



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO



**KARINA HELEN MARTINS**

**Miofibroblastos estromais em correlação com inflamação e dente impactado em cistos odontogênicos: um estudo imunohistoquímico comparativo**



Ribeirão Preto

2023

**KARINA HELEN MARTINS**

**Miofibroblastos estromais em correlação com inflamação e dente impactado em cistos odontogênicos: um estudo imunohistoquímico comparativo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.  
Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andiará De Rossi Daldegan

**VERSÃO CORRIGIDA**

Ribeirão Preto  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida da Dissertação.

A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o programa.

Martins, Karina Helen

Miofibroblastos estromais em correlação com inflamação e dente impactado em cistos odontogênicos: um estudo imuno-histoquímico comparativo. Ribeirão Preto, 2023.

34 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dra. Andiara de Rossi Daldegan.

1. Miofibroblastos. 2. Cistos Odontogênicos. 3. Dente impactado. 4. Inflamação. 5. Imunohistoquímica.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**KARINA, KH. Miofibroblastos estromais em correlação com inflamação e dente impactado em cistos odontogênicos: um estudo imunohistoquímico comparativo.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.  
Área de Concentração: Odontopediatria.

Aprovado em: \_\_/\_\_/2023

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andiara De Rossi Daldegan – Orientadora e Presidente da banca examinadora.

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho primeiramente à Deus. Agradeço a tudo que tens feito em minha vida: pela alegria de viver, pela minha família, pela minha saúde, amigos e todas as oportunidades que encontro na minha vida.

Aos meus pais, por todo apoio e dedicação para que esse momento fosse possível.

Vocês são meu espelho e exemplo de educação, amor, lealdade e honestidade.

Obrigada por cada momento e oportunidades que me proporcionaram, sou extremamente feliz em tê-los como meus pai.

À toda minha família que são fundamentais e contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, que foi essencial para a minha formação, experiências e me proporcionou tantas amizades inesquecíveis.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora **Profª. Drª Raquel Assed Bezerra Segato**.

À **CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela bolsa concedida – Código de financiamento 001.

Ao **Programa de pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, pelo empenho e todo o conhecimento que adquiri dentro deste programa.

À minha orientadora, **Profª. Drª. Andiarra de Rossi Daldegan**, por me acolher, ensinar, e exercer essa função tão bem. Você foi essencial para a minha evolução e sempre será uma inspiração.

Ao **Prof. Dr. Jorge Esquiché Leon**, por todos os ensinamentos, disposição e empenho para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

À minha querida amiga, **Isabella Consolo Holanda**, por ser meu apoio dentro da pós-graduação do início ao fim. Obrigada pelas trocas de experiências ao longo dessa jornada acadêmica.

Ao **Evânio Vilela**, pelo companheirismo, risadas e toda paciência em me ensinar. Sem você esse trabalho não seria possível. Te admiro como profissional e pessoa, você fará muita falta!

À minha amiga, **Julia Biliato**, que foi minha parceira de pesquisa e risadas, sem você eu não conseguiria. Você é brilhante!

À **Magdalena Torres**, amiga querida, que traz paz e conforto com suas palavras. Parceira de pesquisa e laboratório, muito obrigada pela caminhada juntas.

A todos os funcionários do **Laboratório de Imunopatologia** pela colaboração durante a fase de pesquisa.

Aos colegas de mestrado e aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela convivência, conversas e momentos compartilhados.

MARTINS, KH. **Miofibroblastos estromais em correlação com inflamação e dente impactado em cistos odontogênicos: um estudo imunohistoquímico comparativo.** Ribeirão Preto, 2022. 34p. Dissertação. (Mestrado em odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2023.

## RESUMO

Miofibroblastos estromais podem atuar favorecendo o crescimento e progressão de lesões odontogênicas, mais comumente do ceratocisto odontogênico (CO). Embora pouco explorado, foi demonstrado que o CO associado a um dente impactado tem uma tendência de crescimento rápido. Não se sabe se esse achado está associado à expressão diferencial de imunomarcadores de miofibroblastos. Treze casos de cada, folículo pericoronário (FP), cisto dentífero inflamado (CDI), cisto dentífero não inflamado (CDN), ceratocisto odontogênico associado a (CO-A) ou não associado (CO-N) a dente impactado, foram avaliados através dos imunomarcadores: vimentina,  $\alpha$ -SMA, calponina e h-caldesmon. Os dados obtidos foram analisados pelos testes Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e Dwass-Steel-Critchlow-Fligner Multiple Comparisons, sendo  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Todos os casos foram positivos para vimentina, com poucos casos exibindo expressão leve. Todos os FPs foram negativos para  $\alpha$ -SMA. COs mostraram expressão significativamente maior de  $\alpha$ -SMA do que CDs ( $p < 0,05$ ). Com expressão semelhante entre os grupos CD, a expressão de  $\alpha$ -SMA foi maior em CO-A do que em CO-N ( $p = 0,882$ ). Além disso, a idade média de CO-A foi significativamente menor do que pacientes com CO-N. Apenas 4 casos (1 CDI, 3 CO-N) mostraram leve expressão de calponina. Todos os casos foram negativos para h-caldesmon. Nossos resultados sugerem falta de diferenciação miofibroblástica em FPs. A inflamação não parece influenciar a população de miofibroblastos nos CDs. Embora não significativa, uma maior expressão de  $\alpha$ -SMA pode explicar as características clinicopatológicas dos pacientes CO-A. A calponina parece não ser um marcador confiável para miofibroblastos nesses casos.

**Palavras chaves:** Miofibroblastos. Cistos odontogênicos. Dente impactado. Inflamação. Imunohistoquímica.



Martins, KH. **Stromal myofibroblasts in correlation with inflammation and impacted tooth in odontogenic cysts: an immunohistochemical comparative study.** Ribeirão Preto, 2022. 34p. Dissertation. (Master in Pediatric Dentistry) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo; 2023.

### **ABSTRACT**

Stromal myofibroblasts may act favoring growth and progression of odontogenic lesions, notably odontogenic keratocyst (OKC). While little explored the associated inflammation, it has been shown that OKC associated with an impacted tooth has a tendency toward rapid growth. Whether this finding is associated with the differential expression of myofibroblast immunomarkers, is unknown. Thirteen cases of each, pericoronal follicle (PF), inflamed dentigerous cyst (iDC), noninflamed DC (nDC), OKC associated with (OKC-A) or not associated (OKC-N) with impacted tooth, were evaluated through vimentin,  $\alpha$ -SMA, calponin and h-caldesmon immunomarkers. The data obtained were analyzed using the Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis and Dwass-Steel-Critchlow-Fligner Multiple Comparisons tests, with  $p < 0.05$  being considered statistically significant. All cases were vimentin positive, with few cases exhibiting mild expression. All PFs were  $\alpha$ -SMA negative. OKCs showed significant higher expression of  $\alpha$ -SMA than DCs ( $p < 0.05$ ). With similar expression between DC groups, the  $\alpha$ -SMA expression was higher in OKC-A than OKC-N ( $p = 0.882$ ). Also, the mean age of OKC-A was significantly lower than OKC-N patients. Only 4 cases (1 iDC, 3 OKC-N) showed mild expression of calponin. All cases were h-caldesmon negative. Our results suggest lack of myofibroblastic differentiation in PFs. Inflammation does not seem to influence the myofibroblast population in DCs. Although not significant, a higher expression of  $\alpha$ -SMA can explain the clinicopathological features of OKC-A patients. Calponin seems not to be a reliable marker for myofibroblasts in these cases.

