LEONARDO BORGES FERRO

Imuno-expressão da DNMT1, DNMT3a e DNMT3b nos tumores odontogênicos

São Paulo

2013

LEONARDO BORGES FERRO

Imuno-expressão da DNMT1, DNMT3a e DNMT3b nos tumores odontogênicos

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2013

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ferro, Leonardo Borges.

Imuno-expressão da DNMT1, DNMT3a e DNMT3b nos tumores odontogênicos / Leonardo Borges Ferro; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2013.
75 p.: il. : tab., fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. DNA. 2. Enzimas. 3. Tumores odontogênicos. 4. Patologia bucal I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Ferro LB. Imuno-expressão da DNMT1, DNMT3a e DNMT3b nos tumores odontogênicos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inicialmente à Deus, início e razão de tudo.

E às minhas querida Flávia e Mariana, companheiras dedicadas desta viagem tão árdua e penosa a elas, as quais couberam os maiores sacrifícios, e são sem dúvida as grandes vitoriosas ao fim desta jornada.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao professor Fábio Daumas, exemplo de pesquisador, professor e principalmente figura humana, o qual soube conduzir todo o processo de forma tão terna e branda, que mais que um professor ou um orientador tornou-se um exemplo de ser humano, de docente dedicado tanto ao nobre ofício de ensinar quanto aos alunos e suas dificuldades.

Ao amigo Douglas Guimarães, fundamental em todo processo de pesquisa, como amigo, pesquisador experiente, apesar da pouca idade, sempre disposto a ajudar a contribuir de forma construtiva.

À Carina Esteves pela atenção, por te me ensinado os primeiros passos na tão sofrida imuno, por ter fornecido de forma tão desprendida os anticorpos para o projeto, pelas orientações e dicas sempre oportunas e relevantes.

Ao professor Sérgio Alves, pela ajuda em todo processo, pela preocupação e empenho no nosso sucesso.

À professor Cecy, figura fundamental à existência do DINTER, pelo cuidado, carinho e atenção com que conduziu todo o projeto.

À Professora Miran Turbino, pela coordenação firme e atenta do projeto.

Aos professores do programa: Marina, Marília, Suzana, Karem, Décio, Andrea, Nathalie, pela atenção carinho e dedicação a todo projeto e em especial a minha pessoa.

Ao professor Elder, pela ajuda inicial, pelo fornecimento de amostras para o projeto inicial, pela atenção.

Aos amigos e companheiros de percurso em especial ao Aldim e ao Newton, e todos os demais alunos do Dinter com quem tive o prazer de conviver, e me relacionar, sempre muito receptivos acolhedores na sua Belém do Pará.

Aos colegas, Liliam, Michela, Paula e Gabriela, com quem convivi de forma mais próxima e com quem dividi as angustias e dificuldade da vivência laboratorial.

Aos funcionários da patologia Elisa, Juvane, Edna e Adriana, pela atenção e paciência com que ensinaram o funcionamento do laboratório, os procedimentos, muitas vezes sacrificando seus afazeres para me ajudar e conduzir, pela primeira vez, alguns procedimentos, sempre de forma tão doce, tão disponível, tão ativa.

As secretárias da patologia Néia e Zilda, pela paciência, cuidado e gentileza com que nos trataram, sempre com um sorriso, com uma solução pronta para todas as dificuldades.

À família Bassesat, à Rita ao Igor, pela acolhida em São Paulo, pelas orientações nesta cidade nova, neste mundo de novas descobertas. A Matheus e Caique seus filhos, ao Edigar grande figura e companheiro dos fins de semana, à pequena Marina, com quem pouco convivi, mas por quem tenho grande carinho.

Aos Amigos Rottenyr, Thiago Mascarenhas e Marcelo, amigos e companheiros de convívio, grandes figuras humanas, com quem aprendi muito sobre convivência harmônica, e com os quais dividíamos as angustias da ausência familiar, tornando o período menos penoso.

Aos Funcionários do departamento de Morfologia da UFPI, Maurício, Chiquinha, Fábio, Marcos, Guerra e Daniele, pelo apoio, carinho e atenção com sempre me trataram.

Aos Professores do setor de anatomia, Carla, Noélia, Karenn, Christianne, Selma, Aglaísio, Zulmira e Ivone, que contribuíram cada um na sua possibilidade, para este momento.

Ao ex-diretor do CCS prof. Santos Rocha sempre um incentivado, que me apoiou, ajudando sempre que possível.

Aos meus irmãos Henrique, Adriana e Elaine que sempre se colocaram a disposição, ajudando e contribuindo na medida do possível. Aos meus cunhados Ana, Marcelo, Marcello e Mário, amigos que sempre se fizeram presentes, e estiveram ao meu lado durante todo percurso.

À Amparo minha mãe, exemplo de pesquisadora, mulher forte, de fibra, que com seu carinho e cuidado nos forjou, juntamente com meu pai Geraldo Ferro, homem forte e batalhador. A eles eu agradeço todo meu existir, todo meu ser, agora como pai consigo, vislumbrar o quão árdua deve ter sido a tarefa de educar e orientar quatro filhos.

A memória de Maria da Paz, minha querida vizinha, que acompanhou o início desta caminhada, mas Deus a chamou e ela não pode estar aqui para ver sua conclusão.

Aos meus sogros Ana e Eurípedes Dourado, pela atenção e cuidado com as minhas Flávia e Mariana, o que permitiu que eu me dedicasse de forma integral ao doutorado, sabendo que minhas preciosidades estavam amparadas na minha ausência. Eurípedes sempre disponível, sempre presente em todos os momentos, mais que um sogro, um verdadeiro amigo.

A minha querida Flávia companheira, amiga, minha rocha, minha âncora durante todo o curso e ao fruto do nosso amor Marianinha, que na sua singeleza foi capaz de me dar força e animo para chegar a este momento.

A Sandra, Diva e Anângela pelo carinho, zelo e cuidado com toda nossa família.

Enfim agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram a seu modo para que este momento chegasse. O maior aprendizado de todo este período é que nada se constrói sozinho por mais que haja um ator principal, por traz da coxia há sempre uma multidão de pessoas suando, lutando conosco e torcendo por nosso sucesso.

Gostaria ainda de agradecer inclusive aos que por ventura eu tenha esquecido de citar, sintam-se lembrado, e certamente depois lembrarei de alguém que foi fundamental neste processo e eu esqueci de mencionar. Perdoem-me se por ventura isso acontecer.

RESUMO

Ferro LB. Imuno-expressão da DNMT1, DNMT3a e DNMT3b nos tumores odontogênicos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Os tumores odontogênicos são um grupo heterogêneo de lesões formadas a partir de tecidos que dão origem ao dente. A metilação do ADN, uma adição covalente de um grupo metilo na posição 5 de carbono de um nucleótido de citosina, é considerado um importante regulador da expressão gênica. A adição do radical metil é catalisada por ADN metiltransferases (DNMTs). Embora alguns estudos epigenéticos tenham sido realizados em tumores odontogênicos, um estudo com os três tipos de DNMTs em vários membros desse grupo está em falta. Este estudo analisa a expressão de DNMTs em tumores odontogênicos. Amostras de vinte ameloblastomas, dez Calcificante tumores odontogênicos císticos, dez calcificados tumores epiteliais, dez tumor odontogênico adenomatóide, dez tumores odontogênicos queratocísticos, quatro fibromas ameloblásticos, dois fibro-odontoma ameloblástico, quatro fibroma centrais odontogênicos, sete tecidos de fibromas odontogênicos periféricos e dez mixomas odontogênicos foram incluídos. DNMT1, 3A e 3B foram expressas no núcleo e / ou citoplasma de todos os tumores odontogênicos. A alta expressão de DNMTs em células de tumor odontogênico sugere metilação como um mecanismo importante para este grupo de tumores.

Palavras-chave: DNA metiltransferase. Metilação. Tumor odontogênico.

ABSTRACT

Ferro LB. DNA Methyltransferase 1, 3A and 3B immunohistochemical expression in odontogenic tumours [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Odontogenic tumours are a heterogeneous group of lesions formed from tissues that give rise to the tooth. DNA methylation, a covalent addition of a methyl group to the 5-carbon position of a cytosine nucleotide, is considered an important regulator of gene expression. The addition of the methyl radical is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs). Although some epigenetic studies have been conducted in odontogenic tumours, a study with the three types of DNMTs in several different members of this group is missing. This study analyzes the expression of DNMTs in odontogenic tumours. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples of twenty ameloblastomas, ten calcifying cystic odontogenic tumors, ten calcifying epithelial tumors, ten adenomatoid odontogenic tumors, ten keratocystic odontogenic tumors, five ameloblastic fibromas, two ameloblastic fibro-odontoma, four central odontogenic fibroma, seven peripheral odontogenic fibroma and ten odontogenic mixoma were included. DNMT1, 3A and 3B were expressed in the nucleus and/or cytoplasm of all odontogenic tumours. The high expression of DNMTs in odontogenic tumour cells suggests methylation as an important mechanism for this group of tumours.

Keywords: DNA methyltransferase. Methylation. Odontogenic Tumours.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Imuno-expressão da DNMT 1 em Tumores odontogênicos.....	50
Figura 5.2 - Imuno-expressão da DNMT 3A em Tumores odontogênicos	51
Figura 5.3 - Imuno-expressão da DNMT 3B em Tumores odontogênicos	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Tumores odontogênicos estudados segundo a origem e número de espécimes da amostra	40
Tabela 4.2 - Anticorpos primários utilizados segundo o tipo, a concentração, a empresa, o clone, a origem e o tempo de incubação.....	42
Tabela 5.1 -Informações clínicas dos 87 casos estudados	44
Tabela 5.2 - Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metil-transferase 1 em tumores odontogênicos.....	45
Tabela 5.3 - Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metil-transferase 3A em tumores odontogênicos	46
Tabela 5.4 - Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metil-transferase 3B em tumores odontogênicos	47
Tabela 5.5 - Resultado da comparação da expressão da DNMT1 e 3b através do teste de KRUSKALL-WALLIS em tumores odontogênicos epiteliais, mistos e ectomesenquimais	54
Tabela 5.6 - Resultado da comparação da expressão da DNMT1 e 3b através do teste de KRUSKALL-WALLIS nos tumores odontogênicos	56

LISTA DE SIGLAS

AO	Odontoma ameloblástico
CpG	Citosina-guanina
DNMT	DNA-metil transferase
FA	Fibroma ameloblástico
FDA	Fibro-dentinoma ameloblástico
FO	Fibroma odontogênico
FOA	Fibro-odontoma ameloblástico
miARN	MicroARN
MO	Mixoma odontogênico
MSC	Célula tronco mesenquimal
OMS	Organização Mundial da Saúde
SAM	S-adenosil-metionina
SCNB	Síndrome do carcinoma nevíde basocelular
TDCF	Tumro dentinogênico de células fantasma
TO	Tumor odontogênico
TOA	Tumor odontogênico adenomatóide
TOC	Tumor odontogênico ceratocístico
TOCC	Tumor dontogênico cístico calcificante
TOE	Tumor odontogênico escamoso
TOEC	Tumor odontogênico epitelial calcificante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Tumores Odontogênicos	17
2.1.1 Ameloblastoma.....	20
2.1.2 Tumor Odontogênico Cístico Calcificante	24
2.1.3 Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante	25
2.1.4 Tumor Odontogênico Adenomatóide.....	26
2.1.5 Tumor Odontogênico Ceratocístico	27
2.1.6 Fibroma Ameloblástico	29
2.1.7 Fibro-odontoma Ameloblástico	30
2.1.8 Fibroma Odontogênico	30
2.1.9 Mixoma Odontogênico.....	31
2.2 Epigenética	33
2.3 Epigenética e tumores odontogênicos.....	37
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Imunohistoquímica.....	41
4.2 Quantificação.....	42
4.3 Análise Estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

A epigenética é o estudo de alterações na função de um gene que não está associada com nenhuma mudança na sequência genética do ADN. Esses eventos participam da diversidade de expressão gênica em várias células e tecidos. Os eventos epigenéticos são basicamente três: miARN, acetilação de histonas e metilação de ADN (Nagy, Turecki, 2012). A metilação do ADN envolve a transferência de um radical metil para o carbono 5 de uma citosina, formando 5-metilcitosina localizado em ilhas CpG (Jones, 2012). Historicamente, 5-metilcitosina foi separada da citosina assim como a timina (metil-uracila) foi separada da uracila, porém foi mostrado que essa modificação da citosina existe naturalmente no ADN (Hotchkiss, 1948). Embora muitos trabalhos sugeriram que a metilação do ADN poderia regular a expressão gênica, apenas por volta dos anos 80 estudos mostraram que esse evento está relacionado com a regulação gênica e diferenciação celular (Holliday; Pugh, 1975; Compere, Palmiter, 1981).

A transferência do radical metil é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNAmetiltransferases, consistindo basicamente de quatro enzimas: Dnmt-1, Dnmt-2, Dnmt-3a e Dnmt-3b (Moore et al., 2013). A Dnmt-1 tem sua função durante a replicação do ADN mantendo o padrão de metilação da fita molde para as demais fitas. Dnmt-3a e 3b são responsáveis por novas metilações na fita de ADN. A ação da Dnmt-2 ainda não é bem conhecida (Feng et al., 2005).

O silenciamento gênico causado pela hipermetilação das ilhas CpGs tem sido mostrado necessário para o desenvolvimento embrionário, e a completa ausência de metilação é incompatível com viabilidade de células somáticas e do câncer (Meissner et al., 2008). Adicionalmente, alterações na metilação do ADN estão relacionadas com a carcinogênese de várias lesões, dentre elas os tumores odontogênicos (Abiko et al., 2007). Porém, o conhecimento de eventos epigenéticos envolvendo tumores odontogênicos é escasso na literatura.

