressão do RANKL em FD, quando comparado ao QO e AM.

Neste trabalho, não foi possível estabelecer uma relação da expressão da MMP8 com o tipo de lesão estudada, se cisto ou tumor e nem com a agressividade da lesão. Maiores expressões foram encontradas no COG e QO, seguidas pelo FD e CD. Considerando que a MMP8 é expressa principalmente por células inflamatórias (EVROSIMOVSKA *et al.*, 2015; THIERBACH *et al.*, 2016), acredita-se que sua expressão tenha sido influenciada pela presença do infiltrado inflamatório em algumas lesões incluídas na nossa amostra. Semelhante ao encontrado na presente pesquisa, Suojanen *et al.* (2014) detectaram imunoexpressão significativa de MMP8 nos CDs e FDs avaliados.

A participação da CatK e MMP8 em lesões odontogênicas císticas e tumorais ainda é pouco abordada na literatura, existindo apenas um trabalho da CatK em ameloblastoma periférico (KIM *et al.*, 2014) e um da MMP8 em CD e FD (SUOJANEN *et al.*, 2014). Assim, mais trabalhos envolvendo estes marcadores em lesões odontogênicas são necessários, uma vez que essas proteínas podem ajudar a entender o comportamento biológico destas lesões.

Com relação à OPG, maiores expressões imunoistoquímicas foram observadas no CD e FD, o que pode justificar a menor atividade osteolítica associadas a estes processos. Corroborando nosso trabalho, Silva *et al.* (2008), obtiveram alta imunopositividade para OPG em 70% dos FD avaliados, comparando ao AM, QO e CD. De acordo com Sara *et al.* (2006), Silva *et al.* (2008), Moraes *et al.* (2011), Siar *et*

*al.* (2015), em função da OPG apresentar atividade que inibe a osteoclastogênese, espera-se que sua expressão seja superior em lesões mais indolentes. De forma inesperada, o QO exibiu marcação superior para OPG em seu componente mesenquimal em comparação com as outras lesões e FD. É possível que este achado seja um dos fatores que explique o crescimento inferior que geralmente esta lesão apresenta quando comparado ao AM, o qual exibiu as menores expressões da OPG.

O cálculo da razão entre os fatores estimuladores (RANKL, CatK e MMP8) e inibidor (OPG) no componente mesenquimal em cada lesão estudada, confirma os resultados discutidos acima, onde os fatores estimuladores da osteoclastogênese predominaram nas lesões que apresentam comportamento mais agressivo, AM, QO e COG. De forma mais discreta a MMP8 e RANKL foram superiores no CD, seguido pela OPG e CatK. Por outro lado, a OPG predominou no FD em relação aos outros marcadores.

Por fim, pôde-se observar uma relação da expressão da OPG com o tamanho do AM. Altas expressões da OPG foram associadas às AMs de menor tamanho. Achado importante, que ratifica o papel da OPG na inibição da osteoclastogênese, possivelmente impedindo o maior crescimento da lesão. Diante desses achados, é possível sugerir que tratamentos cirúrgicos menos invasivos poderiam ser instituídos aos AMs de menores proporções e que apresentem alta imunoe expressão da OPG.

## 7 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam a participação de fatores que inibem e estimulam a reabsorção óssea no desenvolvimento do CD, COG, QO e AM, com maior expressão do RANKL e CatK nas lesões consideradas mais agressivas, QO, AM e COG. A OPG, proteína associada a menores taxas de reabsorção óssea, foi superior no CD e FD, e parece ser uma das moléculas responsáveis pelo menor crescimento das lesões. Para MMP8, não foi possível estabelecer relação com o comportamento biológico das lesões.

O COG exibiu expressões dos fatores estimuladores da osteoclastogênese semelhantes ao AM e QO. Desta forma, acredita-se que esta lesão apresente uma tendência a comportamento biológico mais agressivo, sugerindo a necessidade de tratamentos mais radicais, a fim de evitar as recidivas.