**Keywords:** Myofibroblasts. Odontogenic cysts. Impacted tooth. Inflammation. Immunohistochemistry.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Equipe e Procedimentos Éticos .....	16
3.2 Seleção das Amostras .....	16
3.3 Análise histopatológica.....	17
3.4 Estágio morfológico e classificação.....	17
3.5 Imuno-histoquímica.....	17
3.6 Análise das reações de imuno-histoquímica .....	18
3.7 Análise estatística .....	19
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Achados clinicopatológicos .....	20
4.2 Expressão de $\alpha$ -SMA.....	20
4.3 Expressão de calponina .....	23
4.4 Expressão de h-caldesmon .....	23
4.5 Expressão de vimentina .....	23
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO A: APROVAÇÃO DO CEP.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O folículo pericoronário (FP) é uma estrutura presente em dentes não irrompidos ou impactados, composto por tecido conjuntivo fibroso e remanescentes embrionários do epitélio odontogênico que frequentemente são apontados como predecessores para o desenvolvimento de lesões císticas odontogênicas (Villalba et al., 2012; Franzolin et al., 2019; Rajabi-Moghaddam; Mozafari; Abbaszadeh, 2022). Entre essas lesões as mais citadas são os cistos dentígeros (CD), ceratocistos odontogênicos (CO) e ameloblastomas (Glosser e Campbell, 1999; Baumgart et al., 2007; Saravana e Subhashraj, 2008). No entanto o potencial proliferativo do epitélio odontogênico em FP ainda não é totalmente esclarecido (de Oliveira et al., 2011). O FP é a estrutura responsável pelo desenvolvimento do dente e dos tecidos periodontais, além de promover o processo de erupção dentária (Bastos; Gomez; Gomes, 2022). Sua espessura é vista radiograficamente por volta de 2 a 3mm e quando maior que 5mm sugere-se o diagnóstico diferencial com CD (Saravana e Subhashraj, 2008; Schmitd et al., 2014). Essa estrutura associada ao atraso ou falha na erupção dentária, acomete principalmente indivíduos jovens, mas pode ser encontrada em qualquer idade, afetando mais comumente os primeiros e segundos molares permanentes (Schmitd et al., 2014).

O CD associado a coroa de dentes não irrompidos, é um dos cistos odontogênicos mais prevalentes na cavidade bucal e pode apresentar diferentes manifestações, graus de agressividade e comprometimento de estruturas adjacentes (Morgan, 2011; Anusai et al., 2021). Esta condição pode ser decorrente de um acúmulo de líquido entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e a coroa do dente incluso ou de condições inflamatórias, o que pode ocorrer principalmente em crianças (Huang et al., 2019). Benn e Altini (1996), relataram que o CD de origem inflamatória ocorre como resultado de uma inflamação periapical, frequentemente, em estreita associação com um dente decíduo não vital, a qual se espalha e atinge o folículo do dente permanente sucessor.

Clinicamente, o CD é assintomático, sendo detectado durante o exame radiográfico de rotina ou na investigação das causas da erupção tardia de um dente permanente (El-Naggar et al., 2017) e, ocasionalmente, pode haver exacerbação

inflamatória aguda levando ao aparecimento de sintomas clínicos. Dependendo do seu comportamento biológico e invasividade, podem causar destruição óssea, reabsorção ou deslocamento de dentes adjacentes (Rajendra Santosh, 2020). Radiograficamente, é possível observar uma margem radiolúcida unilocular bem demarcada, circundando a coroa do dente (Mckinney e Lukes, 2021). Cerca de 75% dos DC são associados aos terceiros molares inferiores não irrompidos, seguido por caninos superiores, terceiros molares superiores, segundos molares inferiores e pré-molares inferiores quando presente inflamação (Shetty e Dixit, 2010; Lacerda et al., 2018; Ghafouri-Fard; Atarbashi-Moghadam; Taheri, 2021). A histologia típica mostra uma parede de tecido fibroso frouxo não inflamada, podendo muitas vezes apresentar uma aparência ligeiramente mixóide, epitélio de revestimento com espessura aproximada de 2 a 4 camadas de células. Quando o CD está inflamado, a histologia mostra uma hiperplasia epitelial com cristais de colesterol adjacentes (El- Nagggar et al., 2017).

Os ceratocistos odontogênicos (CO) compreendem cerca de 10 a 20% dos cistos odontogênicos, sendo o terceiro cisto mais comum nos maxilares, acometendo uma ampla faixa etária de pacientes, com pico de incidência na segunda a terceira década de vida, leve predileção por homens e crianças são raramente acometidas. (El-Nagggar et al., 2017). Nas edições mais recente da Classificação da OMS de Tumores de Cabeça e Pescoço concluiu-se que não há evidências suficientes para suportar uma origem neoplásica dos COs e embora sejam definidos como benignos, podem apresentar um comportamento clínico local agressivo e com risco de recorrência em comparação com os demais cistos odontogênicos (Syamala et al., 2016; El- Nagggar et al., 2017; Loreto et al., 2022; Odell, Muller, Tilakaratne, 2022). Radiograficamente, é possível notar imagens radiolúcidas uniloculares ou multiloculares bem definidas e com borda radiopaca periférica evidente (Ribeiro et al., 2017). Aproximadamente, 35% dos casos de OKC estão associados com um dente incluso, tornando o diagnóstico diferencial com DC essencial (Morgan, 2011; Bilodeau e Hunter, 2021; Odell, Muller, Tilakaratne, 2022).

As características histopatológicas mostram uma cápsula cística composta por tecido conjuntivo calagenoso, revestida por um epitélio paraqueratinizado com espessura de 5 a 8 camadas de células e camada basal empilhada. Mesmo sendo um cisto odontogênico benigno, figuras mitóticas podem ser vistas, e as lesões inflamadas

apresentam características de epitélio escamoso estratificado inespecífico com hiperplasia. Ocasionalmente, os OKCs podem apresentar uma variante que é chamada de sólida, na qual ilhas epiteliais são vistas com lumem pouco definido e preenchido por paraceratina em um denso estroma. No caso desta variante a importância para se realizar um bom diagnóstico é essencial, pois pode diminuir o risco de recorrências (El-Naggar et al., 2017).

O tecido conjuntivo estromal desempenha uma função fundamental na manutenção dos tecidos epiteliais, sendo o fibroblasto a principal célula constituinte desse tecido (Syamala et al., 2016; Loreto et al., 2022). Estudos realizados nas últimas décadas revelaram que a modulação das células fibroblásticas para o fenótipo miofibroblástico, são essenciais para a remodelação do tecido conjuntivo durante os processos de cicatrização normal e patológicos (Lombardi e Morgan, 1995; Bilodeau e Hunter, 2021). A presença desses componentes celulares podem desempenhar um papel crítico no crescimento e comportamento das lesões císticas odontogênicas (Tomasek et al., 2002; Souza-Neto et al., 2016; Pereira et al., 2018; Anusai et al., 2021; Loreto et al., 2022). Durante um processo patológico os miofibroblastos (MFs) atuam na síntese da matriz extracelular (MEC) e na geração de força, resultando na reorganização da MEC e contração tecidual durante a cicatrização de feridas (Vered et al., 2005). Antigamente acreditava-se que a presença de numerosos MF em patologias, faziam parte do mecanismo de defesa do hospedeiro, mas com os avanços dos estudos, evidenciou-se que os MF são os principais impulsionadores da reação estromal contra tumores promovendo o crescimento e a invasão tumoral (Syamala et al., 2016; Ribatti e Tamma, 2019). Por tanto, na grande maioria dos tecidos saudáveis a presença de MF é escassa ou ausente, essas células podem ser detectadas no fibroma de células gigantes, lesão periférica de células gigantes, hiperplasia gengival induzida por ciclosporina A e fascíte nodular, bem como podem ser detectados na cápsula cística favorecendo o crescimento de cistos odontogênicos (Vered et al., 2005; Hinz, 2016, Annegowda et al., 2018).