Os Tumores Odontogênicos (TO) constituem um grupo heterogêneo de lesões derivadas dos tecidos que formam o dente. Dentro desse grupo encontram-se lesões hamartomatosas, tumores benignos de diferentes comportamentos

biológicos e neoplasias malignas (Barnes et al., 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) esses tumores podem ser classificados em:

Carcinomas odontogênicos,
Sarcomas odontogênicos,
Tumores benignos com epitélio odontogênico maduro sem a participação do ectomesênquima,
Tumores benignos com epitélio odontogênico e com a participação do ectomesênquima,
Tumores benignos mesenquimais sem epitélio odontogênico.

As lesões malignas são consideradas raras e geralmente são descritas como a contraparte maligna das lesões benignas, sendo essas de grande relevância clínica para a prática odontológica. As lesões benignas com epitélio odontogênico maduro sem a participação do ectomesênquima são as mais comuns, fazendo parte desse grupo estão os ameloblastomas, tumor odontogênico escamoso (TOE), Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC), tumor odontogênico adenomatóide (TOA) e tumor odontogênico ceratocístico (TOC). No grupo das lesões do epitélio odontogênico com a participação do ectomesênquima estão o fibroma ameloblástico (FA), fibro-dentinoma ameloblástico (FDA), fibro-odontoma ameloblástico (FOA), odontoma, odontoma ameloblástico (AO), tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) e tumor dentinogênico de células fantasmas (TDCF). Nos grupos dos tumores benignos mesenquimais sem o epitélio odontogênico estão o fibroma odontogênico (FO), o mixoma odontogênico (MO) e o cementoblastoma (Regezi, 2002; Slootweg, 2009; Moreira et al., 2011).

Na literatura eventos epigenéticos foram descritos em ameloblastomas, tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC), tumor odontogênico adenomatóide (TOA) e tumor odontogênico ceratocístico (TOC) (Moreira et al., 2009a; Moreira et al., 2009b; Kitkumthorn, Mutirangura, 2010; Farias et al., 2012; Khojasteh et al., 2013).

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial que possui crescimento lento e localmente agressivo, clinicamente não apresenta predileção por sexo e a maioria dos casos é diagnóstica entre 30 e 60 anos de idade (Slootweg, 2009).

Histologicamente o ameloblastoma possui seis padrões, folicular, plexiforme, acantomatoso, desmoplásico, de células granulares e células basais. Embora possua diferentes tipos histológicos, não há diferença entre o tratamento e o comportamento biológico (Kumamoto, 2006). A patogenia do ameloblastoma não está bem estabelecida, estudos tem mostrado alterações epigenéticas como a hipermetilação dos genes p16, p21, p27 e RB (Moreira et al., 2009a), porém sem grandes diferenças quando comparadas ao folículo dentário. Entretanto, outros estudos relacionaram a metilação do gene p16 com a transformação maligna para o carcinoma ameloblástico (Abiko et al., 2007).

O TOCC foi primeiramente descrito por Gorlin em 1962 como cisto odontogênico calcificante (Gorlin et al., 1962). Atualmente a OMS o descreve como um raro tumor originário do epitélio odontogênico, representando cerca de 1,6% de todos os tumores odontogênicos intra-ósseos. TOCC tem predileção pela segunda e terceira década de vida, podendo afetar tanto mandíbula quanto maxila, com predileção pela região anterior (Slootweg, 2009). Clinicamente se apresenta como uma tumefação indolor de crescimento lento, e radiograficamente pode se apresentar como uma radiolucidez uni ou multilocular bem delimitada, podendo conter material calcificado (Buchner, 1991). Estudos recentes mostraram a metilação dos genes p21 e pRB em TOCC, porém devido ao baixo numero de casos estudados pouco se sabe sobre eventos epigenéticos nesses tumores (Moreira et al., 2009a).

O TOA é um tumor incomum representando cerca de 1.7% de todos os tumores odontogênicos intraósseos (Buchner et al., 2006). Usualmente acomete a segunda década de vida, com predileção pelo sexo feminino. A lesão ocorre frequentemente na região anterior dos ossos gnáticos, principalmente maxila (Regezi, 2002). Clinicamente, pode parecer como tumefação assintomática em associação com dente permanente incluso, geralmente canino. Moreira et al. (Moreira et al., 2009b) mostrou metilação dos genes p16 e p21, porém sem grandes diferenças quando comparado ao folículo dentário, mostrando a necessidade de mais estudos para compreender esse evento nos tumores odontogênicos.

O TOC é uma nova nomenclatura dada pela OMS para o “ceratocisto odontogênico”. Essa mudança de nomenclatura ocorreu devido a sua natureza

neoplásica, ocasionado por diversos estudos genéticos mostrando mutações no PTCH na sua etiologia (Barnes et al., 2005). TOC pode ocorrer da primeira até a nona década de vida com pico de incidência na segunda década com predileção pelo sexo masculino. A mandíbula é mais afetada que a maxila, cerca de 50% originando-se no ângulo da mandíbula (Regezi, 2002; Barnes et al., 2005; Slootweg, 2009). A sua característica mais comum é o potencial localmente destrutivo e sua alta taxa de recorrência. Estudos recentes mostram a metilação de genes supressores de tumor como p16 e p21, bem como metilação da sequência LINE-1. Assim, eventos epigenéticos podem estar relacionados com o desenvolvimento dessa lesão (Moreira et al., 2009b; Kitkumthorn; Mutirangura, 2010).

Desta forma, o papel da metilação em tumores odontogênicos precisa ser melhor estabelecido. Estudos que relatam esses eventos são poucos, e com um número pequeno de tumores, não abrangendo todos os grupos de tumores odontogênicos. O presente estudo tem como objetivo identificar o padrão de imunexpressão das DNMT1, 3a e 3b em tumores odontogênicos, comparando esta expressão entre os diferentes tumores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tumores Odontogênicos

Os tumores odontogênicos formam um grupo muito complexo e heterogêneo de lesões, que vão de hamartomas à neoplasias malignas, que acometem quase que exclusivamente os maxilares, e por definição, são oriundos dos tecidos responsáveis pela formação do órgão dentário. Sua origem pode ser a partir do epitélio, mesênquima ou ectomesênquima odontogênicos (Águida et al., 2009).

Os tumores de origem odontogênica podem representar vários estágios da ontogênese e envolver diferentes grupos celulares, resultando em diferentes características histológicas e graus variáveis de invasividade e agressividade local do tumor (Lee; Kim, 2013). Para melhor compreensão deste grupo de neoplasias a Organização Mundial da Saúde (OMS) sistematizou a classificação estas lesões levando em conta as características histopatológicas como o grau de malignidade e o tipo de tecido envolvido na gênese da lesão, epitelial, ectomesenquimal ou misto (Barnes et al., 2005).

Desta forma, a classificação preconizada pela OMS divide os TO em dois grandes grupos quanto à malignidade, ou não da lesão. Além disso, são acrescentadas a este grupo as denominadas lesões relacionadas, que apesar de não serem tumores odontogênicos, no sentido estrito do termo, tem relação histopatológica com este grupo de neoplasias. Desta forma a classificação da OMS em voga atualmente é a seguinte:

Classificação histológica dos tumores odontogênicos segundo a OMS (Barnes et al., 2005).

I. Tumores Malignos:

I.I. Carcinomas Odontogênicos:

1. Ameloblastoma metastizante (maligno);
2. Carcinoma ameloblástico – tipo primário;
3. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (indiferenciado) intraósseo;
4. Carcinoma ameloblástico – tipo secundário (indiferenciado) periférico;
5. Carcinoma de células escamosas intraósseo primário – tipo sólido;
6. Carcinoma de células escamosas intraósseo primário derivado de tumor;
7. Carcinoma de células escamosas intraósseo primário derivado de cistos;
8. Carcinoma odontogênico de células claras;
9. Carcinoma odontogênico de células fantasmas;

I.II. Sarcomas odontogênicos:

1. Fibrossarcoma ameloblástico;
2. Fibro-odontossarcoma ou fibrodentinossarcoma ameloblástico;

II. Tumores benignos:

II.I. Epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro, sem ectomesênquima odontogênico:

1. Ameloblastoma sólido – tipo multicístico;
2. Ameloblastoma extra-ósseo – tipo periférico;
3. Ameloblastoma tipo desmoplásico;
4. Ameloblastoma tipo unicístico;
5. Tumor odontogênico escamoso;
6. Tumor odontogênico epitelial calcificante;
7. Tumor odontogênico adenomatóide;
8. Tumor odontogênico queratocístico;

II.II. Epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido calcificado:

1. Fibroma ameloblástico;
2. Fibrodentinoma ameloblástico;
3. Fibro-odontoma ameloblástico;
4. Odontoma;
 - 4.1. Odontoma tipo complexo;
 - 4.2. Odontoma tipo composto;
5. Odontoma ameloblástico;
6. Tumor odontogênico cístico calcificante;
7. Tumor dentinogênico de células fantasmas;

II.III. Mesênquima ou ectomesênquima odontogênico com ou sem epitélio odontogênico:

1. Fibroma odontogênico;
2. Mixoma odontogênico – mixofibroma;
3. Cementoblastoma;

III. Lesões ósseas relacionadas:

1. Fibroma ossificante;
2. Displasia fibrosa;
3. Displasias ósseas;
4. Lesão de células gigantes central (granuloma);
5. Querubismo;
6. Cisto ósseo aneurismático.

Dentre essas lesões, algumas se destacam pela sua frequência ou características biológicas. Entre elas, podemos citar:

2.1.1 Ameloblastoma

Esta lesão foi inicialmente reconhecida com como um adamantinoma em 1885 por Malassez, mas foi identificada como entidade individual e renomeada para ameloblastoma em 1930, por Ivey e Churchill, denominação que permanece até a atualidade (Lee; Kim, 2013). O uso do termo adamantinoma para descrever ameloblastomas é inadequado, adamantinoma é um tumor ósseo raro que difere em histologia, frequência e agressividade do ameloblastoma (Kitsoulis et al., 2007). O ameloblastoma é uma neoplasia benigna originária do epitélio odontogênico. Os ameloblastomas são comuns, têm um comportamento localmente agressivo e curso recorrente, e raramente sofrem transformação maligna tornando-se metastático. Termos como craniofaringioma adamantinomatoso e carcinoma basocelular adamantinoide são termos que ainda são usados para descrever as suas características histológicas (Kato et al., 1999).

Apesar de o ameloblastoma ser considerado um neoplasma benigno, se negligenciado, pode chegar a um tamanho considerável e causar desfiguração facial severa e incapacidade funcional (Sham et al., 2009). É constituído por epitélio odontogênico proliferativo em meio a um estroma fibroso, ocorre principalmente nos maxilares, mas pode ocorrer também em outras regiões, desde que haja epitélio odontogênico ectópico, ainda que isso seja extremamente raro (Shakya et al., 2013). Usualmente os ameloblastomas são diagnosticados entre a quarta e quinta década de vida (Nagata et al., 2013), com uma média de 38,9 anos no momento do diagnóstico, responde por cerca de 1% de todos os tumores da cavidade oral e cerca de 18% dos tumores odontogênicos, não tem predileção por sexo, e possui uma predileção pela mandíbula em 81,7% dos casos (Lee; Kim, 2013).

Clinicamente a lesão frequentemente surge como uma assimetria facial assintomática, comumente, apresentando-se com um aumento de volume de dimensão variável nos maxilares. Os pacientes podem apresentar uma massa de crescimento lento, má oclusão, mobilidade dentária, raramente com parestesia e dor. A maioria das lesões são diagnosticadas em exames radiológicos de pacientes assintomáticos (Siar et al., 2012). A imagem radiográfica é geralmente radiolúcida,

unilocular ou multilocular lembrando muito cistos e podem mostrar perfurações na cortical óssea. Dentes inclusos podem estar associados à massa tumoral, e não é rara a reabsorção das raízes de dentes adjacentes (Barnes et al., 2005).

É interessante ressaltar que a variante desmoplásica do ameloblastoma geralmente aparece como uma lesão mista radiolúcida e radiopaca, muitas vezes se assemelhando a lesão fibro-óssea benigna e é mais comumente encontrada na maxila anterior (Bachmann; Linfesty, 2009). O diagnóstico histológico é sempre necessário, pois os aspectos radiográficos são apenas sugestivos, não patognomônicos, e podem se assemelhar aos apresentados por outras lesões como cistos odontogênicos, tumor odontogênico ceratocístico ou mixoma (Barnes et al., 2005).

Histologicamente o ameloblastoma pode ser dividido em folicular, plexiforme, acantomatoso e de células granulares, outras variantes histológicas menos comuns são as de células claras, desmoplásico, basocelular, papilífero e ceratoameloblastoma. Em geral, um terço dos ameloblastomas são plexiformes, um terço é folicular, e um terço corresponde as demais variantes (Hertog et al., 2012; Lee; Kim, 2013).

A apresentação histológica folicular frequentemente apresenta várias estruturas do folículo dental de tamanhos diferentes e possui um arranjo externo colunar ou em paliçada de células semelhantes à ameloblastos e zona interior das células de formato triangular, lembrando o retículo estrelado do germe do dentário na fase de campânula (Shahidi et al., 2012). O exame histopatológico mostra células que têm uma tendência dos núcleos de se afastarem da membrana basal. Este processo é referido como padrão em "polarização reversa" ou polaridade invertida. As células centrais geralmente degeneram para formar micro cistos centrais. O tipo folicular de ameloblastomas cresce, geralmente, formando nódulos multicísticos, o que resulta em massas tumorais multiloculares com recorrência mais frequente em comparação com os outros tipos de ameloblastomas (Siar et al., 2012).

O tipo histológico plexiforme contém epitélio que se prolifera em um padrão específico de "rede de pesca", "varanda de rede", ou em "cordões" que parecem se anatomizarem uns com os outros, por isso o nome em forma de plexo. Há camadas de células entre o epitélio proliferando com junções desmossomais bem definidas,

simulando as camadas de células fusiformes. O ameloblastoma com padrão plexiformes é um tumor odontogênico raro e benigno, que podem atingir proporções grotescas, afetando uma grande região da mandíbula (Hertog et al., 2012).