São necessários mais estudos envolvendo as lesões odontogênicas e estes marcadores, especialmente a CatK e MMP8, para o melhor entendimento do processo de reabsorção óssea nessas lesões. Diante disto, será possível o surgimento de terapias eficazes e promissoras que permitam o desenvolvimento de moléculas silenciadoras capazes de bloquear a progressão dessas lesões, evitando-se tratamentos mais radicais, que normalmente causam grandes sequelas aos pacientes.



## 8 REFERÊNCIAS

1. Aguda, A. H., Panwar, P., Du, X., Nguyen, N. T., Brayer, G. D., & Brömme, D. (2014). Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), 17474–9.
2. Ahmed Haji Omar, A., Haglund, C., Virolainen, S., Häyry, V., Atula, T., Kontio, R., Hagström, J. (2015). MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *119*(4), 459–467.
3. Akkaş, İ., Toptaş, O., Özan, F., & Yılmaz, F. (2015). Bilateral glandular odontogenic cyst of mandible: a rare occurrence. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, *14*(Suppl 1).
4. Alan, R., Marakoğlu, I., Muchen, V. & Haliloğlu, S. (2015). Peri-implant crevicular fluid levels of cathepsin-K, RANKL, and OPG around standard, short, and mini dental implants after prosthodontic loading. *Journal of Periodontal and Implant Science*, *45*(5), 169–177.
5. Andrade, F. R., Sousa, D. P., Mendonça, E. F., Silva, T. A., Lara, V. S., & Batista, A. C. (2008). Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *106*(4), 548–555.
6. Araujo-Pires, A.C.; Franciscone, C.F.; Biguetti, C.C.; Cavala, F. Letra, A.; Trombone, A.P.F.; Favari, M.; Silva, R.M.; Garlet, G.P. (2014) Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* *22*(4): 336-46;
7. Astekar, M., Manjunatha, B. S., Kaur, P., & Singh, J. (2014). Histopathological insight of complex odontoma associated with a dentigerous cyst. *BMJ Case Reports*, *2014*, 3–6.
8. Bansal, S., Desai, R. S., Shirsat, P., Prasad, P., Karjodkar, F., & Andrade, N. (2015). The occurrence and pattern of ameloblastoma in children and adolescents: An Indian institutional study of 41 years and review of the

- literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44(6), 725–731.
9. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005;
  10. Bitu, C. C., Kauppila, J. H., Bufalino, A., Nurmenniemi, S., Teppo, S., Keinänen, M., Salo, T. (2013). Cathepsin K Is Present in Invasive Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE*, 8(8).
  11. Bonnen, S.; Rosenberg, E.; Claessens, F.; Vandrechueren, D.; Papapoulo, S. (2012). Inhibition of Cathepsin K for treatment of Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 10:73-79;
  12. Bulut, E., Baş, B., Dinçer, D., & Günhan, Ö. (2016). Treatment of Maxillary Glandular Odontogenic Cyst Involving the Same Place of Previously Treated Traumatic Bone Cyst. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 27(2), e150-3.
  13. Cano, J., Benito, D. M., Montáns, J., Rodríguez-Vázquez, J. F., Campo, J., & Colmenero, C. (2012). Glandular odontogenic cyst: Two high-risk cases treated with conservative approaches. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(5), e131–e136.
  14. Chae, M. P., Smoll, N. R., Hunter-Smith, D. J., & Rozen, W. M. (2015). Establishing the natural history and growth rate of ameloblastoma with implications for management: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(2).
  15. Chandra, S., Reddy, E. S. P., Sah, K., & Srivastava, A. (2016). Maxillary glandular odontogenic cyst: An uncommon entity at an unusual site. *Archives of Iranian Medicine*, 19(3), 221–224.
  16. Chen, B.; Wu, W.; Sun, W.; Zhang, Q.; Yan, F.; Xiao, Y. (2014). RANKL Expression in Periodontal Disease: Where Does RANKL Come from? *Biomed Res Int.* 4:150-159;
  17. Clinics, D, Prospects, D., & Article, O. (2014). CD56 Expression in Odontogenic Cysts and Tumors, 8(4).
  18. Contar, C. M. M., Thomé, C. A., Pompermayer, A., Sarot, J. R., Vinagre, R. O., & Machado, M. Â. N. (2015). Marsupialization of dentigerous cyst: report of a case. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 14(Suppl 1), 4–6.