Através da introdução de marcadores de diferenciação, principalmente marcadores do citoesqueleto, é possível a caracterização fenotípica dessa célula que possui características semelhantes a células musculares lisas e atividade altamente contrátil (Lombardi e Morgan, 1995). Em grande maioria os MF expressam a alfa actina

de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que é a isoforma da actina encontrada nas células do músculo liso vascular. A  $\alpha$ -SMA não é apenas um marcador de MF, sua incorporação nas fibras de estresse celular, lhes confere o fenótipo altamente contrátil. (Vered et al., 2005; Ribatti e Tamma, 2019; Hinz, 2020). A vimentina é um filamento de proteína do tipo III que é amplamente expressa em células de origem mesenquimal, células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas vasculares, macrófagos e linfócitos (Zhou et al., 2015; Aggarwal et al., 2021). A expressão da vimentina foi constatada nas células do tecido conjuntivo e de forma mais intensa nas células endoteliais de algumas lesões odontogênicas, inclusive do CD e CO (Lombardi e Morgan, 1995; Sudhakara et al., 2016).

A calponina é uma proteína homóloga do citoesqueleto que se liga à actina originalmente encontrada no músculo liso (Hsieh e Jin, 2023). Embora a expressão da calponina seja altamente específica para células musculares lisas, estudos recentes mostram que a calponina é expressa em alguns tipos de células mesenquimais não musculares, porém sua função nessas células ainda não está clara (Choo et al., 2022). H-caldesmon é uma isoforma de alto peso molecular da proteína caldesmon, identificada com expressão restrita em células musculares lisas viscerais e vasculares (Nucci et al., 2001). Na literatura essa proteína é relatada auxiliando na distinção entre tumores de músculo liso de lesões miofibroblásticas (Ceballos et al., 2000).

Enquanto o imunomarcador  $\alpha$ -SMA é rotineiramente utilizado, a expressão da calponina é pouco explorada (Gratzinger et al., 2008). De fato, foi demonstrado que a expressão de marcadores de miofibroblastos é maior em CO do que em CD (Nadalin et al., 2012; Syamala et al., 2016; Annegowda et al., 2018; Pereira et al., 2018; Anusai et al., 2021; Ahmad et al., 2022). Além disso, um estudo interessante avaliando os COs associados e não associados a terceiros molares inferiores impactados, mostrou que a idade dos pacientes e a área de cistos são menores e maiores, respectivamente (Tsukamoto et al., 2002). Nesses casos, a expressão diferencial dos marcadores miofibroblásticos é desconhecida. Portanto a investigação de MFs nesses casos e nas demais lesões odontogênicas foi realizada neste estudo.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é avaliar a imunoexpressão de vimentina,  $\alpha$ -SMA, calponina e h-caldesmon em FPs (grupo controle), CDs (com e sem inflamação) e COs (com e sem associação de dente incluso).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Equipe e Procedimentos Éticos**

Este trabalho foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Jorge Esquiché León da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) e do Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR/UNESP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho, sob os números: 5.579.546 Parecer Plataforma Brasil/Certificado de Apreciação Ética (CAAE): 59880222.4.0000.5416 (Anexo A). Todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para uso dessas amostras com finalidade acadêmica e/ou científica e os procedimentos realizados em estudo envolvendo participantes humanos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional.

#### **3.2 Seleção das Amostras**

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microscopia, Histopatologia e Imunopatologia e Análise Genética, do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal (DESCOL) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Um estudo retrospectivo foi realizado, cujos dados clínicos (exames de imagem, diagnóstico condições de saúde e dente afetado) e epidemiológicos (idade e sexo) foram obtidos dos formulários clínicos de encaminhamento. Sessenta e cinco amostras parafinadas diagnosticado com FP, CD e CO foram selecionados e divididas em grupos: FPs (n=13); CDs (n=26) compostas por CD inflamado (CDI) (n=13) e não inflamado (CDN, n=13); COs únicos esporádicos (n=26), sem associação com dente impactado (CO-N, n=13) e com associação com dente impactado (CO-A, n=13).

Os critérios de inclusão foram casos de FP, CD e CO que apresentaram informações clínicas completas, com disponibilidade de material arquivado em parafina, suficiente para confirmação histopatológica e para novos cortes histológicos,



os quais foram utilizados nas reações de imunohistoquímica. Os critérios de exclusão foram quaisquer casos com falta de informações clínicas completas, blocos com qualidade e quantidade insuficientes para a realização das análises do estudo e qualquer caso associado com síndromes genéticas.

### **3.3 Análise histopatológica**

A partir do material existente nos blocos de parafina, foram realizados dois novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H&E), e posteriormente analisados para descrição morfológica dos cortes convencionais e confirmação do diagnóstico.

### **3.4 Estágio morfológico e classificação**

Os cortes de H&E foram analisados e descritos detalhadamente para caracterizar os seus componentes microscópicos e classificá-los como FP, CD e CO (OMS, 2017).

### **3.5 Imunohistoquímica**

As reações de imunohistoquímica (IHQ) foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Jorge Esquiche León (Professor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP). Para as reações de imunohistoquímica foram realizados cortes histológicos de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako) para avaliar os anticorpos primários: actina de musculo liso, calponina, h-caldesmon e vimentina (tabela 2). Em seguida, as amostras foram hidratadas em soluções com concentrações decrescentes de etanol (90%, 70% e 50%) e depois lavadas com água destilada por dois minutos. O procedimento para a recuperação

antigênica foi realizado em solução aquosa de 10 mM ácido cítrico pH 6,0 em panela de pressão por 7 minutos. Após o resfriamento do material, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com incubação com peróxido de hidrogênio 0,1% por 5 min. Após, lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, os cortes foram então incubados com os diferentes anticorpos primários devidamente diluídos, em câmara úmida por 18h a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi adicionado (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) e incubação foi feita durante 30 min a 37°C, seguida de lavagem com PBS. Em seguida, foi realizada a exposição ao sistema amplificação (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) por 30 min a 37°C. A revelação foi realizada em solução contendo 120 mg de 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB, SigmaAldrich, EUA) diluído em 200 ml de PBS, 2 ml de peróxido de hidrogênio (10 volumes) e 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C durante 3 min. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Carrazi durante 5 minutos, seguida de lavagens em água corrente por 8 minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em três trocas rápidas de álcoois absolutos, passadas em xilol de diafanização e de montagem. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan Merck e com lamínulas devidamente limpas.