O ameloblastoma com padrão acantomatoso é uma variante extremamente rara apresenta ninhos sólidos de células epiteliais em paliçadas, ameloblastos periféricamente, e centralmente presença de células escamosas bem diferenciadas. O ameloblastoma acantomatoso é muito semelhante ao carcinoma ameloblástico ou mesmo a um carcinoma de células escamosas e também aparece como um ameloblastoma "híbrido" mistura de células ameloblásticas com um padrão desmoplásico pronunciado (Ahuja et al., 2012).

O ameloblastoma de células granulares é uma variante histológica do ameloblastoma, onde as células tumorais estão localizadas na porção central dos folículos, elas são granulares, com citoplasma eosinofílico e as células tumorais periféricas assemelham-se a ameloblastos. As células granulares são uma apresentação histológica de transição ou maturação durante o ciclo de vida do ameloblastoma, começando com células normais do retículo estrelado, passando a uma produção de grânulos e, finalmente, resultando na degeneração e na formação de áreas císticas. No entanto, o padrão de células granulares é raro e corresponde a apenas 4% dos ameloblastomas (Lee; Kim, 2013).

Outras variantes histológicas são possíveis, porém bem menos frequentes, a principal caracterização histológica dos ameloblastomas é a presença de células ameloblásticas, em distribuição em paliçada e com polaridade invertida. A variante histológica ceratoameloblastoma é uma variante muito rara definida pela extensa metaplasia escamosa e queratinização (Nagalaxmi et al., 2013). O ameloblastoma hemangiomatosos também é descrito como uma variante ameloblástico, com proliferação de vasos (Sharma et al., 2012). O ameloblastoma basocelular é a apresentação onde o ameloblastoma lembra o carcinoma de células escamosas basalóide, mas possuindo as características patológicas de ameloblastoma convencional (Ide et al., 1998). A variação ameloblastoma adenóide é também um tipo raro nesta categoria e pode causar problemas no diagnóstico devido à presença de áreas que se assemelham ao TOA e a ocorrência de diferentes graus de formação dentinóide (Solarin; Mosadomi, 1977; Saxena et al., 2012).

Histologicamente, a maioria dos ameloblastomas têm o padrão folicular ou plexiforme. Atualmente é aceito que não existe qualquer relação entre os padrões histológicos individuais e o comportamento do tumor ou seu prognóstico (Bachmann; Linfesty, 2009). Por esta razão, muitos patologistas podem optar por não descrever o padrão histológico. O padrão histológico não deve ser confundido com a classificação da OMS, pois estes descritores podem ter um impacto considerável sobre o tratamento e prognóstico dos pacientes.

Dentro da classificação da OMS os ameloblastomas são distribuídos segundo suas características clínico-patológicas em quatro grupos distintos: ameloblastoma sólido ou multicístico, extra-ósseo ou periférico, unicístico, desmoplásico.

A categoria ameloblastomas multicístico ou sólido é a mais comum e prevalente, sendo também referida na literatura como ameloblastoma convencional, ameloblastoma intraósseo ou ameloblastoma central (Hertog et al., 2012). Clinicamente, apresenta-se como lesões intraósseas com lenta evolução, aumento de volume indolor, podendo ou não perfurar a cortical óssea. Radiograficamente observa-se uma área radiolúcida expansiva, multilocular e com a presença de imagens semelhantes a bolhas de sabão, mais frequentemente encontrados na área de molar e ramo mandibular, sendo que 80% de todos estes tumores ocorrem na mandíbula. A taxa de recorrência após a ressecção em bloco com margem de segurança é de 13-15% e 90-100% após curetagem simples (Bachmann; Linfesty, 2009).

O ameloblastoma unicístico é uma lesão cística que apresenta características clínicas e radiológicas de um cisto mandibular, mas após um exame histopatológico identifica-se epitélio ameloblástico em parte da cavidade do cisto, com ou sem crescimento luminal e/ou mural (Lee; Kim, 2013). O ameloblastoma unicístico, demonstra uma tendência de recorrência menor que o convencional, e geralmente a recorrência é de longo prazo. Há uma diferença no comportamento biológico entre ameloblastomas unicístico mural e aqueles que são simplesmente císticos ou exibem proliferação intraluminal. O ameloblastoma unicístico é reconhecidamente menos agressivo que o ameloblastoma multicístico, uma vez que este tumor apresenta semelhanças clínicas e radiográficas consideráveis com um cisto dentífero, o exame histopatológico da capsula cística é sempre necessário. Além

disso, a recorrência de ameloblastomas unicísticos pode ser muito demorada, e o por isso um acompanhamento por longo prazo é essencial para esses pacientes (Siar et al., 2012; Nagalaxmi et al., 2013).

Ameloblastoma desmoplásico responde apenas por 4% a 13% de todos os ameloblastomas e apresenta uma taxa de crescimento mais lento do que ameloblastomas convencionais (Belgaumi et al., 2013). O local mais comum é na região anterior, tanto na maxila quanto na mandíbula, ao contrário de outros tipos de ameloblastoma, que tem predileção pela região de molar inferior. O tamanho é relativamente pequeno e o maior diâmetro é geralmente inferior ou igual a dois centímetros, o que também o distingue dos outros tipos que geralmente alcançam tamanhos consideráveis. A taxa de proliferação celular (PCNA e KI-67) do ameloblastoma desmoplásico mostrou ser significativamente menor em comparação com ameloblastomas sólidos/multicísticos e unicísticos (Sun et al., 2009).

O ameloblastoma periférico é um tumor odontogênico extraósseo raro com características histológicas semelhantes aos encontrados em ameloblastomas intraósseos convencionais. O ameloblastoma periférico, claramente, é originado a partir de restos epiteliais odontogênicos localizados na parte externa do germe dentário ao invés do epitélio oral comum. Isso representa aproximadamente 2-10% de todos os ameloblastomas (Lee; Kim, 2013). A recorrência é rara, mesmo com ressecção conservadora (Gomes et al., 2010b; Vanoven et al., 2008).

2.1.2 Tumor Odontogênico Cístico Calcificante

O tumor odontogênico cístico calcificante (TOCC) foi inicialmente reconhecido, como uma entidade cística com propensão a se calcificar, em 1962 por Gorlin (Gorlin et al., 1962), porém em 2005, foi reclassificado como um tumor odontogênico e designado como "tumor odontogênico cístico calcificante" pela OMS (Barnes et al., 2005).

O TOCC é uma patologia benigna de crescimento lento, geralmente assintomático, aparência cística e bastante rara que afeta os maxilares. Incide sobre

uma ampla faixa etária, de 05 a 92, tem uma distribuição igualitária entre a mandíbula e a maxila, preferencialmente na região anterior, sem predileção por sexo (Uchiyama et al., 2012). Na maioria dos casos apresenta uma estrutura cística (86-98%), mas pode apresentar uma variante sólida bem mais rara (2-16%) (Channappa et al., 2012).

Histologicamente apresenta a parede cística revestida por um epitélio fino, com células em paliçadas e polaridade invertida, semelhantes às do ameloblastoma, com a presença de células descritas com fantasmas. Estas células fantasmas podem se calcificar, e a frequência da calcificação varia de 19 a 77%. A lesão pode ser central ou periférica, sendo a periférica muito mais rara, representando cerca de 13% dos casos (de Lima et al., 2012).

Radiograficamente, o TOCC em geral aparece como uma lesão unilocular, na maioria dos casos, ou mais raramente multilocular, sempre com margem bem definida, presença de massa calcificada central, geralmente associada a dentes inclusos, podendo ainda provocar movimentação de dentes vizinhos e às vezes reabsorção radicular (Uchiyama et al., 2012). O TOCC pode surgir isoladamente ou em associação com outras neoplasias, como odontoma e ameloblastoma, em 20% dos casos (Zornosa; Muller, 2010).

O tratamento de escolha é a enucleação, não sendo comum a recidiva da variante extraóssea e a recorrência na variante central é bastante baixa (Barnes et al., 2005).

2.1.3 Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante

Por definição o tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC) é uma neoplasia benigna de origem odontogênica, também denominada de tumor de Pindborg, localmente invasiva, e que na análise histológica mostra a presença de material amiloide, que por vezes pode apresentar-se calcificado (Barnes et al., 2005).

O TOEC é uma neoplasia incomum, que representa menos de 1% de todos os tumores odontogênicos. Ocorre mais comumente na região posterior da mandíbula e é mais frequentemente encontrada em pacientes entre 30 e 50 anos de idade, sem predileção por sexo (Chen et al., 2013).

Geralmente é uma lesão intraóssea, mas existem relatos ocasionais de lesões periféricas, que representam apenas 6% de todos os casos relatados (Sahni et al., 2012). O quadro clínico do TOEC é geralmente um aumento de volume indolor de crescimento lento, radiograficamente apresenta-se como uma lesão radiolúcida ou mista, destrutiva e unilocular (Rahman et al., 2013). As características histopatológicas clássicas de TOEC incluem formação de massas e ilhas de células epiteliais poliédricas eosinofílicas com calcificações, presença de núcleos pleomórficos, raras imagens mitóticas, deposição de substância amiloide, margens bem definidas e ocasionalmente, com áreas focais de células claras. No caso de transformação maligna da lesão as imagens mitóticas se tornam mais frequentes (Chen et al., 2013). Ocasionalmente a substância amiloide apresenta-se calcificada com anéis concêntricos (Sahni et al., 2012). A taxa de recorrência do tumor situa-se por volta de 14%, e na variante de células clara esta taxa chega a 22%, o que implica na necessidade de acompanhamento dos pacientes por longos períodos (Barnes et al., 2005).

Em 50% dos casos está associado a um dente incluso, podendo ainda durante o desenvolvimento da lesão, movimentar, girar, gerar mobilidade ou mesmo reabsorver as raízes de dentes vizinhos (Singh et al., 2011).

2.1.4 Tumor Odontogênico Adenomatóide

O tumor odontogênico adenomatóide (TOA) é um tumor odontogênico benigno, não invasivo de crescimento lento, geralmente assintomático, pouco frequente, com uma incidência de 2 a 7% dentre todos os tumores odontogênicos (Prakasam et al., 2013). Atinge uma ampla faixa etária, de 03 a 82 anos, mais da metade dos casos ocorrem na adolescência, sendo que dois terços dos casos são

diagnosticados até a segunda década de vida, e mais de 90% dos casos são diagnosticados antes dos 30 anos de idade (Barnes et al., 2005).

Há uma predileção pelo sexo feminino com uma proporção que varia de 1:1,9, a maxila é mais afetada que a mandíbula com uma relação de 2,1:1, o canino impactado é o dente mais comumente envolvido na lesão. O tamanho da lesão geralmente não alcança grandes proporções, variando de 2 a 7 cm no maior diâmetro (Mohamed et al., 2010).

O TOA pode ser parcialmente cístico, e em alguns casos, a massa tumoral pode estar presente como uma massa única na parede um grande cisto (Gadewar, Srikant, 2010). Radiologicamente o TOA apresenta-se predominantemente como lesão cística unilocular associado a um dente incluso (por isso é comumente confundido como um cisto dentígero), mas a lesão também apresenta mais raramente um componente puramente cístico (Srikant, 2010).

Esta neoplasia é descrita histologicamente como uma entidade bifásica, sendo uma fase representada por epitélio com diferentes graus de alterações císticas e a outra fase correspondente a uma lesão intracística, com proliferação de epitélio composto por células poligonais. Esta característica histológica justifica a denominação "tumor odontogênico adenomatóide", que é usada para definir uma lesão cística com uma proliferação intraluminal que preenche o espaço cístico dando uma aparência de uma lesão sólida (Gadewar; Srikant, 2010).

A literatura mostra divergência quanto ao caráter neoplásico deste tumor, pois alguns autores consideram esta lesão um hamartoma, e não uma neoplasia verdadeira, devido ao seu tamanho muito limitado, associado ao baixo potencial de invasão, crescimento muito lento e principalmente a ausência de recidiva (Crivelini et al., 2005; Ágüida et al., 2009; Gadewar; Srikant, 2010).

2.1.5 Tumor Odontogênico Ceratocístico

A OMS define o tumor odontogênico ceratocístico (TOC) como uma neoplasia epitelial benigna de origem odontogênica, caracterizada pela presença de epitélio

escamoso paraceratinizado, localmente agressiva e infiltrativa (Barnes et al., 2005). É importante ressaltar que a variante ortoceratinizada não é classificada como TOC por ter uma evolução, comportamento e risco de recidiva muito diferente.

O TOC pode ocorrer em uma ampla faixa etária, da 1ª à 9ª décadas de vida, sendo a maior incidência na segunda e terceira décadas. Pode apresentar um único ou múltiplos cistos independentes, e quando ocorrem múltiplos cistos geralmente há associação com a síndrome do carcinoma nevóide basocelular (SCNB). Esta neoplasia apresenta uma predileção pelo sexo masculino, em uma relação de 1,6:1, afeta mais a mandíbula que a maxila, em uma relação de 2:1, com predileção na mandíbula pela região de ângulo e ramo (Madras; Lapointe, 2008).

O TOC está muito relacionado à SCNB, principalmente o quadro de múltiplas lesões císticas. Esta síndrome além de múltiplos TOCs apresenta lesões de carcinomas basocelulares na pele, costelas bífidas, alterações cutâneas, crânio-dento-faciais, esqueléticas e neurológicas. O TOC está presente em 65 a 70% dos pacientes afetados pela síndrome (Bhargava et al., 2012).

Clinicamente o TOC, na maioria dos casos, é associado a um dente incluso ou impactado, é geralmente assintomático, apresenta-se como um aumento de volume, com expansão da cortical óssea, ou mesmo rompimento desta, com desvio do feixe neurovascular, e sendo identificado geralmente em radiografias de rotina (Barnes et al., 2005). Radiograficamente a neoplasia é identificada como uma área uni ou multilocular, radiolúcida com margem esclerótica bem definida, podendo haver áreas de esfumaçamento da margem. Este quadro não é patognomônico, sendo necessário sempre o diagnóstico histopatológico (Brauer et al., 2013).