19. Costa-Junior, F. R., Alvim-Pereira, C. C., Alvim-Pereira, F., Trevilatto, P. C., de Souza, A. P., & Santos, M. C. L. G. (2013). Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clinical Oral Investigations*, 17(1), 311–316.
20. Demiriz, L., Misir, A. F., & Gorur, D. I. (2015). Dentigerous cyst in a young child. *European Journal of Dentistry*, 9(4), 599–602.
21. Duong, L.T. (2012) Therapeutic inhibition of cathepsin K – reducing bone resorption while maintaining bone formation. *International Bone and Mineral Society*. 67;
22. Dutra, K. L., Cordeiro, M. M. R., Vieira, D. S. C., & Rivero, E. R. C. (2016). Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in ameloblastomas and pericoronal follicles. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 45(8), 586–590.
23. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 4th Lyon: IARC Press; 2017;
24. Evrosimovska, B., Dimova, C., Popovska, L., Bilbilova, E.Z. (2015) Matrix Metalloproteinase- 8 Gene Polymorphism in Chronic Periapical Lesions. *Sec. Of Med. Sci.* 36 (2);
25. Faisal, M., Ahmad, S. A., & Ansari, U. (2015). Glandular odontogenic cyst - Literature review and report of a paediatric case. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(3), 219–225.
26. Fowler, C. B., Brannon, R. B., Kessler, H. P., Castle, J. T., & Kahn, M. A. (2011). Glandular Odontogenic Cyst: Analysis of 46 Cases with Special Emphasis on Microscopic Criteria for Diagnosis. *Head and Neck Pathology*, 5(4), 364–375.
27. Gao, B.; Chen, W.; Hao, L.; Zhu, G.; Feng, S.; Ci, H., Zhou, X.; Stashenko, P.; Li, Y.P. (2013) Inhibiting Periapical lesions through AAV-RNAi silencing of Cathepsin K. *J Dent Res.* 92(2): 180 -186;
28. Gong, S., Han, X., Li, X., Yang, J., He, X., & Si, S. (2016). Development of a High-Throughput Screening Strategy for Upregulators of the OPG/RANKL Ratio with the Potential for Antiosteoporosis Effects. *Journal of Biomolecular Screening*, 21(7), 738–748.

29. Graves, D.T.; Oates, T.; Gartlet, G.P.(2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontics and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*. 3:5304;
30. Guerrini, M.M., Takayanagi, H. (2014). The immune system, bone and RANKL. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 561: 118-123;
31. Guha, M., Srinivasan, S., Koenigstein, A., Zaidi, M., & Avadhani, N. G. (2015). Enhanced osteoclastogenesis by mitochondrial retrograde signaling through transcriptional activation of the cathepsin K gene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 52–61.
32. Guimarães, D. M., Antunes, D. M., Saturno, J. L., Massuda, F., Paiva, K. B. da S., & Nunes, F. D. (2015). Immunohistochemical expression of WNT5A and MMPs in odontogenic epithelial tumors and cysts. *Acta Histochemica*, 117(8), 667–674.
33. Guruprasad, Y., & Chauhan, D. (2011). Glandular Odontogenic Cyst of Maxilla. *Journal of Clinical Imaging Science*, 1(3), 54.
34. Hao, L., Zhu, G., Lu, Y., Wang, M., Jules, J., Zhou, X., & Chen, W. (2015). Deficiency of cathepsin K prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role. *FEBS Letters*, 589(12), 1331–1339.
35. Hashmi, A. A., Edhi, M. M., Faridi, N., Hosein, M., & Khan, M. (2016). Multiple keratocystic odontogenic tumors (KCOT) in a patient with Gorlin syndrome: a case report with late presentation and absence of skin manifestations. *BMC Research Notes*, 9(1), 357.
36. Henriques, Á. C. G., Vasconcelos, M. G., Galvão, H. C., De Souza, L. B., & De Almeida Freitas, R. (2011). Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 112(4), 468–475.
37. Honma, M.; Ikebuchi, Y.; Kariva, Y.; Suzuki, H. (2014) Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors. *Curr Osteoporos Rep*.12(1):115-20;
38. Hua, Y., Robinson, T. J., Cao, Y., Shi, G. P., Ren, J., & Nair, S. (2015). Cathepsin K knockout alleviates aging-induced cardiac dysfunction. *Aging Cell*, 14(3), 345–351.