**Tabela 2** – Lista de anticorpos primários com seus respectivos clones, fornecedores e diluição

Anticorpo	Diluição	Clone	Fornecedor
$\alpha$ -SMA	1:1000	1A4	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Calponina	1:800	BSB-20	Bio SB, Goleta, USA
H-caldesmon	1:800	BSB-19	Bio SB, Goleta, USA
Vimentina	1:1000	Vim 3B4	DakoCytomation, Glostrup, Denmark

$\alpha$ -SMA, alfa actina de músculo liso;

### 3.6 Análise das reações de imunohistoquímica

A imunoexpressão dos marcadores  $\alpha$ -SMA, calponina, h-caldesmon e vimentina foi analisada no tecido conjuntivo por meio da contagem do número total

de células positivas em 10 campos representativos de cada caso. As imagens foram obtidas utilizando o programa Leica LAS X Image Manage. Áreas com maior densidade de imunomarcção foram selecionadas e a porcentagem de células positivas foi registrada.

Para FPs e as lesões císticas, a contagem foi feita abaixo do epitélio de revestimento. A contagem foi realizada usando microscópio binocular com ocular x10 e objetiva x40. As células imunomarcadas foram identificadas em cada um dos dez campos escolhidos. As células positivas para  $\alpha$ -SMA, calponina e h-caldesmon na parede do vaso sanguíneo serviram como controle interno. As células em estreita relação com os vasos sanguíneos não foram contadas. Todas as outras células coradas positivamente em cada campo foram contadas e registradas. O número médio de células imunomarcadas também foi calculado.

A porcentagem de células positivas para vimentina,  $\alpha$ -SMA, calponina e h-caldesmon em cada grupo também foi calculada através do número de casos positivos e negativos.

### **3.7 Análise estatística**

Para análise estatística, Software Jamovi Version 2.3 (Jamovi, Sydney, Australia) foi utilizado. A distribuição normal dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk. O percentual de expressão de  $\alpha$ -SMA e vimentina foi comparado entre os grupos de FP, CDI, CDN, CO-A e CO-N usando o teste de Kruskal-Wallis. As comparações entre os grupos foram analisadas usando o teste de comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Um valor menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Achados clinicopatológicos

As características clínicas dos cistos odontogênicos estão resumidas na Tabela 2. A idade média dos pacientes foi descrita com a faixa etária de cada grupo analisado. A idade média de CO-A foi significativamente menor do que pacientes de CO-N ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 2** - Características clinicopatológicas de todos os casos incluídos neste estudo

Características clinicopatológicas	FP	CDI	CDN	CO-A	CO-N
No. casos	13	13	13	13	13
Idade (média)	19.2	32.1	33.1	20.5	42.5
	(intervalo 13-30)	(intervalo 9-68)	(intervalo 9-66)	(intervalo 14-34)	(intervalo 18-78)
Homens	6	9	10	10	10
Mulheres	7	4	3	3	3
Localização					
Maxila	10	4	3	3	0
Mandíbula	3	9	10	10	13

FP, foliculo pericoronário; CDI, cisto dentígero inflamado; CDN, cisto dentígero não inflamado; CO-A, ceratocisto odontogênico associado a dente impactado; CO-N, ceratocisto odontogênico não associado a dente impactado; CO-A vs CO-N (idade):  $p < 0.05$

### 4.2 Expressão de $\alpha$ -SMA

Todas as amostras de FP não apresentaram expressão de  $\alpha$ -SMA. Coloração moderada a forte foi observada em 11/13 CDIs, 12/13 CDNs, 10/13 CO-As e 12/13 CO-Ns (Tabela 3). Não houve diferença significativa na expressão de  $\alpha$ -SMA entre CDI e CDN, bem como CO-A e CO-N. No entanto, é necessário comentar que, embora tenha sido observada uma expressão de  $\alpha$ -SMA semelhante entre CDI e CDN, foi detectado um número maior de células positivas para  $\alpha$ -SMA em CO-A do que em CO-N ( $p = 0,882$ ) (Figura 1)

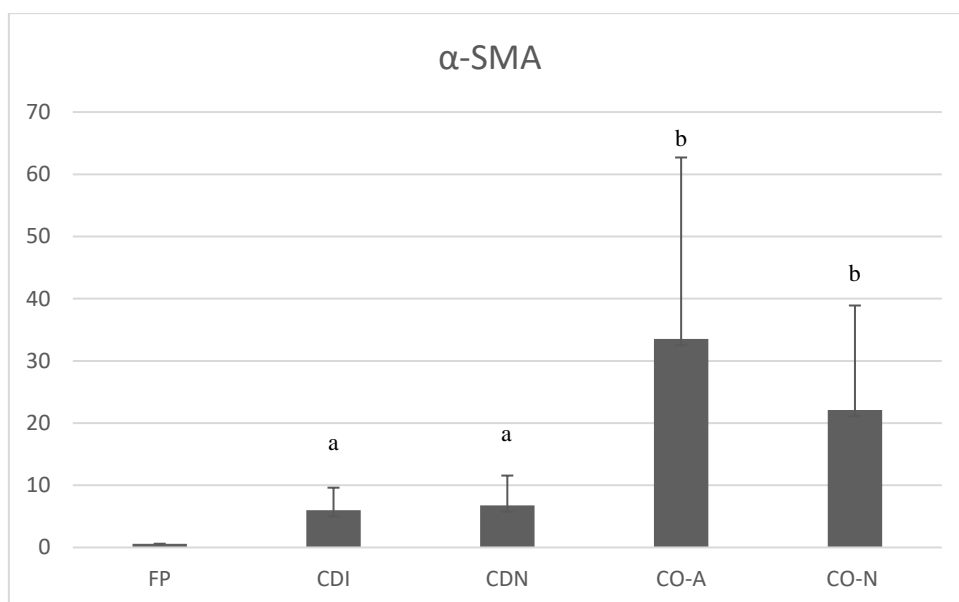
Apenas na comparação entre os grupos CD e CO, a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

Além da detecção de miofibroblastos, esse marcador também destacou as paredes dos vasos.