O TOC é uma lesão potencialmente agressiva. Os pacientes devem ser cuidadosamente acompanhados, após o tratamento, devido a presença frequente de cistos filhotes, e possibilidade de recidiva (Barnes et al., 2005). A taxa de recidiva está diretamente ligada à modalidade de tratamento escolhido, podendo chegar a 30%, quando o tratamento escolhido é a enucleação, chegando a 0% na ressecção em bloco (Madras; Lapointe, 2008).

2.1.6 Fibroma Ameloblástico

O fibroma ameloblástico (FA) é um tumor do ectomesênquima odontogênico, formada por uma mistura de tecido epitelial e ectomesenquimal de origem odontogênica, onde o tecido tumoral assemelha-se à papila dental com cordões e ninhos semelhantes à lâmina dental e órgão do esmalte. Não há presença de tecido mineralizado, e quando isso acontece a neoplasia passa ser denominada de fibro-odontoma ameloblástico (Barnes et al., 2005).

Esta neoplasia representa aproximadamente 2,5% de todos os tumores odontogênicos. Sua distribuição etária vai de seis meses a 42 anos de idade, com maior incidência na segunda década de vida. Mais de 80% dos casos ocorrem na região posterior da mandíbula (Mosby et al., 1998).

Clinicamente é geralmente assintomática, exceto quando infectada. Pode ocasionar assimetria facial decorrente do aumento de volume, já que o tumor pode variar de 1 a 8,5 cm no maior diâmetro. Radiograficamente representa uma imagem radiolúcida unilocular bem definida (Munde et al., 2013).

Quanto à recidiva, há muita discordância na literatura sobre sua possibilidade. Existem relatos de recidiva variando 0 a 70%, dependendo do tempo de acompanhamento, do tipo de tratamento e provavelmente de discrepâncias no diagnóstico histopatológico (Williams et al., 2007; Gish; Lessin, 2013; Munde et al., 2013). Existem relatos na literatura de transformação maligna do FA, principalmente nos casos recidivantes, sendo que alguns casos geram dúvida quanto ao diagnóstico ser realmente FA ou ameloblastoma (Economopoulou, Sotiriadou, 1998; Sano et al., 1998; Kobayashi et al., 2005; Delair et al., 2007; Williams et al., 2007; Kousar et al., 2009; Carnelio; Vij, 2010).

Histologicamente a lesão consiste de cordões epiteliais, que formam agrupamentos de tamanhos variáveis, com células colunares semelhante ao epitélio do esmalte na periferia, circundando células dispostas de forma semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte (Sivapathasundharam et al., 2005). Os feixes epiteliais se encontram em um estroma mixóide com fibroblastos estrelados com longas extensões citoplasmáticas finas semelhantes a polpa do dente embrionário,

sendo que a quantidade de feixes pode variar. Tecidos dentários mineralizado não fazem parte do espectro histológico do FA. Figuras mitóticas tanto em componentes epiteliais quanto mesenquimais podem ocorrer, porém se houver, deve-se aumentar a preocupação sobre a natureza benigna do caso (Kousar et al., 2009).

2.1.7 Fibro-odontoma Ameloblástico

O fibro-odontoma ameloblástico (FOA) é um tumor benigno raro, formado pela proliferação de epitélio e ectomesenquima odontogênico diferindo do FO pela presença de tecido dentário mineralizado em diferentes níveis de maturação (Barnes et al., 2005; Pillai et al., 2012).

Clinicamente aparece como uma lesão assintomática bem encapsulada, diagnosticada durante as duas primeiras décadas de vida, não possui predileção entre a maxila e mandíbula. Radiograficamente aparece como uma lesão radiolúcida circunscrita que pode conter focos de áreas radiopacas, a proporção entre o tecido mineralizado e tecido mole varia muito, por vezes chegando a radiograficamente assemelhar-se a um odontoma complexo. Esta neoplasia constitui 3,1% dos tumores odontogênicos, não há prevalência entre os sexos (De Riu et al., 2010).

Histologicamente possui as características do fibroma ameloblástico (FA) associado à presença de dentina e/ou esmalte. A recorrência do FOA é muito rara e quando ocorre está associada à cirurgia inadequada, remoção incompleta da lesão, especialmente em tumores grandes (Pontes et al., 2012).

2.1.8 Fibroma Odontogênico

O fibroma odontogênico é uma neoplasia rara representando cerca 0,1% das neoplasias odontogênicas, cujo principal componente envolvido é o mesênquima odontogênico, com a presença de epitélio odontogênico inativo implantado em um

estroma de tecido fibroso. É subdividido em dois grupos um rico em epitélio odontogênico e outro pobre em epitélio odontogênico (Barnes et al., 2005).

Radiograficamente as lesões são geralmente multiloculares, com bordas escleróticas, relativamente grandes, podendo haver pequenas calcificações centrais, criando uma imagem radiopaca. Geralmente é encontrado na região posterior da mandíbula, podendo estar associado ou não a dentes inclusos (Chhabra; Chhabra, 2012). No exame histopatológico a principal característica do tumor é a presença de fibras colágenas maduras, com inúmeros fibroblastos intercalados, e presença de pequenos ninhos ou cordões de epitélio odontogênico em quantidade variável (Daniels, 2004).

Ocorre em uma ampla faixa etária que vai de 11 a 66 anos com uma média de idade de 40 anos, com predominância para o sexo feminino de 2,8:1. É uma lesão benigna de prognóstico bom, com baixo risco de recidiva (Barnes et al., 2005).

O FO pode ainda ser encontrado nas variantes central, mais frequente, e periférica, que por definição não envolve os ossos maxilares, e é originária de restos ectomesenquimais odontogênicos localizados fora dos ossos, porém durante a progressão da lesão os ossos podem ser envolvidos secundariamente (Alaeddini et al., 2010; Ramachandra et al., 2011).

2.1.9 Mixoma Odontogênico

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia intraóssea de origem mesenquimal. São tumores de crescimento lento, localmente agressivos, com diferenças na frequência de ocorrência em diferentes partes do mundo, variando de 3-20%. É mais frequente na 3ª década de vida e bem mais comum em mulheres (Barnes et al., 2005). A taxa de recorrência pode variar de 5 a 10%, o acompanhamento em longo prazo é necessário, pois a recidiva pode ser tardia. O tratamento indicado depende da localização e principalmente do tamanho do tumor, normalmente a curetagem e enucleação são difíceis de executar pela própria

natureza da lesão, ressecção com margem de segurança é geralmente recomendado (Barnes et al., 2005; Kansy et al., 2012).

Radiologicamente, a aparência pode variar de uma radiolucidez unilocular a uma lesão multicística com margens bem definidas ou difusas, com trabeculado ósseo no seu interior expressando a aparência de um "favo de mel", "bolha de sabão", ou "raquete de tênis". A imagem unilocular pode ser visto mais comumente em crianças e nas regiões anteriores dos maxilares. A reabsorção radicular é visto raramente, e o tumor frequentemente envolve as raízes dentárias (Li et al., 2006; Sivakumar et al., 2008)

Histologicamente o MO é caracterizado por células fusiformes e redondas uniformemente dispersas em um muco abundante ou estroma mixóide, que contém apenas algumas fibras colágenas finas. Células binucleadas, pleomorfismo leve e figuras de mitose podem ocorrer. Restos de epitélio odontogênico não são evidentes na maioria das lesões e não são necessários para estabelecer o diagnóstico final. Alguns MOs têm uma tendência para produzir fibras de colágenas e são designados mixofibromas. Não há nenhuma evidência de que estas variantes comportem-se de forma diferentemente (Noffke et al., 2007). Estudos histoquímicos mostram que a substância fundamental é rica em mucopolissacarídeos, principalmente, de ácido hialurônico e, em menor grau, sulfato de condroitina (Bhattacharyya et al., 2013).

Os MOs não são encapsulados, promovendo assim a infiltração significativa no osso medular adjacente. O MO exibe produção extracelular abundante de substância fundamental e fibras finas pelas células fusiformes. Estas células mesenquimais indiferenciadas são capazes de se diferenciarem também em fibroblastos (Saylam et al., 2007). Dependendo do padrão de diferenciação, a natureza histológica do tumor varia. Pode apresentar fibras ou ser completamente mixomatoso, e mesmo mostrar proporções variadas de tecido fibroso e mixomatoso. Alguns consideram MO como uma forma modificada de fibroma no qual a substância intracelular mixóide separa o tecido conjuntivo (Manne et al., 2012).

Há uma grande discussão na literatura sobre a natureza independente das lesões mistas do tecido odontogênico, epitélio e ectomesênquima, ou se todas elas são apenas fases distintas da evolução de uma mesma (Cohen; Bhattacharyya, 2004; Jindal; Bhola, 2011; Gish; Lessin, 2013). No entanto, a OMS classifica estas

neoplasias como entidades diferentes baseada nos aspectos clínicos, mas principalmente no comportamento individual de cada lesão (Barnes et al., 2005). Frente as várias questões que os tumores odontogênicos suscitam, muitos estudos são necessários para responde-las. Vários estudos já foram realizados para entender o componente genético presente na patogênese dessas lesões. Mais recentemente a epigenética veem sendo muito estudada como um mecanismo que pode ajudar a entender o processo de tumorigênese nestas neoplasias (Kitkumthorn; Mutirangura, 2010).

2.2 Epigenética

Epigenética é o estudo das alterações fenotípicas hereditárias ou da expressão do genômica que não resultam de alterações na sequência de ADN primário (Crider et al., 2012). Dentre os mecanismos envolvidos na regulação da expressão do gene existem duas formas principais de controle, o genético e epigenético. O controle genético envolve alterações nas sequências de bases nitrogenadas que formam o ADN, alterando assim o genoma, já o controle epigenético envolve mudanças reversíveis e hereditárias capazes de controlar a expressão gênica sem, no entanto, alterar o genoma, modificando apenas a manifestação ou silenciando um determinado gene. As alterações epigenéticas assim como as genéticas são transmitidas para a nova geração, perpetuando assim as alterações ao longo de uma linhagem celular (Haluskova, 2010).

A principal diferença entre as alterações epigenéticas e as genéticas, como mutações genéticas é que as mudanças epigenéticas são reversíveis e não envolvem mudanças na sequência de base, o que sugere que é possível uma nova expressão de genes e que os dados epigenéticos podem levar a importantes alvos terapêuticos moleculares. A detecção de metilação aberrante no ADN de células tumorais presentes em quantidades diminutas em amostras teciduais, pode ser usada para o diagnóstico precoce do câncer, para a predição do risco de carcinogênese e para a definição das propriedades de um tumor em particular (Haluskova, 2010).

Existem diferentes mecanismos de alteração epigenética, por exemplo: a modificação das proteínas histonas no núcleo, ARN de interferência, micro ARN, e metilação do ADN. Destes processos a metilação do ADN é uma das modificações mais comuns e mais bem estudadas em mamíferos. Os padrões de metilação são fielmente armazenadas após a divisão celular e a metilação do ADN. A metilação do ADN genômico em vertebrados ocorre sempre na citosina em sítios de CpG, que é onde a citosina é diretamente seguida por uma guanina na sequência de ADN (Veeck; Esteller, 2010).

Esses mecanismos de regulação epigenética modulam a estrutura da cromatina e contribuem para a regulação dos principais processos moleculares no núcleo, incluindo a transcrição, replicação, reparo e processamento de ARN. A metilação do ADN é uma modificação covalente de ADN genômico que modifica a expressão do gene e proporciona um mecanismo de transmissão e perpetuação da informação epigenética por meio de replicação de ADN e divisão celular (Crider et al., 2012).

Como mencionado acima, a metilação do ADN é um fenômeno que ocorre quando grupos metílicos são adicionados à citosina em áreas específicas do gene, sempre em uma sequência CpG, e que transfere um grupo metil a partir do doador metílico universal, S-Adenosil-Metionina (SAM) na posição 5 do anel citosina (Oakeley, 1999), esta transferência do grupo metil é catalisada por um grupo de enzimas denominadas de DNA-metiltransferases, em dois processos distintos conhecidos como metilação de manutenção e nova metilação (Cavalieri Gomes et al., 2009; Koukoura et al., 2012). A metilação de manutenção tem lugar após a replicação do ADN, neste momento os locais de CpG na cadeia filha são metilados de forma a repetir o padrão de metilação da cadeia progenitora, mantendo o perfil de metilação na geração seguinte. Na metilação de manutenção, o padrão de metilação da fita molde é mantido nas demais fitas durante a divisão celular, o que permite a perpetuação deste padrão. A nova metilação envolve a metilação de uma sequência CpG não metilada, o que pode resultar em alterações na diferenciação celular, envelhecimento, ou transformação neoplásica (Esteller et al., 2001; Patra; Bettuzzi, 2007).

É importante ressaltar que as alterações epigenéticas como a metilação do ADN, as modificações das proteínas histonas e os microARN estão intimamente ligadas entre si, interagindo durante todo o controle transcricional. Em eucariontes o ADN está associado a proteínas histonas, que ajudam a empacotar as longas cadeias de ADN dentro do núcleo. Modificações nestas proteínas, que podem ser por metilação, acetilação, ubiquação ou fosforilação das histonas, influenciam não só como o ADN é empacotado, mas principalmente na sua capacidade transcricional. Em geral as DNMT através da metilação do ADN interagem com as histonas impondo um estado repressivo sobre determinada região do gene. Por outro lado modificações nas histonas podem prejudicar a ligação das DNMTs dificultando a metilação. Os microARN são fragmentos de ARN que se ligam aos ARN-mensageiros, impedindo a produção protéica, formando um complexo de dupla fita que silencia os ARN-mensageiros. A metilação do ADN pode regular a produção do microARN, por outro lado este também regula a modificação das histonas e a metilação do ADN (Moore et al., 2013).

Os padrões de metilação de ADN são estáveis e são mantidos no ADN genômico purificado (Crider et al., 2012). Também tem sido demonstrado que na região de ADN não metilado não há formação de nucleossomas desta forma, permitindo a ocorrência de transcrição, enquanto que o ADN metilado induz a formação de nucleossoma que torna impossível a transcrição. Desta forma a metilação, a princípio, tem a função silenciadora do gene, no entanto como a regulação protéica celular é muito complexa e inter-relacionada, dependendo do gene, em que ela ocorre, o resultado pode ser tanto a inibição da produção protéica como a super-expressão protéica, pois o silenciamento de um gene específico pode super-expressar outro que seria inibido pela proteína silenciada (Muraki et al., 2009).