39. Jayam, C., Bandlapalli, A., Patel, N., & Choudhary, R. S. K. (2014). A case of impacted central incisor due to dentigerous cyst associated with impacted compound odontome. *BMJ Case Reports*, 2014, 1–4.
40. Jhamb, T., & Kramer, J. M. (2014). Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: Implications for therapeutics. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3), 345–353.
41. Kambalimath, D. H., Kambalimath, H. V, Agrawal, S. M., Singh, M., Jain, N., Anurag, B., & Michael, P. (2014). Prevalence and distribution of odontogenic cyst in Indian population: a 10 year retrospective study. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 13(1), 10–5.
42. Khajuria, N., Metgud, R., Naik, S., Lerra, S., Tiwari, P., Mamta, Tak, A. (2016). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous cyst, and radicular cyst: A comparative study. *Indian Journal of Dentistry*, 7(1), 17.
43. Kim, Y.S., Lee, S.K. (2014). Different Protein Expressions between Peripheral Ameloblastoma and Oral Basal Cell Carcinoma Occurred at The Same Mandibular Molar Area. *The Korean Journal of Pathology*, 48: 151- 158;
44. Kobayashi, Y.; Udagawa, N.; Takahashi, N. (2009) Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*.19(1): 61–72;
45. Kouhsoltani, M., Mesgarzadeh, A. H., Moradzadeh, U., Khiavi, M. (2015). Mandibular Fracture Associated with a Dentigerous Cyst: Report of a Case and Literature Review. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(3), 193–198.
46. Kumamoto, H. et al. Expression of Parathyroid Hormone- Related Protein (PTHrP) Osteoclast Differentiation Factor (ODF)/ receptor activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/ Osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. (2004). *J. Oral Pathol. Med.* 33. 46-52;
47. Lawal, A., Adisa, A., Kolude, B., & Adeyemi, B. (2015). Immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-8 in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(2), e203–e207.