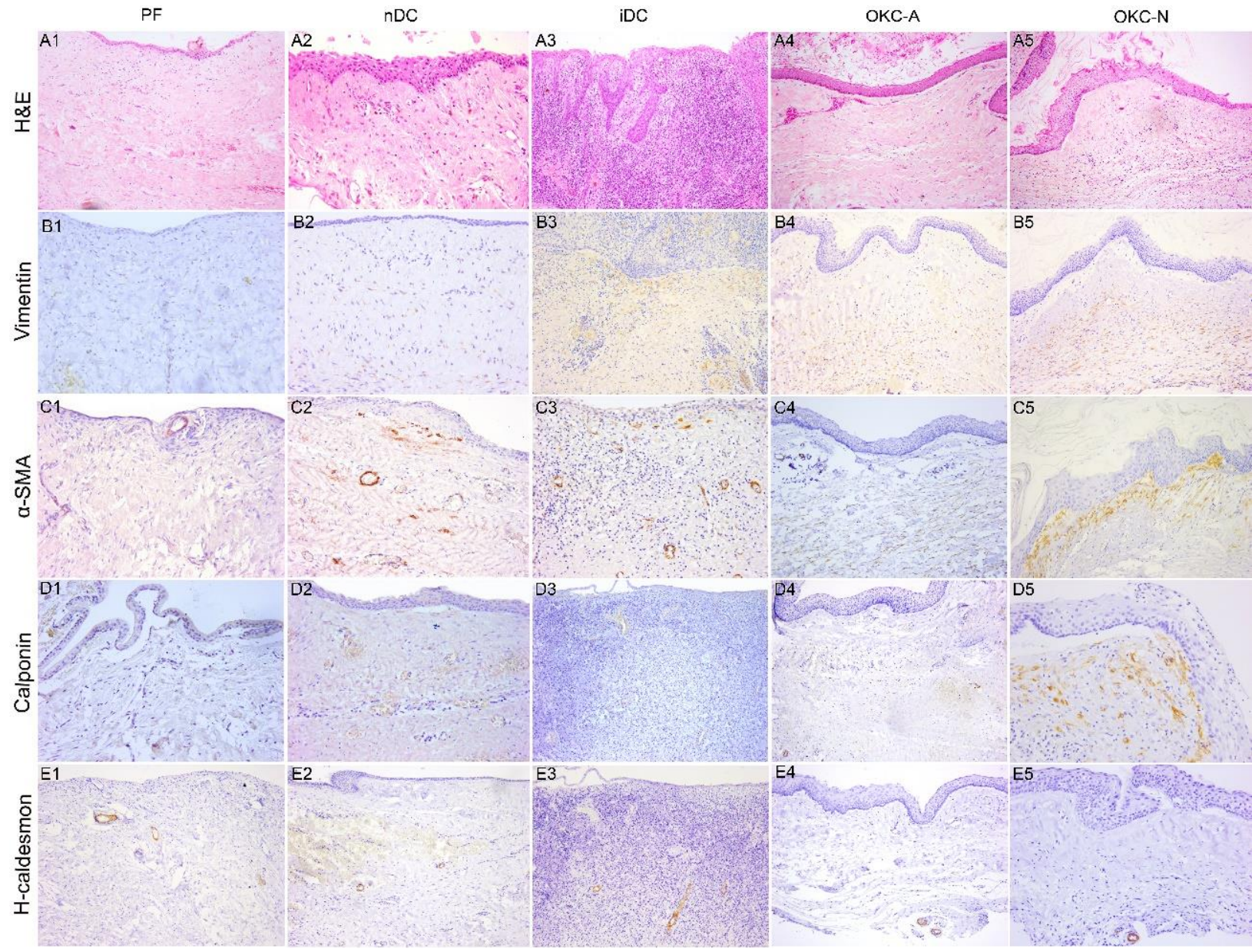
**TABELA 3** - Expressão de vimentina e  $\alpha$ -SMA dos casos avaliados por grupo

Marcadores	FP	CDI	CDN	CO-A	CO-N
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>					
N	0	11	12	10	12
Média $\pm$ DV	0	6.00 $\pm$ 3.61	6.75 $\pm$ 4.81	33.5 $\pm$ 29.2	22.1 $\pm$ 16.8
<b>Vimentina</b>					
N	9	11	13	11	11
Média $\pm$ DV	27.3 $\pm$ 36.5	65.5 $\pm$ 31.3	60.0 $\pm$ 28.6	51.4 $\pm$ 36.7	28.3 $\pm$ 27.0

FP, folículo pericoronário; CDI, cisto dentígero inflamado; CDN, cisto dentígero não inflamado; CO-A, ceratocisto odontogênico associado a dente impactado; CO-N, ceratocisto não associado a dente impactado;  $\alpha$ -SMA, alfa actina de músculo liso; Valores expressando a média  $\pm$  desvio padrão (%)

**FIGURA 1** - Gráfico mostrando a expressão diferencial de  $\alpha$ -SMA nos FPs, CDs e COs.

FP, folículo pericoronário; CDI, cisto dentígero inflamado; CDN, cisto dentígero não inflamado; CO-A, ceratocisto odontogênico associado a dente impactado; CO-N, ceratocisto não associado a dente impactado;  $\alpha$ -SMA, alfa-actina de músculo liso; Letras diferentes, minúsculas indicam que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )



**FIGURA 2** - Análise histopatológica e imuno-histoquímica através de cortes teciduais consecutivos (seriados) de folículo pericoronário (FP) (A1-E1), cisto dentígero não inflamado (CDN) (A2-E2), cisto dentígero inflamado (CDI) (A3-E3), ceratocisto odontogênico associado a dente impactado (CO-A) (A4-E4) e ceratocisto odontogênico não associado a dente impactado (CO-N) (A5-E5). Na linha B, o IHC para vimentina apresentou expressão em coloração moderada a forte em ambos os grupos, não encontrando diferenças estatísticas. Em C, a expressão de  $\alpha$ -SMA estava ausente em todas as amostras de FP (C1), enquanto os demais casos exibiram expressão de miofibroblastos, com coloração moderada a forte (C2-C5). A expressão da calponina foi observada apenas em 4 casos, sendo um caso no grupo CDI (D2) e 3 casos no grupo CO-N (D5), apresentando percentual de expressão na cápsula cística abaixo de 10%. Além disso, além de detectar miofibroblastos,  $\alpha$ -SMA e calponina também destacaram as paredes dos vasos (C e D). O h-caldesmon (E) foi expresso apenas por células musculares lisas vasculares. (As figuras A2, C2, C3, C5, D1, D2, D5 e E5 estão com aumento de 20x; as demais figuras estão com aumento original de 10x).

### **4.3 Expressão de calponina**

A expressão da calponina foi observada apenas em 4 casos. Um caso do grupo CDI e 3 casos do grupo CO-N apresentaram percentual de expressão na cápsula cística abaixo de 10%, não fornecendo dados suficientes para considerar a análise estatística (fig. 2).

Este marcador destacou principalmente as paredes dos vasos.

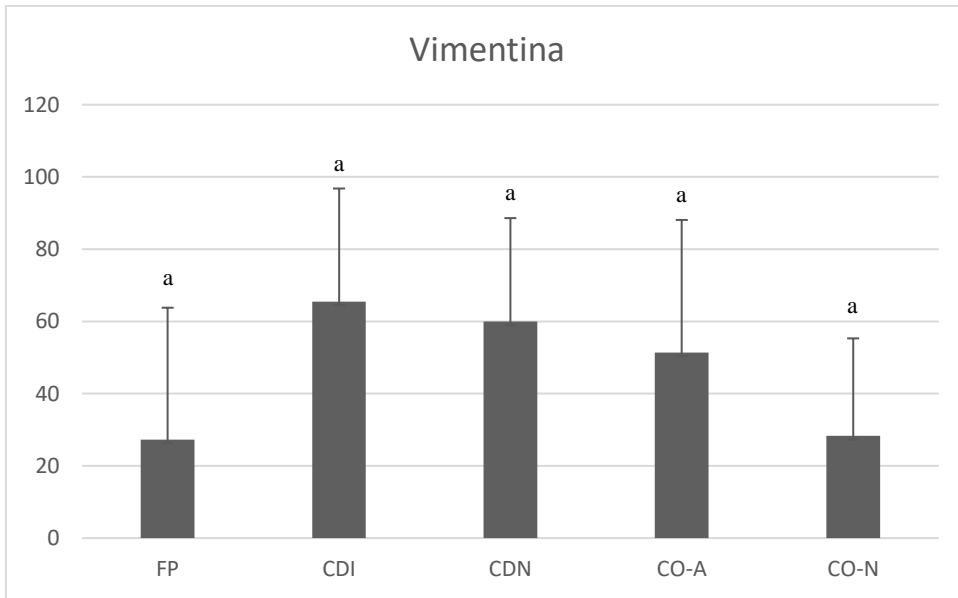
### **4.4 Expressão de h-caldesmon**

O h-caldesmon foi expresso apenas por células musculares lisas vasculares (Fig. 2).