As alterações epigenéticas, em especial, a relação entre o câncer e hipermetilação aberrante tem atraído a atenção de vários grupos de pesquisa pelo mundo. As alterações genéticas e epigenéticas, como a hipermetilação de oncogenes e genes supressores de tumores, estão intrinsecamente envolvidas no processo através do qual as células se tornam neoplásicas (Baylin, Herman, 2000; Esteller et al., 2001; Cavalieri Gomes et al., 2009).

A análise recente da metilação genômica de alta resolução de uma linhagem de fibroblasto primário humano demonstrou que 4,25% do total de citosinas do ADN genômico são metiladas, 67,7% das ilhas CpG são metiladas, e 99,98% das metilações do ADN ocorrem em dinucleotídeos CpG (Lister et al., 2009).

A enzima DNA-metiltransferase-1 (DNMT1) é responsável pela manutenção dos padrões de metilação (Bestor, 2000). Acredita-se que a região n-terminal da DNMT1 seja responsável pela ação da enzima durante a fase S da replicação e a manutenção da metilação na fita molde. A deleção da DNMT1 em células de rato reduziu os níveis de metilação e aumentou a letalidade embrionária (Li et al., 1992). A DNMT1 tem preferência por hemi-metilação do ADN e, por conseguinte, está envolvida na manutenção da metilação ou copiando padrões de metilação após a replicação do ADN (Pradhan et al., 1999).

A DNMT2 foi isolada em estudos que procuravam os membros da família DNMT, mas até recentemente não se conhecia sua atividade enzimática (Okano et al., 1998; Schaefer; Lyko, 2010). Estudos recentes mostraram que essa enzima está relacionada a metilação do ARN transportador (Schaefer et al., 2010; Tuorto et al., 2012).

Outro grupo desta família de enzimas é o grupo DNMT3. A DNMT3a e DNMT3b foram identificados e as suas propriedades estão relacionadas com a nova metilação em ADN não metilado ou hemimetilados. A família DNMT3 partilha algumas semelhanças estruturais com a DNMT1 como uma região C-terminal catalítica responsável pela metilação de ADN e um domínio N-terminal de regulação. As DNMT 3a e 3b exibem homologia de sequência de aminoácidos notável, especialmente na região rica em cisteína (Chedin, 2011). Experiências com ratos knockout para DNMT3 indicam que essas enzimas são provavelmente responsáveis pela metilação observada durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos (El-Osta, 2003).

Recentemente, um novo membro da família das DNMT3 foi identificado, a DNA-metiltransferase-like (DNMT3l). Deleções de genes DNMT3l em rato revelaram defeitos na metilação durante gametogênese e na replicação genômica. A DNMT3l ainda carece de estudos que lhe confira alguma atividade no processo de metilação, porém ela ainda está estruturalmente ligada à DNMT3a e a DNMT3b sugerindo que

a DNMT3I pode cooperar com as outras DNMT3 como um regulador durante a replicação gênica (Bourc'his et al., 2001; Borghese et al., 2012).

As DNA-metiltransferases conhecidas são DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3I, que são classificados de acordo com sua função durante a metilação, que pode ser reproduzir o padrão de metilação da célula progenitora nas gerações seguintes, ou alterar o padrão de metilação de uma célula preexistente criando um novo padrão de metilação, que poderá ser perpetuado pela replicação celular. As DNMTs mais estudadas em mamíferos são as DNMT3a, DNMT3b e DNMT1. A DNMT3a e DNMT3b estão mais envolvidos no processo de uma nova metilação, enquanto DNMT1 age com a manutenção da metilação já existente (Cavalieri Gomes et al., 2009).

2.3 Epigenética e tumores odontogênicos

O órgão dentário é extremamente complexo e se desenvolve a partir de pelo menos três diferentes populações progenitoras, o esmalte que é porção ectodérmica e duas populações ectomesenquimais derivadas da crista neural, a papila dental e o do folículo dental (Gopinathan et al., 2013). As células do folículo dental e as células da papila dental têm grande capacidade proliferativa, expressam antígenos de superfície semelhantes, e são capazes de formar tecido duro in vivo e in vitro (Mori et al., 2012). Durante o desenvolvimento, os tecidos que darão origem a papila dentária diferenciam-se em polpa dentária e odontoblastos, que por sua vez, secretam a dentina do dente, enquanto que o folículo dental forma o ligamento periodontal, o osso alveolar, e o cimento (Rothova et al., 2012). A diferenciação terminal destes tecidos intermediários em polpa, odontoblastos, dentina e células dos tecidos do aparato periodontal, é controlada por fatores genéticos e ambientais (Dangaria et al., 2011). Este processo de diferenciação está diretamente envolvido na tumorigênese odontogênica, e a função da epigenética no processo da diferenciação normal, assim como das neoplasias oriundas do folículo dentário, necessita ser melhor esclarecida (Kitkumthorn; Mutirangura, 2010; Gopinathan et al., 2013).

Em geral, os mecanismos epigenéticos envolvidos no desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular incluem a regulação do gene pela metilação de citosinas no ADN, as modificações covalentes das histonas e os ARNs não codificantes (Shieh et al., 2005). Mudanças na expressão de genes durante o desenvolvimento são em geral acompanhadas ou causadas por mecanismos epigenéticos, e a diferenciação terminal das células é controlada pela ativação dinâmica e repressão de genes por mecanismos epigenéticos (Wutz, 2013). Nas células-tronco mesenquimais (MSCs), modificações pós-transcripcionais das histonas desempenham um papel ativo na determinação da capacidade de diferenciação (Xie et al., 2013).

Muitos estudos têm demonstrado alterações genéticas em tumores odontogênicos (Gonzalez-Moles et al., 2006; Gomes et al., 2009; Moreira et al., 2009a), mas poucos estudos têm analisado eventos epigenéticos nestes tumores (Moreira et al., 2009b; Moreira et al., 2011). Alterações epigenéticas como a hipometilação dos genes tumorais p16 e p21 tem sido constatados em ameloblastomas (Gomes et al., 2010a), no entanto o significado desses dados na tumorigênese das neoplasias odontogênicas ainda não foi adequadamente esclarecido. A análise da expressão da ADN metiltransferases pode mostrar a participação dessas enzimas nas células que compõe as diferentes neoplasias odontogênicas, oferecendo um quadro de como as mesmas podem contribuir para a manutenção do fenótipo neoplásico.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo avaliar o padrão de imuno-expressão das proteínas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, em diferentes tumores odontogênicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 205.735 (Anexo A).

Amostras de tumores odontogênicos foram obtidas dos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP, São Paulo, SP, Brasil). As amostras tiveram seu diagnóstico confirmado por dois patologistas experientes, segundo a organização mundial da saúde (Barnes et al., 2005).

Foram selecionados 87 casos, sendo 50 tumores de origem epitelial: vinte de ameloblastomas, dez casos de tumores odontogênicos epiteliais calcificantes (TOEC), dez tumores odontogênicos adenomatóides (TOA), dez casos de tumores odontogênicos ceratocísticos (TOC); 17 amostras de tumores mistos, de origem epitelial e ectomesenquimal: dez tumores odontogênicos císticos calcificante (TOCC), dois de fibro-odontomas ameloblásticos (FOA), quatro fibromas ameloblásticos (FA); e vinte e um casos de lesões originárias do ectomesênquima, assim distribuídas: quatro fibromas odontogênicos centrais (FOC), sete fibromas odontogênicos periféricos (FOP), e dez casos de mixomas odontogênicos (MO), escolhidos segundo a quantidade de tecido presente no bloco de parafina (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Tumores odontogênicos estudados segundo a origem e número de espécimes da amostra

Tumor	Tipo	Nº de casos
Ameloblastoma	Epitelial	20
Tumor odontogênico ceratocístico	Epitelial	10
Tumor odontogênico adenomatóide	Epitelial	10
Tumor odontogênico epitelial calcificante	Epitelial	10
Tumor odontogênico cístico calcificante	Misto	10
Fibroma ameloblástico	Misto	04
Fibro-odontoma ameloblástico	Misto	02
Fibroma odontogênico central	Ectomesenquimal	04
Fibroma odontogênico periférico	Ectomesenquimal	07
Mixoma odontogênico	Ectomesenquimal	10

4.1 Imunohistoquímica

As amostras, que estavam fixadas em formalina e incluídas em blocos de parafina, foram cortadas na espessura de 3µm e aplicadas em lâminas previamente revestidas de 3-aminopropiltrietoxissilano (Sigma Chemical Corp, St. Louis Mo, EUA). Os cortes foram então desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C durante 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente por 15 minutos.

A reidratação foi realizada em uma série de banhos de imersão de três minutos de duração, cada, sendo três banhos consecutivos em álcool etílico absoluto e banhos subsequentes em solução aquosa de álcool etílico de 95%, 90%, 85%, 80%. A remoção do pigmento de formol ocorreu pela imersão dos cortes em solução de hidróxido de amônia 10% associada a etanol 95%, por cinco minutos, em seguida as lâminas foram imersas em dois banhos de água destilada por cinco minutos.

A recuperação antigênica foi realizada com banho de imersão em solução de ácido cítrico (10mM, pH 6,0), em micro-ondas em potência máxima por quinze minutos, sendo que a cada cinco minutos o nível da solução era revista e completada para manter os cortes submersos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes associado ao metanol, na proporção de 1:1, na qual as lâminas foram mergulhadas em dois banhos consecutivos, de 15 minutos cada. Os cortes foram colocados na água destilada por cinco minutos, e logo após em solução tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), pH 7,6, por dois ciclos de dez minutos.

Os anticorpos foram diluídos em solução de TRIS pH 7,4 acrescido de 1% de BSA (albumina bovina e azida sódica), a proporção da diluição foi assim definida: DNMT1 (IMG-261A, Imgenex, San Diego, EUA) foi diluído na proporção 1:400, DNMT3a (IMG-268A,, Imgenex) foi diluído na proporção 1:200, e DNMT3b (IMG-184A, Imgenex) foi diluído na proporção 1:100, de acordo com padronização prévia. Todos os anticorpos foram incubados a 4°C em ambiente úmido, por um período de 18 horas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Anticorpos primários utilizados segundo o tipo, a concentração, a empresa, o clone, a origem e o tempo de incubação

Soro	Tipo	[]	Marca	Clone	Origem	Incubação
DNMT1	Monoclonal	1:400	Imaginex	60B1220.1	Rato	18 horas
DNMT3a	Monoclonal	1:200	Imaginex	64B1446	Rato	18 horas
DNMT3b	Monoclonal	1:100	Imaginex	52A1018	Rato	18 horas

[] = concentração

Após incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos a três banhos consecutivos de cinco minutos em solução TRIS, pH 7,6. Como anticorpo secundário e complexo terciário utilizou-se o kit advanced (Dako, Carpinteria, USA).

Incubou-se os corte em Advance HRP Link (TRIS/HCl diluente, 3ª versão, Dako) por trinta minutos, sendo então realizado três banhos consecutivos de cinco minutos com solução tampão de TRIS, pH 7,6, incubou-se novamente as lâminas em Advance HRP Enzyme (TRIS/HCl diluente, 3ª versão, Dako) por trinta minutos, repetiu-se os banhos da solução tampão de TRIS, pH 7,6 por três vezes consecutivas de cinco minutos.

Todas as lâminas foram coradas com diaminobenzidina 0,025% (DAB 3,3-Diaminobenzidina, Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) e contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Posteriormente, foi realizada a desidratação em cadeia ascendente de etanóis, diafanização em dois banhos de xilol e montagem automática das lâminas por meio do equipamento Tissue Tek SCA (Sakura Seiki, Nagano, Japão).

4.2 Quantificação

As lâminas foram examinadas em microscopia de luz, com aumento de 400x, por dois patologistas experientes, de forma independente, sendo fotografados mais

de dois campos por lâmina. A análise dos tumores foi realizada através do software ImageJ 1.45S. Cada patologista realizou uma análise descritiva de cada caso. Apenas a coloração nuclear foi considerada positiva.

As amostras foram individualmente classificados como grau 0 ($\leq 25\%$ de células positivas), grau 1 ($> 25\%$ e $\leq 50\%$ de células positivas), grau 2 ($> 50\%$ e $\leq 75\%$ de células positivas) e de grau 3 ($> 75\%$), como anteriormente descrito (Brell et al., 2011).

4.3 Análise Estatística

Foi utilizado o teste estatístico KRUSKAL-WALLIS, pois foram comparados mais de três grupos, de variáveis não paramétricas e ordinais. O método de comparação de médias escolhido foi o de Dunn (Acar; Sun, 2013).

Foi comparada a expressão das proteínas nos diferentes tumores odontogênicos entre si, e entre o grupo formado pela consolidação dos tumores quanto à origem: epitelial, mista ou ectomesenquimal.

A estatística foi realizada com o programa BioEstat 5.3 disponibilizado livremente pela fundação Mamirauá.

5 RESULTADOS

Os tumores estudados mostraram médias de idade entre a primeira e terceira décadas de vida, os tumores foram mais prevalentes em mulheres, e foram mais frequentes na mandíbula, a tabela 5.1 mostra estes dados com maior detalhes.

Tabela 5.1 - Informações clínicas dos 87 casos estudados

Tumor	Idade (anos)	N	Sexo		Local	
			M	F	Md	Mx
Ameloblastoma	33 (16-71)	20*	10 (52%)	9 (48%)	16 (94%)	1 (6%)
TOC	29 (10-65)	10	7 (70%)	3 (30%)	8 (80%)	2 (20%)
TOA	16 (11-40)	10	4 (40%)	6 (60%)	6 (60%)	4 (40%)
TOEC	32 (07-43)	10	5 (50%)	5 (50%)	5 (50%)	5 (50%)
TOCC	29 (11-51)	10	5 (50%)	5 (50%)	6 (60%)	4 (40%)
FA	11 (11-12)	4	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)	0
FOA	19 (11-28)	2	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0
FOC	38 (18-54)	4	2 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	3 (75%)
FOP	34 (19-51)	7*	4 (57%)	3 (43%)	3 (75%)	1 (25%)
OM	26 (17-50)	10	7 (70%)	3 (30%)	8 (80%)	2 (20%)

* Não havia informação disponível sobre todos os casos.