48. Leung, P., Pichrsky, M., Zhuo, Y.; Masarachia, P.J., Duong, L.T. (2011). The effects of the cathepsin k inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. *Bone*. 49: 623-635;
49. Leung, Y. Y., Lau, S. L., Tsoi, K. Y. Y., Ma, H. L., & Ng, C. L. (2016). 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*, 45(9), 1154–1158.
50. Liu, W. W., Xu, Z. M., Li, Z. Q., Zhang, Y., & Han, B. (2015). RANKL, OPG and CTR mRNA expression in the temporomandibular joint in rheumatoid arthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(3), 895–900.
51. Maltoni, I., Santucci, G., Maltoni, M., Zoli, L., Perri, A., & Gracco, A. (2015). Recovering teeth from a large dentigerous cyst: A case report. *International Orthodontics*, 13(2), 232, 244.
52. Manjunatha, B., Harsh, A., Purohit, S., & Naga, M. (2015). Adenomatoid odontogenic tumor associated with a dentigerous cyst. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(3), 649.
53. Mascitti, M., Santarelli, A., Sabatucci, A., Procaccini, M., Lo Muzio, L., Zizzi, A., & Rubini, C. (2014). Glandular odontogenic cyst: review of literature and report of a new case with cytokeratin-19 expression. *Open Dent J*, 8, 1–12.
54. Matos, F. R., De Moraes, M., Das Neves Silva, E. B., Galvão, H. C., & De Almeida Freitas, R. (2013). Immunohistochemical detection of receptor activator nuclear  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in odontogenic cysts and tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 71(11), 1886–1892.
55. Menezes, R.; Bramante, C.M.; Paiva, K.B.; Letra, A.; Carneiro, E.; Zambuzzi, W.; Granjeiro, J.M. (2006) Receptor activator NF $\kappa$ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 102: 404-9;
56. Milman, T., Ying, G.-S., Pan, W., & LiVolsi, V. (2016). Ameloblastoma: 25 Year Experience at a Single Institution. *Head and Neck Pathology*. 51(08), 67-72.
57. Motooka, N., Ohba, S., Uehara, M., Fujita, S., & Asahina, I. (2013). A case of glandular odontogenic cyst in the mandible treated with the dredging method. *Odontology*, 1–4.

58. Moraes, M.; Matos, F.R.; Souza, L.B.; Freitas, R.A.; Costa, A.L.L.C. (2011) Immunoexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 42: 468–473;
59. Morais, H.H.A., Vasconcellos, R.J.H., Santos, T.S., Queiroz, L.M.G., Silveira, E.J.D. (2012). Glandular Odontogenic Cyst: case report and review of diagnostic criteria. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 40: 46-50;
60. Omar, A.A.H., Haglund, C., Virolainen, S., Hayry, V., Atula, T. (2015). MMP-7, MMP-8 and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Oral and Maxillofacial Pathology.* 19 (4): 459-468;
61. Pogrel, M. A. (2015). The keratocystic odontogenic tumour (KCOT) - An odyssey. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,* 44(12), 1565–1568.
62. Probst, F. A., Probst, M., Pautke, C., Kaltsi, E., Otto, S., Schiel, Muller-Lisse, U. G. (2015). Magnetic resonance imaging: A useful tool to distinguish between keratocystic odontogenic tumours and odontogenic cysts. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,* 53(3), 217–222.
63. Rao, Q., Wang, Y., Xia, Q. Y., Shi, S. S., Shen, Q., Tu, P., Wu, B. (2014). Cathepsin K in the immunohistochemical diagnosis of melanocytic lesions. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology,* 7(3), 1132–1139;
64. Rechenberg, D.K.; Bostanci, N.; Zehnder, M.; Belibasakis, G.N. (2014) Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. *Cytokine.* 69:116–119;
65. Rong, F.; Bin, S.; Cheng-Fei, Z.; Ya-Lin, L.; Wei, X.; Qian-Qian, W.; Xing-Zhe, Y. (2011) Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J.* 124(14): 2162-2166;
66. Roochi, M. M., Tavakoli, I., Ghazi, F. M., & Tavakoli, A. (2015). Case series and review of glandular odontogenic cyst with emphasis on treatment modalities. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery,* 43(6), 746–750.
67. Rosa, M. R. P., Falco, A. S. C., Fuzii, H. T., da Silva Kataoka, M. S., Ribeiro, A. L. R., Boccardo, E., de Melo Alves Júnior, S. (2014). EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. *Tumor Biology,* 35(11), 11107–11120.