### **4.5 Expressão de vimentina**

A expressão da vimentina, em coloração moderada a forte, foi observada em 9/13 FPs, 11/13 CDIs, em 13/13 CDNs, 11/13 CO-A e 11/13 CO-N (Tabela 3). Em relação à expressão homogênea de vimentina entre os grupos, não foram encontradas diferenças estatísticas (figs. 1 e 3).

**FIGURA 3** Gráfico mostrando a expressão diferencial de vimentina nos FPs, CDs e COs.



FP, fólculo pericoronário; CDI, cisto dentígero inflamado; CDN, cisto dentígero não inflamado; CO-A, ceratocisto odontogênico associado a dente impactado; CO-N, ceratocisto não associado a dente impactado;  $\alpha$ -SMA, alfa-actina de músculo liso. Letras minúsculas iguais não indicam diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

As células do estroma mantêm a homeostase do tecido por meio do controle sobre o tamanho, função e resposta da célula. Alterações no microambiente estromal resulta na presença de componentes celulares capazes de modificar a matriz extracelular em condições patológicas (Vered et al, 2005; Santos et al., 2017; Ahmad et al., 2022). Os COs apresentam características histopatológicas específicas, apresentando comportamento agressivo e tendência à recidiva em relação aos outros tipos de cistos (Rubini et al., 2011; Kaczmarzyk et al., 2018; Hoyos cadavid et al., 2018).

Em um estudo da literatura de Tsukamoto et al. (2002) em que avaliaram as diferenças de idade, área e forma periférica do CO associado a e não associado a um terceiro molar inferior, mostraram que a idade média de pacientes do grupo associado foi menor que do grupo não associado e a área média do grupo associado foi maior que do grupo não associado, sugerindo que um dente impactado e seu folículo dentário podem afetar a ocorrência e a proliferação de um CO. Já em outro estudo avaliando CD e CO associados a um terceiro molar inferior, a idade média dos pacientes do grupo CO foi menor que o grupo CD e a área média do grupo CO foi maior do que o CD, não houve correlações significativas entre as idades e as áreas nos grupos CD e CO. Esses achados sugerem que ambos os cistos não se desenvolvem gradualmente durante o período em que os folículos são formados, mas surgem em vários períodos aleatoriamente durante o curso da vida de um paciente (Tsukamoto et al., 2001). No presente estudo, foi avaliado a média de idade dos pacientes de todos os grupos, encontrando diferença estatística entre os grupos de CO-A e CO-N ( $p < 0,05$ ). Esses achados demonstram associação com os estudos existentes na literatura.

MFs são fibroblastos diferenciados que expressam  $\alpha$ -SMA e possuem características intermediárias entre fibroblastos convencionais e células musculares lisas (Hinz, 2020) sendo capazes de remodelar e degradar a matriz extracelular por meio da secreção de metaloproteínases da matriz, conduzindo o crescimento invasivo de lesões císticas odontogênicas (Roy e Gard, 2013). Os poucos estudos que

investigaram a presença de MFs em lesões odontogênicas sugerem que o aumento no número dessas células contribui para a progressão da lesão e comportamento biológico mais agressivo (Vered et al., 2005; Nadalin et al., 2012; Syamala et al., 2016; Dandena et al., 2017; Santos et al., 2017; Pereira et al., 2018; Pinisetti; Tadi; Manyam, 2022). Anusai et al. (2021) relataram que as interações das células epiteliais e estromais são fundamentais no controle do crescimento e comportamento clínico das lesões císticas odontogênicas e que os MFs são vistos em maior número em CO do que em CD. Esses achados imunohistoquímicos também são observados em outros estudos da literatura (Nadalin et al., 2012; Syamala et al., 2016; Annegowda et al., 2018; Pereira et al., 2018; Ahmad et al., 2022) e corroboram com os resultados do presente estudo, no qual foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de CD com inflamação e sem inflamação e CO com associação a dente impactado e sem associação ( $P < 0,05$ ) concordando que o crescimento e comportamento biológico agressivo é maior em CO do que em comparação com CD.

Os primeiros autores a investigar a presença de MFs em lesões odontogênicas foram Lombardi e Morgan (1995). Esses autores avaliaram a expressão de  $\alpha$ -SMA e Vimentina em diversas lesões císticas e em grupos controles, inclusive FP, nos quais não houve expressão significativa de  $\alpha$ -SMA. No entanto, o estudo de Oliveira Ramos et al. (2014) encontrou alta expressão de MFs usando a  $\alpha$ -SMA em casos de FP, associado à probabilidade de remodelação óssea que ocorre durante a formação e erupção dentária. De Souza-Neto et al. (2016) também avaliaram a expressão de  $\alpha$ -SMA na PF e encontraram o fenótipo miofibroblástico em todos os casos utilizados. No presente estudo, porém, não foi encontrada expressão de MFs nos casos de FP, apenas marcação de células musculares lisas vasculares. A falta de diferenciação miofibroblástica em FP parece ser consistente com a natureza e a função dessa estrutura.

Gratzinger et al. (2008) mencionam a calponina como uma proteína primária ligadora de actina de tecidos contendo músculos lisos e apresentam alguns estudos nos quais exibem características semelhantes à  $\alpha$ -SMA. Além disso, esses autores não encontraram casos positivos de calponina para CD e CO. Neste estudo, apenas 1 caso de CD e 3 casos de CO foram positivos para MF usando calponina, considerando, portanto, que a calponina não parece ser um marcador confiável para

miofibroblastos nesses casos. Não foram encontrados outros estudos avaliando a expressão da calponina em FP, CD ou CO. Da mesma forma, não foram encontrados estudos com a expressão de h-caldesmon nessas lesões císticas odontogênicas.

A vimentina é um filamento intermediário de classe II expresso principalmente no tecido mesenquimal (Sudhakara et al., 2016). Até o momento, apenas dois estudos forneceram dados sobre vimentina em lesões císticas odontogênicas (Lombardi e Morgan, 1995; Sudhakara et al., 2016). Neste estudo observa-se que todos os grupos apresentaram coloração positiva para vimentina, sendo que o grupo CDI possui maior quantidade de expressão, seguido por CDN, CO-A, CO-N e FP. Isso pode ser explicado pela presença do infiltrado inflamatório, aumentando o número dessas células. Porém, estatisticamente, não houve diferença entre todos os grupos comparados ( $P > 0,05$ ). No estudo de Loreto et al. (2022) no qual foi avaliada a presença de fibroblastos em variantes de CO, sugere-se que o comportamento biológico diferente dessas lesões não se deve à diferença no número dessas células, mas sim a sua atividade metabólica diferente. Assim, este estudo conclui que a falta de diferenciação miofibroblástica parece ser consistente com a natureza e função do FP. CO e CD apresentam expressão de SMA, visto que em CO (ainda, CO-A maior que CO-N) há maior expressão do fenótipo miofibroblástico do que no CD. Isso pode ajudar a explicar seus distintos potenciais de crescimento e agressividade.