Abreviações: M: masculino; F: feminino, Md: mandíbula; Mx; maxila. Tumor odontogênico ceratocístico (TOC), odontogênico adenomatóide (TOA), tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC), tumor odontogênico cístico calcificante (tocc), fibroma ameloblástico (FA), fibro-odontoma ameloblástico (FOA), fibroma odontogênico central (FOC), fibroma odontogênico periférico (FOP) e mixoma odontogênico (MO).

A DNMT1, 3a e 3b foram expressas no núcleo e/ou citoplasma de todos os tumores odontogênicos. O resultado representando a percentagem de células

positivas quanto a expressão nuclear de DNMT1, 3a e 3b em cada tumor é mostrado nas tabelas 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente.

Tabela 5.2 – Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metiltransferase 1 em tumores odontogênicos

	N	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Ameloblastoma	20	0	0	10 (50%)	10 (50%)
TOC	10	0	2 (20%)	4 (40%)	4(40%)
TOA	10	0	8 (80%)	2 (20%)	0
TOEC	10	8 (80%)	0	2 (20%)	0
TOCC	10	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0
FA	4	0	0	3 (75%)	1 (25%)
FOA	2	1 (50%)	0	1 (50%)	0
FOC	4	0	0	1 (25%)	3 (75%)
FOP	7	0	0	7 (100%)	0
‘OM	10	3 (30%)	0	0	7 (70%)

Abreviações: Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC), Odontogênico Adenomatóide (TOA), Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC), Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC), Fibroma Ameloblástico (FA), Fibro-Odontoma Ameloblástico (FOA), Fibroma Odontogênico Central (FOC), Fibroma Odontogênico Periférico (FOP) e Mixoma Odontogênico (MO).

Tabela 5.3 – Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metil-transferase 3A em tumores odontogênicos

	N	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Ameloblastoma	20	20 (100%)	0	0	0
TOC	10	9 (90%)	0	1 (10%)	0
TOA	10	10 (100%)	0	0	0
TOEC	10	8 (80%)	0	2 (20%)	0
TOCC	10	10 (100%)	0	0	0
FA	4	4 (100%)	0	0	0
FOA	2	2 (100%)	0	0	0
FOC	4	4 (100%)	0	0	0
FOP	7	7 (100%)	0	0	0
OM	10	10 (100%)	0	0	0

Abreviações: Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC), Odontogênico Adenomatóide (TOA), Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC), Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC), Fibroma Ameloblástico (FA), Fibro-Odontoma Ameloblástico (FOA), Fibroma Odontogênico Central (FOC), Fibroma Odontogênico Periférico (FOP) e Mixoma Odontogênico (MO).

Tabela 5.4 – Representação da porcentagem de células positivas para o anticorpo DNA metil-transferase 3B em tumores odontogênicos

	N	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Ameloblastoma	20	0	0	5 (25%)	15 (75%)
TOC	10	0	0	0	10 (100%)
TOA	10	0	0	1 (10%)	9 (90%)
TOEC	10	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	0
TOCC	10	10 (100%)	0	0	0
FA	4	0	0	0	4 (100%)
FOA	2	0	0	0	2 (100%)
FOC	4	1 (25%)	3 (75%)	0	0
FOP	7	0	1 (14%)	6 (86%)	0
OM	10	10 (100%)	0	0	0

Abreviações: Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC), Odontogênico Adenomatóide (TOA), Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC), Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC), Fibroma Ameloblástico (FA), Fibro-Odontoma Ameloblástico (FOA), Fibroma Odontogênico Central (FOC), Fibroma Odontogênico Periférico (FOP) e Mixoma Odontogênico (MO).

Em ameloblastoma, a expressão nuclear da DNMT1 foi observada em mais de 50% das células tumorais centrais e periféricas das ilhas de epitélio odontogênico (Figura 5.1A).

A expressão nuclear da DNMT1 no TOC foi predominante em mais de 50% das células e principalmente em células da camada supra basal (Figura 5.1B).

A expressão nuclear de DNMT1 em TOA foi observada em cerca de 50% das células, a expressão foi mais evidente nas estruturas ductiformes e semelhantes a rosetas (Figura 5.1C). Os tumores que mostravam menor quantidades destas estruturas apresentaram uma expressão menor.

Em TOEC, as células tumorais poliédricas não mostraram expressão em 80% dos casos (Figura 5.1D). No entanto, as células claras, quando presentes, foram positivas (Figura 5.1D da ampliação).

A DNMT1 expressa em TOCC foi principalmente citoplasmática na camada basal (Figura 5.1E). Em dois casos (20%) uma expressão nuclear foi observada apenas nesta camada (Figura 5.1E, ampliação).

Nos outros tumores, odontogênico mistos, FA e FOA, a expressão nuclear de DNMT1 foi observada em mais de 50% das células epiteliais e nas células do estroma (figura componente 5.11F e 5.1G).

Nos tumores odontogênicos mesenquimais com ou sem epitélio odontogênico observou-se a expressão nuclear de DNMT1 em mais de 50% das células, FOC e FOP foram positivos em ambos, epitélio odontogênico e células mesenquimais (Figura 5.11H e 5.1I).

No MO, a expressão nuclear de DNMT1 foi observado em mais de 75% das células estreladas e fusiformes (Figura 5.1J).

Expressão DNMT3a foi predominantemente citoplasmática em todos os tumores odontogênicos. No ameloblastoma, a expressão citoplasmática foi observada nas células periféricas e centrais (Figura 5.2A).

A expressão na TOC foi observada principalmente na camada de células supra basais (Figura 5.2B).

A expressão do DNMT3a em TOA foi predominantemente citoplasmática e mais evidente nas estruturas de ductiformes e semelhantes a rosetas (Figura 5.2C).

A expressão citoplasmática de TOEC foi evidente em todas as células epiteliais, no entanto, os tumores com células claras mostrou evidente expressão nuclear (Figura 5.2D).

Em TOCC, uma expressão nuclear de DNMT3a não foi observada, e uma expressão citoplasmática foi encontrada principalmente em células basais (Figura 5.2E). A expressão em células fantasmas não foram consideradas.

Em tumores epiteliais odontogênicos, mistos, FA e FOA a expressão de DNMT3a foi principalmente citoplasmática (Figura 5.2F e 5.2G), no entanto, nas células mesenquimais de FA a expressão foi observada no núcleo, enquanto a FOA mostrou nenhuma expressão.

Em tumores odontogênicos ectomesenquimais com ou sem epitélio odontogênico a expressão de DNMT3a foi observada apenas no citoplasma das células epiteliais, enquanto foi negativo nas células mesenquimais (Figura 5.2H, 5.2I e 5.2J).

Figura 5.1 – Imuno-expressão da DNMT 1 em Tumores odontogênicos

Legenda: A – ameloblastoma; B – tumor odontogênico ceratocístico; C – odontogênico adenomatóide; D – tumor odontogênico epitelial calcificante; E – tumor odontogênico cístico calcificante, F - fibroma ameloblástico, G – fibro-odontoma ameloblástico; H – fibroma odontogênico central; I – fibroma odontogênico periférico e J – mixoma odontogênico.

Figura 5.2 – Imuno-expressão da DNMT 3A em Tumores odontogênicos

Legenda: A – ameloblastoma; B – tumor odontogênico ceratocístico; C – odontogênico adenomatóide; D – tumor odontogênico epitelial calcificante; E – tumor odontogênico cístico calcificante; F - fibroma ameloblástico; G – fibro-odontoma ameloblástico; H – fibroma odontogênico central; I – fibroma odontogênico periférico e J – mixoma odontogênico.

A expressão de DNMT3b foi variável nos grupos de tumores odontogênicos, em ameloblastomas a expressão foi predominantemente nuclear tanto nas células periféricas e centrais (Figura 5.3A).

Em TOC mais de 75% das células eram positivas, principalmente em células da camada supra basal (Figura 5.3B).

Em TOA, a expressão de DNMT3b foi observada principalmente em estruturas ductiformes e semelhantes a rosetas (Figura 5.3C), adicionalmente, mais de 50% de células positivas foram observadas em todos os casos.

CEOT apresentaram expressão nuclear em 40% dos casos, esta positividade foi observada em células epiteliais poliédricas e em células claras (Figura 5.3D).

A expressão do DNMT3b nuclear não foi observada em TOCC (Figura 5.3E).

Mais de 75% das células centrais e periféricas de ilhas epiteliais apresentaram expressão nuclear em todos os casos de FA e FOA, e também foi observada na expressão nuclear em células mesenquimais (Figura 5.3F e 5.3G).

Quando o FOC foi analisado, um caso não mostrou positividade para a expressão nuclear de DNMT3b, e no outro caso, esta expressão foi observada em pelo menos 50% das células do epitélio odontogênico. Além disso, a positividade em células mesenquimais foi baixa (Figura 5.3H). Em contraste, as células epiteliais e mesenquimais do FOP foram positivas em mais de 50% (Figura 5.3I), com exceção de um caso. Em MO, não foi observada expressão de DNMT 3b (Figura 5.3J).

Figura 5.3 – Imuno-expressão da DNMT 3B em Tumores odontogênicos

Legenda: A – ameloblastoma; B – tumor odontogênico ceratocístico; C – odontogênico adenomatóide; D – tumor odontogênico epitelial calcificante; E – tumor odontogênico cístico calcificante, F - fibroma ameloblástico, G – fibro-odontoma ameloblástico; H – fibroma odontogênico central; I – fibroma odontogênico periférico e J – mixoma odontogênico.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico KRUSKAL-WALLIS, a proteína DNMT3a, teve uma expressão nuclear muito baixa o que tornou o teste estatístico inconclusivo, tanto na comparação das lesões entre si, como na comparação em grupos consolidados.

Para utilização do teste em questão, idealmente deve-se pressupor grupos com no mínimo 06 amostras. No nosso caso, pela própria raridade das lesões estudadas, isso não foi possível em todos os grupos, assim para aumentar a confiabilidade do teste, consolidamos o grupo FOC como o FOP, pois apesar de localizações distintas são lesões muito semelhantes histopatologicamente, assim como o grupo FA e FOA, que possuem como principal diferenciação a presença de tecido calcificado na lesão, assim nenhum dos grupos estudados tiveram menos de seis amostras (Tabela 5.5).

Quando consolidamos os tumores em grupos de acordo com a origem embrionária do tecido tumoral, podemos perceber que a expressão da DNMT1 nos tumores epiteliais e mesenquimais não diferiram estatisticamente entre si, no entanto foram significativamente maiores quando comparado com os tumores mistos (Tabela 5.5).

Já quando avaliada a expressão da DNMT3b foi possível perceber uma maior expressão dos tumores epiteliais, diferença estatisticamente significativa, em relação aos ectomesenquimais, e mistos, não sendo possível diferenciar estatisticamente estes últimos entre si.

Tabela 5.5 – Resultado da comparação da expressão da DNMT1 e 3b através do teste de KRUSKAL-WALLIS em tumores odontogênicos epiteliais, mistos e ectomesenquimais

GRUPOS			DNMT1	DNMT3b
			P	p
Epitelial	X	Misto	< 0.05	< 0.05
Epitelial	X	Ectomesenquimal	Ns	< 0.05
Misto	X	Ectomesenquimal	< 0.05	ns

Os dados sobre a expressão da DNMT1 em ameloblastoma demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre ele e o TOA, TOEC e TOCC.

No caso do TOC a expressão, da DNMT1, diferiu de forma estatisticamente significativa do TOEC e TOCC.

O TOEC além de se destacar dos dois tumores anteriores também teve uma diferença estatística significativa em relação aos tumores ectomesenquimais MO, FOP e FOC.

O TOCC também teve uma expressão que o distinguiu com significância estatística do Ameloblastoma, TOC, TOCC e tumores ectomesenquimais (MO, FOA e FO).

A expressão do DNMT3b mostrou diferença estatisticamente significativa entre o ameloblastoma e o TOEC, TOCC, MO.

O TOC demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao TOEC, TOCC E MO.

No TOA a DNMT3b demonstrou diferença estatisticamente significativa na expressão em relação TEOC, TOCC e MO.

O TEOC se diferenciou do FOA e FO além dos já citados.

FOA e FA diferenciaram do MO com significância estatística.

As demais comparações entre os grupos apesar de mostrarem diferenciação entre os valores expressos, quando os dados foram confrontados ao teste estatístico esta diferença não tinha significância (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Resultado da comparação da expressão da DNMT1 e 3b através do teste de KRUSKALL-WALLIS nos tumores odontogênicos

GRUPOS			DNMT1 p	DNMT3b p
Ameloblastoma	X	TOC	ns	ns
Ameloblastoma	X	TOA	< 0.05	ns
Ameloblastoma	X	TOEC	< 0.05	< 0.05
Ameloblastoma	X	TOCC	< 0.05	< 0.05
Ameloblastoma	X	AF +AFO	ns	ns
Ameloblastoma	X	FOC+ FOP	ns	ns
Ameloblastoma	X	MO	ns	< 0.05
TOC	X	TOA	ns	ns
TOC	X	TOEC	< 0.05	< 0.05
TOC	X	TOCC	< 0.05	< 0.05
TOC	X	FA +FOA	ns	ns
TOC	X	FOC+ FOP	ns	ns
TOC	X	MO	ns	< 0.05
TOA	X	TOEC	ns	< 0.05
TOA	X	TOCC	ns	< 0.05
TOA	X	FA +FOA	ns	Ns
TOA	X	FOC+ FOP	ns	ns
TOA	X	MO	ns	< 0.05
TOEC	X	TOCC	ns	ns
TOEC	X	FA +FOA	ns	< 0.05
TOEC	X	FOC+ FOP	< 0.05	ns
TOEC	X	MO	< 0.05	ns
TOCC	X	FA +FOA	ns	< 0.05
TOCC	X	FOC+ FOP	< 0.05	ns
TOCC	X	MO	< 0.05	ns
FA +FOA	X	FOC+ FOP	ns	ns
FA +FOA	X	MO	ns	< 0.05
FOC+ FOP	X	MO	ns	ns

Abreviações: Tumor Odontogênico Ceratocístico (TOC), Odontogênico Adenomatóide (TOA), Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC), Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC), Fibroma Ameloblástico (FA), Fibro-Odontoma Ameloblástico (FOA), Fibroma Odontogênico Central (FOC), Fibroma Odontogênico Periférico (FOP) e Mixoma Odontogênico (MO).