68. Sá, M. C., Matos, F.R., Conceição, T. S., Leitão, A. C. G. H., Freitas, R. A. (2016). Imunoexpression of Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ , interleukin 1-  $\alpha$  and interleukin-10 on odontogenic cysts and tumours. *International Endodontic Journal*.
69. Santos, S.C.L.T, Couto, L.A., Fonseca, J.M., Xavier, F.C.A., Figueredo, A.C.L., Freitas, V.S., Freitas, R.A., Santos, J.N., Henriques, A.C.G. (2017). Participation of osteoclastogenic factors in immunopathogenesis of human chronic periapical lesions. *J. Oral Pathol. Med.* (1-7).
70. Sara, F., Hendarmin, L., & Nakamura, S. (2006). Osteoprotegerin (OPG) binds with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): Suppression of TRAIL-induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncology*, 42(4), 415–420.
71. Sharifian, M. J., & Khalili, M. (2011). Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007. *Journal of Oral Science*, 53(3), 361–367.
72. Siar, C. H., Tsujigiwa, H., Ishak, I., Hussin, N. M., Nagatsuka, H., & Ng, K. H. (2015). RANK, RANKL, and OPG in recurrent solid/multicystic ameloblastoma: Their distribution patterns and biologic significance. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 119(1), 83–91.
73. Silva, T. A., Batista, A. C., Mendonça, E. F., Leles, C. R., Fukada, S., & Cunha, F. Q. (2008). Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 105(3), 333–341.
74. Sook, Y., Suk, K., & Lee, K. (2014). Different Protein Expressions between Peripheral Ameloblastoma and Oral Basal Cell Carcinoma Occurred at the Same Mandibular Molar Area, 151–158;
75. Stoelinga, P. J. W. (2012). The management of aggressive cysts of the jaws. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 11(1), 2–12.
76. Sun, H., Li, Q., Zhang, Y., Bi, Y., Li, X., Shu, Y., Ge, C. (2015). Regulation of OPG and RANKL expressed by human dental follicle cells in osteoclastogenesis. *Cell and Tissue Research*, 362(2), 399–405.
77. Suojanen, H., Letonem, N., Farkkila, E., Hietanem, J., Teronem, O., Sorsa, T., Hagstrom, J. Common Matrix Metalloproteinases (MMP8, -9, -25 and -26)



- Cannot explain dentigerous cyst expansion. (2014). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(9): 82-85;
78. Taghavi, N., Modabbernia, S., Akbarzadeh, A., & Sajjadi, S. (2013). Cyclin d1 expression in odontogenic cysts. *Türk Patoloji Dergisi*, 29(2), 101–7.
79. Tambawala, S. S., Karjodkar, F. R., Yadav, A., Sansare, K., & Sontakke, S. (2014). Glandular odontogenic cyst: A case report. *Imaging Science in Dentistry*, 44(1), 75–9.
80. Tekkesin, M. S., Mutlu, S., & Olgac, V. (2011). The Role of RANK/RANKL/OPG Signalling Pathways in Osteoclastogenesis in Odontogenic Keratocysts, Radicular Cysts, and Ameloblastomas. *Head and Neck Pathology*, 5(3), 248–253.
81. Thierbach, R., Maier, K., Sorsa, T., & Mäntylä, P. (2016). Peri-implant sulcus fluid (PISF) matrix metalloproteinase (MMP)-8 levels in peri-implantitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(5), ZC34-ZC38.
82. Tsilingaridis, G., Yucel-Lindberg, T., Concha Quezada, H., & Modéer, T. (2014). The relationship between matrix metalloproteinases (MMP-3, -8, -9) in serum and peripheral lymphocytes (CD8+, CD56+) in Down syndrome children with gingivitis. *Journal of Periodontal Research*, 49(6), 742–750.
83. Tsuchiya, M., Akiba, Y., Takahashi, I., Sasano, Y., Kashiwazaki, J., Tsuchiya, S., & Watanabe, M. (2008). Comparison of expression patterns of cathepsin-K and MMP-9 in odontoclasts and osteoclasts in physiological root resorption in the rat molar. *Archives of Histology and Cytology*, 71(2), 89–100.
84. Wahlgren, J., Maisi, P., Sorsa, T., Sutinen, M., Tervahartiala, T., Pirillo, E., Salo, T. (2001). Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *Journal of Pathology*, 194(2), 217–224.

## 9 ANEXO