## **6. CONCLUSÃO**

A falta de diferenciação miofibroblástica parece ser consistente com a natureza e função do FP. CO (ainda, CO-A do que CO-N) apresenta maior expressão de  $\alpha$ -SMA do que CD, o que pode ajudar a explicar seus distintos potenciais de crescimento. A inflamação não parece influenciar a população de miofibroblastos nos CDs. Embora não significativa, uma maior expressão de  $\alpha$ -SMA pode explicar as características clinicopatológicas dos pacientes com CO-A. A calponina parece não ser um marcador confiável para miofibroblastos nesses casos.

## REFERÊNCIAS

Aggarwal S, Singh B, Sharma SC, Das SN. Circulating Vimentin Over-Expression in Patients with Oral Sub Mucosal Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022 Dec;74(4):510-515.

Ahmad MA, Gupta AA, Mhaske SA, Saawarn S, Ashok S, Mandora D, Jain M. EXPRESSION OF ALPHA-SMOOTH MUSCLE ACTIN IN ODONTOGENIC CYSTS AND TUMORS. *Exp Oncol.* 2022 Nov;44(3):249-253.

Annegowda VM, Devi HU, Rao K, Smitha T, Sheethal HS, Smitha A. Immunohistochemical study of alpha-smooth muscle actin in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018 May-Aug;22(2):188-192.

Anusai VV, Shylaja S, Suvarna M, Ramanand OV, Reddy ES, Vamshi VR. Immunohistochemical evaluation of myofibroblasts in odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and different clinical variants of ameloblastoma: A comparative study. *Dent Res J (Isfahan).* 2021 May;24;18:36.

Bagul N, Ganjre A, Goryawala SN, Kathariya R, Dusane S. Dynamic role of myofibroblasts in oral lesions. *World J Clin Oncol.* 2015 Dec 10;6(6):264-71.

Bastos VC, Gomez RS, Gomes CC. Revisiting the human dental follicle: From tooth development to its association with unerupted or impacted teeth and pathological changes. *Dev Dyn.* 2022 Mar;251(3):408-423.

Benn A, Altini M. Dentigerous cysts of inflammatory origin. A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Feb;81(2):203-9.

Bilodeau EA, Hunter KD. Odontogenic and Developmental Oral Lesions in Pediatric Patients. *Head Neck Pathol.* 2021 Mar;15(1):71-84.

Ceballos KM, Nielsen GP, Selig MK, O'Connell JX. Is anti-h-caldesmon useful for distinguishing smooth muscle and myofibroblastic tumors? An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 2000 Nov;114(5):746-53.

Choo YY, Sakai T, Komatsu S, Ikebe R, Jeffers A, Singh KP, Idell S, Tucker TA, Ikebe M. Calponin 1 contributes to myofibroblast differentiation of human pleural mesothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022 Mar;322(3):L348-L364.

da Silva Baumgart C, da Silva Lauxen I, Filho MS, de Quadros OF. Epidermal growth factor receptor distribution in pericoronal follicles: relationship with the origin of odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Feb;103(2):240-5.

Dandena VK, Thimmaiah SY, Kiresur MA, Hunsigi P, Roy S, Rashmi M. A comparative study of odontogenic keratocyst and orthokeratinized odontogenic cyst using Ki67 and a smooth muscle actin. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017 Sep-Dec;21(3):458-459.

de Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'Ana Filho M. Odontogenic epithelium: immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Head Neck Pathol.* 2011 Mar;5(1):1-7.

de Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'Ana Filho M. Odontogenic epithelium: immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Head Neck Pathol.* 2011 Mar;5(1):1-7.

de Oliveira Ramos G, Costa A, Meurer MI, Vieira DS, Rivero ER. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinases (1, 2, and 9), Ki-67, and myofibroblasts in keratocystic odontogenic tumors and pericoronal follicles. *J Oral Pathol Med.* 2014 Apr;43(4):282-8.

El- Naggat AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slook PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th Edition. Lyon: IARC; 2017. p. 234-235.

Franzolin SOB, Pardini MIMC, Francischone LA, Deffune E, Consolaro A. Explanation for the signs and symptoms of tooth eruption: mast cells. *Dental Press J Orthod.* 2019 May;24(2):20-31.

Ghafouri-Fard S, Atarbashi-Moghadam S, Taheri M. Genetic factors in the pathogenesis of ameloblastoma, dentigerous cyst and odontogenic keratocyst. *Gene.* 2021 Mar;771:145369.

Glosser JW, Campbell JH. Pathologic change in soft tissues associated with radiographically 'normal' third molar impactions. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Aug;37(4):259-60.

Gratzinger D, Salama ME, Poh CF, Rouse RV. Ameloblastoma, calcifying epithelial odontogenic tumor, and glandular odontogenic cyst show a distinctive immunophenotype with some myoepithelial antigen expression. *J Oral Pathol Med.* 2008 Mar;37(3):177-84.

Hinz B, Lagares D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2020 Jan;16(1):11-31.

Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016 Jan;142:56-70.

Hoyos Cadavid AM, Kaminagakura E, Rodrigues MFSD, Pinto CAL, Teshima THN, Alves FA. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins

(Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig*. 2019 Jan;23(1):153-159.

Hsieh TB, Jin JP. Evolution and function of calponin and transgelin. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Jun 8;11:1206147.

Huang G, Moore L, Logan RM, Gue S. Histological analysis of 41 dentigerous cysts in a paediatric population. *J Oral Pathol Med*. 2019 Jan;48(1):74-78.

Kaczmarzyk T, Kisielowski K, Koszowski R, Rynkiewicz M, Gawełek E, Babiuch K, Bednarczyk A, Drozdowska B. Investigation of clinicopathological parameters and expression of COX-2, bcl-2, PCNA, and p53 in primary and recurrent sporadic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig*. 2018 Dec;22(9):3097-3106.

Lacerda EPM, Martorelli SBF, Martorelli FO. Dentigerous cyst in the maxillary posterior region associated with an impacted deciduous molar. *RGO, Rev Gaúch Odontol*. 2018 Jun;66(2):194-198.

Lombardi T, Morgan PR. Immunohistochemical characterisation of odontogenic cysts with mesenchymal and myofilament markers. *J Oral Pathol Med*. 1995 Apr;24(4):170-6.

Loreto C, Polizzi A, Filetti V, Pannone G, Dos Santos JN, Venezia P, Leonardi R, Isola G. Expression of Matrix Metalloproteinases 7 and 9, Desmin, Alpha-Smooth Muscle Actin and Caldesmon, in Odontogenic Keratocyst Associated with NBCCS, Recurrent and Sporadic Keratocysts. *Biomolecules*. 2022 Jun;12(6):775.

McKinney SL & Lukes SM. Dentigerous cyst in a young child: a case report. *Can J Dent Hyg*. 2021 Oct;55(3):177-181.

Morgan PR. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol 2000*. 2011 Oct;57(1):160-76.

Nadalin MR, Fregnani ER, Silva-Sousa YT, da Cruz Perez DE. Presence of myofibroblasts and matrix metalloproteinase 2 in radicular cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors: a comparative immunohistochemical study. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1363-7.