6 DISCUSSÃO

Recentemente, tem sido sugerido que a metilação aberrante do ADN no sítio CpG é um evento comum em tumores odontogênicos, uma vez que vários genes são metilados nestes tumores (Moreira et al., 2009b; Kitkumthorn; Mutirangura, 2010). A presença de células tronco com ausência total de metilação no sítio CpG (Lister et al., 2009), provavelmente mantidas nesta condição pluripotente pela não metilação, situação não encontrada em células bem diferenciadas, ressalta a importância da metilação no processo de diferenciação celular e provavelmente na tumorigênese de maneira geral. No presente estudo, a expressão das proteínas de DNA-metiltransferase 1, 3a e 3b foi avaliada neste grupo de tumores. Nossos resultados mostram que a metilação é um evento comum em tumores odontogênicos, e que DNMT1 e 3b estão mais envolvidos nos eventos de metilação do que DNMT3a.

A DNMT1 é considerada uma enzima de manutenção do perfil de metilação celular, que copia os padrões de metilação do ADN após a replicação, mantendo nas gerações subsequentes os perfis de metilação da geração anterior, tenham sido eles adquiridos ou recebidos das gerações precedentes (Moore et al., 2013). Em concordância com os nossos resultados, Moreira et al. (2009b) avaliaram a expressão desta proteína em ameloblastoma, TOC e TOA, e mostrou imunopositividade em todas as camadas de células. No entanto, o nosso estudo mostrou uma expressão no TOA, principalmente em estruturas semelhantes a roseta, demonstrando diferenças nos padrões de expressão entre populações celulares distintas dentro de um mesmo tumor.

A imuno-expressão nuclear da DNMT1 foi baixa em TOEC e TOCC e diferente estatisticamente quando comparada a outros tumores como ameloblastomas, TOC e COF e MO. Assim, os tumores que exibem algum grau de calcificação tinham níveis baixos de expressão das proteínas DNMT1 e 3b. Nós não fomos capazes de encontrar informações na literatura para apoiar esses achados. Por outro lado têm sido relatados vários mecanismos epigenéticos envolvidos na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (MSC) in vitro, (Eslaminejad et al., 2013). A falta de alteração nos níveis de metilação da região

promotora após a diferenciação das MSCs osteogênicas *in vitro* foi também relatada (Kang et al., 2007). O que pode justificar esta distinção das imunoexpressões das DNMTs em tumores com formação com formação de tecido calcificado quando comparado a tumores não calcificados

É interessante ressaltar que com a análise das médias de expressão da DNMT1 entre os tumores epiteliais e ectomesenquimais não foi possível perceber diferença estatisticamente significativa entre estes grupos apesar dos tumores ectomesenquimais terem tido proporcionalmente uma maior expressão que os tumores epiteliais, porém os dois grupos diferiram estatisticamente da expressão dos tumores mistos, que tiveram uma expressão menor, com significância estatística, sugerindo um menor atuação desta enzima neste tipo de tumor. Por outro lado a DNMT3b demonstrou uma maior expressão em tumores epiteliais, com diferença estatisticamente significativa com relação as lesões ectomesenquimais, porém a expressão nas lesões mistas foi intermediária entre os dois outros grupos, não podendo ser distinguida estatisticamente de nenhum dos dois grupos, o que pode sugerir um maior atuação de novos sítios de metilação nos tumores epiteliais.

A função da DNMT3a é estabelecer novos padrões de metilação sem alterar o ADN, alterando o fenótipo sem alterar o genótipo. Sua expressão tem sido relacionada à progressão da astroenteropancreatite (GEP) tumores neuroendócrinos (Rahman et al., 2010), mau prognóstico em carcinoma hepatocelular (Oh et al., 2007) e um possível marcador de agressividade do câncer de mama (Ben Gacem et al., 2012). Neste estudo, a expressão da DNMT3a foi predominantemente citoplasmática sugerindo uma menor participação na progressão tumoral odontogênica ou manutenção. Esta afirmação é justificada pelo entendimento de que as DNMTs expressas no núcleo são, na verdade, as proteínas DNMTs funcionais. As DNMTs são sintetizadas, armazenadas no citoplasma e, em seguida, mudam-se para o núcleo para desempenhar a sua função enzimática, assim a expressão citoplasmática das DNMTs é compreensível (Eslaminejad et al., 2013). A expressão nuclear foi observada apenas em células claras de TOEC.

Vários autores (Hansen et al., 1985; Anavi et al., 2003) sugerem que a presença de células claras pode indicar um aumento da agressividade do tumor. Foi interessante constatar no nosso estudo, que apenas TOEC com células claras, que

foram positivos também para DNMT 1 e 3b, enquanto TOEC sem essas células foram negativos. Corroborando com a evidência de que TOEC com células claras é uma variante distinta do TOEC convencional.

Os DNMT3b também está relacionado com o início na metilação do ADN nativo (Moore et al., 2013). O que dificulta a melhor compreensão dos nossos resultados é que não existem relatos anteriores sobre a expressão de DNMT3b em tumores odontogênicos. A sua expressão nuclear foi observada na maioria dos tumores, exceto em TOCC, TOEC e MO. Este baixo nível de expressão pode estar relacionado com uma diminuição da metilação do gene.

Além disso, Moreira e colaboradores (Moreira et al., 2009a; Moreira et al., 2009b; Moreira et al., 2011) observaram baixos níveis metilação em genes associados do ciclo celular em TOCC quando comparado com o folículo dentário normal. Eles também descobriram hipometilação de vários genes supressores de tumor em MO. Este achado pode estar relacionado com o resultado relatado aqui de uma ausência de expressão de DNMT3a e 3b, embora DNMT1 tenha sido expressa em 70% dos casos de MO. Mais estudos precisam ser realizados para esclarecer esses achados. É importante ressaltar que a ausência de metilação pode ser visto em células tronco pluripotentes, e que à medida que estas células vão se diferenciando, padrões mais complexos de metilação vão se estabelecendo (Lister et al., 2009), outro fato importante é que o padrão exerce um controle sobre a ação dos micro-ARN, e a diminuição ou ausência de metilação permite a ação de Micro-ARN, que em outra situação não seriam produzidos (Moore et al., 2013).

Devido à elevada expressão das DNMTs elevados na maioria dos tumores de células epiteliais odontogênicas, é possível especular que a metilação está de algum modo desregulado nestas neoplasias possivelmente contribuindo para a sua formação ou manutenção. É interessante considerar que, em lesões com participação mesenquimal e epitelial, como FA e FOA e apenas ectomesênquima, como FOC e FOP foram positivos para DNMT1 e 3b. No entanto, no MO em que a participação do epitélio estava ausente, apenas a marcação da DNMT1 era evidente. Para esclarecer essas questões, será importante realizar um perfil de metilação nestes tumores, comparando com os diferentes estágios de desenvolvimento dos dentes.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a expressão DNMT foi encontrada em todos os grupos de tumores odontogênicos. Além disso, alguns grupos celulares do mesmo tumor tinham imunoexpressões muito maior e mais evidente, como as células que formavam estruturas de ductiformes e semelhante a rosetas do TOA e as células claras no TOEC. Entre as enzimas estudadas a DNMT1 e 3b foram expressas no núcleo das células, o que sugere um papel fundamental destas enzimas no processo de metilação de tumores odontogênicos.

Assim, a expressão elevada de DNMTs em células tumorais sugere metilação em células odontogênicas como um mecanismo importante para este grupo de tumores.

REFERÊNCIAS¹

Abiko Y, Nagayasu H, Takeshima M, Yamazaki M, Nishimura M, Kusano K, Kitajo H, Saitoh M, Kawakami T, Chiba I, Kaku T. Ameloblastic carcinoma ex ameloblastoma: report of a case-possible involvement of CpG island hypermethylation of the p16 gene in malignant transformation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2007 Jan;103(1):72-6.

Acar EF, Sun L. A generalized kruskal-wallis test incorporating group uncertainty with application to genetic association studies. *Biometrics*. 2013 Jun;69(2):427-35.

Águida ACG, Cazal C, Fonsêca DDD, Bello DMA, Araújo NC, Castor JFL. Considerações sobre a classificação e o comportamento dos tumores odontogênicos epiteliais: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55(2):175.

Ahuja A, Mathur S, Iyer VK. Acanthomatous ameloblastoma masquerading as a squamous cell carcinoma. *Cytopathology*. 2012 Apr 25.

Alaeddini M, Salehizadeh S, Baghaili F, Etemad-Moghadam S. A retrospective analysis of peripheral odontogenic fibroma in an Iranian population. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Sept;68(9):2099-103.

Anavi Y, Kaplan I, Citir M, Calderon S. Clear-cell variant of calcifying epithelial odontogenic tumor: clinical and radiographic characteristics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2003 Mar;95(3):332-9.

Bachmann AM, Linfesty RL. Ameloblastoma, solid/multicystic type. *Head Neck Pathol*. 2009 Dec;3(4):307-9.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours - pathology and genetics - head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. 435 p.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000 Apr;16(4):168-74.

Belgaumi UI, Sundaresh KJ, Varma S, Mallikarjuna R. Desmoplastic ameloblastoma: a rare odontogenic neoplasm with unusual radiographic and histomorphological presentation. *BMJ Case Rep.* 2013 May 2.

Ben Gacem R, Hachana M, Ziadi S, Ben Abdelkarim S, Hidar S, Trimeche M. Clinicopathologic significance of DNA methyltransferase 1, 3a, and 3b overexpression in Tunisian breast cancers. *Human Pathol.* 2012 Oct;43(10):1731-8.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Mol Genet.* 2000 Oct;9(16):2395-402.

Bhargava D, Deshpande A, Pogrel MA. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT)--a cyst to a tumour. *Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jun;16(2):163-70.

Bhattacharyya I, Cohen D, Islam N. Diagnostic discussion. Odontogenic myxoma. *Today's FDA.* 2013 May-Jun;25(3):35-7.

Borghese B, Santulli P, Hequet D, Pierre G, de Ziegler D, Vaiman D, Chapron C. Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis. *Am J Pathol.* 2012 May;180(5):1781-6.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science.* 2001 Dec;294(5551):2536-9.

Brauer HU, Diaz C, Manegold-Brauer G. Radiographic assessment of a keratocystic odontogenic tumour using cone-beam computed tomography. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013 Jun;14(3):173-7.

Brell M, Ibanez J, Tortosa A. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase protein expression by immunohistochemistry in brain and non-brain systemic tumours: systematic review and meta-analysis of correlation with methylation-specific polymerase chain reaction. *BMC Cancer*. 2011 Jan 26;11:35.

Buchner A. The central (intraosseous) calcifying odontogenic cyst: an analysis of 215 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991 Apr;49(4):330-9.

Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Sept;64(9):1343-52.

Carnelio S, Vij H. Expression of tenascin and nucleolar organizer region in ameloblastoma and ameloblastic fibroma. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):223-9.

Cavaliere Gomes C, da Silveira e Oliveira C, Santos Pimenta LG, De Marco L, Santiago Gomez R. Immunolocalization of DNMT1 and DNMT3a in salivary gland neoplasms. *Pathobiology*. 2009 May;76(3):136-40.

Channappa NK, Krishnapillai R, Rao JB. Cystic variant of calcifying epithelial odontogenic tumor. *J Investig Clin Dent*. 2012 May;3(2):152-6.

Chedin F. The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;101:255-85.

Chen CY, Wu CW, Wang WC, Lin LM, Chen YK. Clear-cell variant of calcifying epithelial odontogenic tumor (Pindborg tumor) in the mandible. *Int J Oral Sci*. 2013 Jun;5(2):115-9.

Chhabra V, Chhabra A. Central odontogenic fibroma of the mandible. *Contemp Clin Dent*. 2012 Apr;3(2):230-3.

Cohen DM, Bhattacharyya I. Ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and odontoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2004 Aug;16(3):375-84.

Compere SJ, Palmiter RD. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*. 1981 Jul;25(1):233-40.

Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr.* 2012 Jun;3(1):21-38.

Crivelini MM, Soubhia AM, Felipini RC. Study on the origin and nature of the adenomatoid odontogenic tumor by immunohistochemistry. *J Appl Oral Sci.* 2005 Dec;13(4):406-12.

Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG. Differentiation of neural-crest-derived intermediate pluripotent progenitors into committed periodontal populations involves unique molecular signature changes, cohort shifts, and epigenetic modifications. *Stem Cells Dev.* 2011 Jan;20(1):39-52.

Daniels JS. Central odontogenic fibroma of mandible: a case report and review of the literature. *Oral Sur, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod.* 2004 Sept;98(3):295-300.

de Lima AP, Kitakawa D, Almeida JD, Brandao AA, Anbinder AL. Peripheral calcifying cystic odontogenic tumour of the maxillary gingiva. *BMC Res Notes.* 2012 Aug;5:455.

De Riu G, Meloni SM, Contini M, Tullio A. Ameloblastic fibro-odontoma. Case report and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010 Mar;38(2):141-4.

DeLair D, Bejarano PA, Peleg M, El-Mofty SK. Ameloblastic carcinosarcoma of the mandible arising in ameloblastic fibroma: a case report and review of the literature. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod.* 2007 Apr;103(4):516-20.