Nucci MR, O'Connell JT, Huettner PC, Cviko A, Sun D, Quade BJ. h-Caldesmon expression effectively distinguishes endometrial stromal tumors from uterine smooth muscle tumors. *Am J Surg Pathol*. 2001 Apr;25(4):455-63.

Odell EW, Muller S, Tilakaratne WH (2022) Chapter 8: Odontogenic and maxillofacial bone tumours. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumors. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; forthcoming. (WHO classification of tumours series, 5<sup>th</sup> ed.; vol. 9). ed. Wiley, <https://publications.iarc.fr>.

Pereira JDS, de Oliveira Nóbrega FJ, Vasconcelos RG, de Souza Martins Câmara AC, de Souza LB, Queiroz LMG. Myofibroblasts and mast cells: influences on biological behavior of odontogenic lesions. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Jun;34:66-71.

Pinisetti S, Tadi D, Manyam R. Myofibroblasts in Odontogenic Cysts and Tumors: An Immunohistochemical Study. *J Microsc Ultrastruct*. 2022 Jun 6;11(1):68-73.

Rajabi-Moghaddam M, Mozafari G, Abbaszadeh H. Central odontogenic fibroma, hyperplastic dental follicle, or dentigerous cyst? A diagnostic dilemma: A case report. *Clin Case Rep*. 2022 Jul;10(7):e6163.

Rajendra Santosh AB. Odontogenic Cysts. *Dent Clin North Am*. 2020 Jan;64(1):105-119.

Ribatti D, Tamma R. Giulio Gabbiani and the discovery of myofibroblasts. *Inflamm Res*. 2019 Mar;68(3):241-245.

Ribeiro-Júnior O, Borba AM, Alves CAF, Gouveia MM, Deboni MCZ, Naclério-Homem MDG. Reclassification and treatment of odontogenic keratocysts: A cohort study. *Braz Oral Res*. 2017 Dec;18;31:e98.

Roy S, Garg V. Evaluation of stromal myofibroblasts expression in keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparative study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013 May;17(2):207-11.

Rubini C, Artese L, Zizzi A, Fioroni M, Ascani G, Goteri G, Stramazotti D, Piccirilli M, Iezzi G, Piattelli A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in different types of odontogenic cysts. *Clin Oral Investig*. 2011 Oct;15(5):757-61.

Santos PPA, Nonaka CFW, Freitas RA, Pereira Pinto L, Souza LB. Immunohistochemical analysis of myofibroblasts, TGF- $\beta$ 1, and IFN- $\gamma$  in epithelial odontogenic lesions. *J Oral Pathol Med*. 2017 May;46(5):365-370.

Saravana GH, Subhashraj K. Cystic changes in dental follicle associated with radiographically normal impacted mandibular third molar. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Oct;46(7):552-3.

Schmitd LB, Bravo-Calderón DM, Soares CT, Oliveira DT. Hyperplastic dental follicle: a case report and literature review. *Case Rep Dent*. 2014 Oct;2014:251892.

Shetty RM, Dixit U. Dentigerous Cyst of Inflammatory Origin. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2010 Sep-Dec;3(3):195-8.

Sousa-Neto ES, Cangussu MC, Gurgel CA, Guimarães VS, Ramos EA, Xavier FC, Cury PR, Carneiro Júnior B, Leonardi R, Dos Santos JN. Interaction of stromal and



microvascular components in keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2016 Sep;45(8):557-64.

Sudhakara M, Rudrayya SP, Vanaki SS, Bhullar RK, Shivakumar MS, Hosur M. Expression of CK14 and vimentin in adenomatoid odontogenic tumor and dentigerous cyst. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016 Sep-Dec;20(3):369-376.

Syamala D, Suresh R, Janardhanan M, Savithri V, Anand PP, Jose A. Immunohistochemical evaluation of myofibroblasts in odontogenic cysts and tumors: A comparative study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016 May-Aug;20(2):208-13.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.

Tsukamoto G, Makino T, Kikuchi T, Kishimoto K, Nishiyama A, Sasaki A, Matsumura T. A comparative study of odontogenic keratocysts associated with and not associated with an impacted mandibular third molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Aug;94(2):272-5.

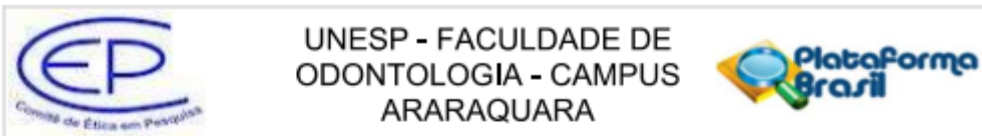
Tsukamoto G, Sasaki A, Akiyama T, Ishikawa T, Kishimoto K, Nishiyama A, Matsumura T. A radiologic analysis of dentigerous cysts and odontogenic keratocysts associated with a mandibular third molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Jun;91(6):743-7.

Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol.* 2005 Nov;41(10):1028-33.

Villalba L, Stolbizer F, Blasco F, Mauriño NR, Piloni MJ, Keszler A. Pericoronal follicles of asymptomatic impacted teeth: a radiographic, histomorphologic, and immunohistochemical study. *Int J Dent.* 2012 Jan;2012:935310.

Zhou T, Pan J, Wu P, Huang R, Du W, Zhou Y, Wan M, Fan Y, Xu X, Zhou X, Zheng L, Zhou X. Dental Follicle Cells: Roles in Development and Beyond. *Stem Cells Int.* 2019 Sep 15;2019:9159605.

## ANEXO A: APROVAÇÃO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização imunoistoquímica de marcadores mesenquimais e epiteliais em correlação com angiogênese e infiltração de mastócitos em folículos pericoronários, cistos dentígeros e ceratocistos odontogênicos

**Pesquisador:** Roberto Henrique Barbeiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 59880222.4.0000.5416

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.579.546

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se apresentação do projeto de pesquisa cujo resumo consta: "O folículo pericoronário consiste em uma cápsula que envolve a coroa de dentes não irrompidos. Esta estrutura tissular tem participação em eventos importantes como formação do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, além do seu envolvimento no processo da erupção dentária. Entretanto, o seu componente epitelial pode estar envolvido na patogênese do cisto dentífero e ceratocisto odontogênico. Os cistos dentígeros são frequentemente diagnosticados em exames radiográficos de rotina como uma área radiolúcida que circunda a coroa de um dente incluso. Esta mesma apresentação clínica e radiográfica pode ser evidenciada no ceratocisto odontogênico, uma lesão cística com alta taxa de recorrência. O diagnóstico histopatológico é conclusivo para ambas as lesões císticas. Alguns estudos mostram que a infiltração de mastócitos e angiogênese está envolvida na patogênese do cisto dentífero e ceratocisto odontogênico. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar comparativamente, por imunoistoquímica, a presença dos marcadores vimentina, actina de músculo liso, CD10, CD34, CD138 e triptase em amostras parafinadas de biópsias de folículo pericoronário, cisto dentífero e ceratocisto odontogênico visando caracterizá-los e quantificá-los, o que poderá ajudar a compreender a patogênese dessas lesões odontogênicas. Para isso, serão selecionados 15 casos de folículos pericoronários, 30 casos de cistos dentígeros e 30 casos de ceratocistos odontogênicos. Os blocos de parafina e os respectivos

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep.foar@unesp.br