Economopoulou P, Sotiriadou S. An unusual tumor of the mandible with features of unicystic ameloblastoma and ameloblastic fibroma. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Oct;56(10):1196-200.

El-Osta A. DNMT cooperativity--the developing links between methylation, chromatin structure and cancer. *BioEssays.* 2003 Nov;25(11):1071-84.

Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J.* 2013 Spring;15(1):1-10.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr;61(8):3225-9.

Farias LC, Gomes CC, Rodrigues MC, de Castro WH, Lacerda JC, Ferreira EF; Gomez RS. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma. *BMC Clin Pathol.* 2012 Aug;12:11.

Feng J, Chang H, Li E, Fan G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2005 Mar;79(6):734-46.

Gadewar DR, Srikant N. Adenomatoid odontogenic tumour: tumour or a cyst, a histopathological support for the controversy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Apr;74(4):333-7.

Gish JE, Lessin ME. Ameloblastic fibroma diagnosis, treatment and propensity for misidentification. *N Y State Dent J.* 2013 Apr;79(3):22-4.

Gomes CC, Brito JA, Andrade CI, Gomez RS. DNA methyltransferase expression in odontogenic cysts and tumours. *Oncol Lett.* 2010a Jan;1(1):143-6.

Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2010b Sept;39(8):585-91.

Gomes CC, Oliveira C da S, Castro WH, de Lacerda JC, Gomez RS. Clonal nature of odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med.* 2009 Apr;38(4):397-400.

Gonzalez-Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Delgado-Rodriguez M, Martinez-Mata G, Gil-Montoya JA, Diaz-Franco MA; Bravo-Péres JJ, M-González N. Analysis of p53 protein by PAb240, Ki-67 expression and human papillomavirus DNA detection in different types of odontogenic keratocyst. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1A):175-81.

Gopinathan G, Kolokythas A, Luan X, Diekwisch TG. Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. *Stem Cells Dev.* 2013 Jun;22(12):1763-78.

Gorlin RJ, Pindborg JJ, Odont, Clausen FP, Vickers RA. The calcifying odontogenic cyst--a possible analogue of the cutaneous calcifying epithelioma of Malherbe. An analysis of fifteen cases. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.* 1962 Oct;15:1235-43.

Haluskova J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biol.* 2010;56(3):83-96.

Hansen LS, Eversole LR, Green TL, Powell NB. Clear cell odontogenic tumor--a new histologic variant with aggressive potential. *Head Neck Surg.* 1985 Nov-Dec;8(2):115-23.

Hertog D, Bloemena E, Aartman IH, van-der-Waal I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Jan;17(1):e76-82.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan;187(4173):226-32.

Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948 Aug;175(1):315-32.

Ide F, Shimoyama T, Horie N. Basaloid squamous cell carcinoma versus basal cell ameloblastoma. *Oral Oncol.* 1998 Mar;34(2):154-5.

Jindal C, Bhola RS. Ameloblastic fibroma in six-year-old male: Hamartoma or a true neoplasm. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011 sept;15(3):303-5.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 May;13(7):484-92.

Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, Baek KH, Kim CC, Rhyu MG. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem.* 2007 Sept;102(1):224-39.

Kansy K, Juergens P, Krol Z, Paulussen M, Baumhoer D, Bruder E, Schneider J, Zeilhofer HF, Schwenger-Zimmerer K. Odontogenic myxoma: diagnostic and therapeutic challenges in paediatric and adult patients--a case series and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Apr;40(3):271-6.

Kato N, Endo Y, Tamura G, Motoyama T. Ameloblastoma with basal cell carcinoma-like feature emerging as a nasal polyp. *Pathol Int.* 1999 Aug;49(8):747-51.

Khojasteh A, Khodayari A, Rahimi F, Ghaderian MH, Jafarian M, Nayebi A, Akbarzadeh Najar R, Tabatabayipناه A, Jahangirnia A. Hypermethylation of p16 tumor-suppressor gene in ameloblastic carcinoma, ameloblastoma, and dental follicles. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Jan;71(1):62-5.

Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis.* 2010 Apr;16(3):286-91.

Kitsoulis P, Charchanti A, Paraskevas G, Marini A, Karatzias G. Adamantinoma. *Acta Orthop Belg.* 2007 Aug;73(4):425-31.

Kobayashi K, Murakami R, Fujii T, Hirano A. Malignant transformation of ameloblastic fibroma to ameloblastic fibrosarcoma: case report and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surgery.* 2005 Oct;33(5):352-5.

Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). *Mol Medicine Rep.* 2012 Apr;5(4):883-9.

Kousar A, Hosein MM, Ahmed Z, Minhas K. Rapid sarcomatous transformation of an ameloblastic fibroma of the mandible: case report and literature review. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod.* 2009 Sept;108(3):e80-5.

Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2006 Feb;35(2):65-74.

Lee SK, Kim YS. Current concepts and occurrence of epithelial odontogenic tumors: I. Ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Korean J Pathol.* 2013 Jun;47(3):191-202.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992 Jun;69(6):915-26.

Li TJ, Sun LS, Luo HY. Odontogenic myxoma: a clinicopathologic study of 25 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 Dec;130(12):1799-806.

Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009 Nov;462(7271):315-22.

Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *Tex Dent J*. 2008 May;125(5):446-54.

Manne RK, Kumar VS, Venkata Sarath P, Anumula L, Mundlapudi S, Tanikonda R. Odontogenic myxoma of the mandible. *Case Rep Dent*. 2012;2012:214704.

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008 Aug;454(7205):766-70.

Mohamed A, Singh AS, Raubenheimer EJ, Bouckaert MM. Adenomatoid odontogenic tumour: review of the literature and an analysis of 33 cases from South Africa. *Int J Oral Maxillofacial surgery*. 2010 Sept;39(9):843-6.

Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23-38.

Moreira PR, Cardoso FP, Brito JA, Batista AC, Gomes CC, Gomez RS. Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. *Braz Dent J*. 2011;22(5):422-7.

Moreira PR, Guimaraes MM, Gomes CC, Diniz MG, Brito JA, de Castro WH; et al. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol*. 2009a Oct;54(10):893-7.

Moreira PR, Guimaraes MM, Guimaraes AL, Diniz MG, Gomes CC, Brito JÁ, Gomez RS. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med*. 2009b Jan;38(1):99-103.

Mori G, Ballini A, Carbone C, Oranger A, Brunetti G, Di Benedetto A, Rapone B, Cantore S, Di Comite M, Colucci S, Grano M, Grassi FR. Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *Int J Med Sci*. 2012;9(6):480-7.

Mosby EL, Russell D, Noren S, Barker BF. Ameloblastic fibroma in a 7-week-old infant: a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Mar;56(3):368-72.

Munde AD, Karle RR, Kale UB. Ameloblastic fibroma in one-year-old girl. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013 Jan;17(1):149.

Muraki Y, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kawaguchi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Epigenetic DNA hypermethylation: clinical applications in endometrial cancer (Review). *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):967-72.

Nagalaxmi V, Sangmesh M, Maloth KN, Kodangal S, Chappidi V, Goyal S. Unicystic mural ameloblastoma: an unusual case report. *Case Rep Dent*. 2013;2013:957418.

Nagata K, Shimizu K, Sato C, Morita H, Watanabe Y, Tagawa T. Mandibular ameloblastoma in an elderly patient: a case report. *Case Rep Dent*. 2013;2013:145282.

Nagy C, Turecki G. Sensitive periods in epigenetics: bringing us closer to complex behavioral phenotypes. *Epigenomics*. 2012 Aug;4(4):445-57.

Noffke CE, Raubenheimer EJ, Chabikuli NJ, Bouckaert MM. Odontogenic myxoma: review of the literature and report of 30 cases from South Africa. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod*. 2007 Jul;104(1):101-9.

Oakeley EJ. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Ther*. 1999 Dec;84(3):389-400.

Oh BK, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C Park YN. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med*. 2007 Jul;20(1):65-73.

Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jun;26(11):2536-40.

Patra SK, Bettuzzi S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). *Oncol Rep*. 2007 Jun;17(6):1279-90.

Pillai A, Moghe S, Guru KN, Nair PP. Large ameloblastic fibro-odontoma in an 18-year-old girl and review of literature. *BMJ Case Rep*. 2012 Nov 19;2012.

Pontes HA, Pontes FS, Lameira AG, Salim RA, Carvalho PL, Guimaraes DM, Pinto D dos S Jr. Report of four cases of ameloblastic fibro-odontoma in mandible and discussion of the literature about the treatment. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Feb;40(2):e59-63.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*. 1999 Nov;274(46):33002-10.

Prakasam M, Tiwari S, Satpathy M, Banda VR. Adenomatoid odontogenic tumour. *BMJ Case Rep*. 2013 Jun;2013.

Rahman MM, Qian ZR, Wang EL, Yoshimoto K, Nakasono M, Sultana R, Yoshida T, Hayashi T, Haba R, Ishida M, Okabe H, Sano T. DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b overexpression and clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2010 Aug;41(8):1069-78.

Rahman N, Cole E, Webb R. Calcifying epithelial odontogenic tumour presenting at a surgical site: case report. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Jan 3.

Ramachandra SS, Baliga V, Prasad UC. Peripheral odontogenic fibroma associated with a dilacerated maxillary central incisor: a case report. *Compend Contin Educ Dent*. 2011 Oct;32(8):e120-4.

Regezi JA. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol*. 2002 Mar;15(3):331-41.

Rothova M, Peterkova R, Tucker AS. Fate map of the dental mesenchyme: dynamic development of the dental papilla and follicle. *Dev Biol*. 2012 Jun;366(2):244-54.

Sahni P, Nayak MT, Singhvi A, Sharma J. Clear cell calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor involving the maxillary sinus: a case report and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 Sept;16(3):454-9.

Sano K, Yoshida S, Ninomiya H, Ikeda H, Ueno K, Sekine J, Iwamoto H, Uehara M, Inokuchi T. Assessment of growth potential by MIB-1 immunohistochemistry in ameloblastic fibroma and related lesions of the jaws compared with ameloblastic fibrosarcoma. *J Oral Pathol Med*. 1998 Feb;27(2):59-63.

Saxena K, Jose M, Chatra LK, Sequiera J. Adenoid ameloblastoma with dentinoid. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May;16(2):272-6.

Saylam G, Dursun E, Albayrak L, Akmansu H, Korkmaz H, Eryilmaz A. Odontogenic myxoma of the maxilla: a case report. *Kulak Burun Bogaz Ihtisas Derg*. 2007;17(5):294-7.

Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*. 2010 Feb;119(1):35-40.

Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, Lyko F. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*. 2010 Aug;24(15):1590-5.

Shahidi S, Bronoosh P, Daneshbod Y. Follicular ameloblastoma presenting as a sinonasal tumor. *Iran Red Crescent Med J*. 2012 Feb;14(2):113-6.

Shakya H, Khare V, Pardhe N, Mathur E, Chouhan M. Basal cell ameloblastoma of mandible: a rare case report with review. *Case Rep Dent*. 2013;2013:187820.

Sham E, Leong J, Maher R, Schenberg M, Leung M, Mansour AK. Mandibular ameloblastoma: clinical experience and literature review. *ANZ J Surg*. 2009 Oct;79(10):739-44.

Sharma VK, Verma SK, Goyal L, Chaudhary PK. Hemangiomatous ameloblastoma in maxilla: A report of a very rare case. *Dent Res J*. 2012 May;9(3):345-9.

Shieh YS, Shiah SG, Jeng HH, Lee HS, Wu CW, Chang LC. DNA methyltransferase 1 expression and promoter methylation of E-cadherin in mucoepidermoid carcinoma. *Cancer*. 2005 Sept;104(5):1013-21.

Siar CH, Lau SH, Ng KH. Ameloblastoma of the jaws: a retrospective analysis of 340 cases in a Malaysian population. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Mar;70(3):608-15.

Singh N, Sahai S, Singh S. Calcifying epithelial odontogenic tumor (Pindborg tumor). *Ntl J Maxillofac Surg*. 2011 Jul;2(2):225-7.

Sivakumar G, Kavitha B, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B. Odontogenic myxoma of maxilla. *Indian J Dent Res*. 2008 Jan-Mar;19(1):62-5.

Sivapathasundharam B, Manikandhan R, Sivakumar G, George T. Ameloblastic fibro odontoma. *Indian J Dent Res*. 2005 Jan-Mar;16(1):19-21.

Slootweg PJ. Lesions of the jaws. *Histopathology*. 2009 Mar;54(4):401-18.

Solarin EO, Mosadomi A. Adenomatoid odontogenic tumour (adenoameloblastoma). *Br J Oral Surg.* 1977 Jul;15(1):26-31.

Srikant N. Cystic adenomatoid odontogenic tumour: the master of disguise. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2010 Jul;74(7):836-7; author reply 7.

Sun ZJ, Wu YR, Cheng N, Zwahlen RA, Zhao YF. Desmoplastic ameloblastoma - a review. *Oral Oncol.* 2009 Sept;45(9):752-9.

Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, Kellner S, Frye M, Helm M, Stoecklin G, Lyko F. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Sept;19(9):900-5.

Uchiyama Y, Akiyama H, Murakami S, Koseki T, Kishino M, Fukuda Y, Shimizutani K, Furukawa S. Calcifying cystic odontogenic tumour: CT imaging. *Br J Radiol.* 2012 May;85(1013):548-54.

Vanoven BJ, Parker NP, Petruzzelli GJ. Peripheral ameloblastoma of the maxilla: a case report and literature review. *Am J Otolaryngol.* 2008 Sept-Oct;29(5):357-60.

Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Mar;15(1):5-17.

Williams MD, Hanna EY, El-Naggar AK. Anaplastic ameloblastic fibrosarcoma arising from recurrent ameloblastic fibroma: restricted molecular abnormalities of certain genes to the malignant transformation. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod.* 2007 Jul;104(1):72-5.

Wutz A. Epigenetic regulation of stem cells: the role of chromatin in cell differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 2013;786:307-28.

Xie W, Schultz MD, Lister R, Hou Z, Rajagopal N, Ray P, Whitaker JW, Tian S, Hawkins RD, Leung D, Yang H, Wang T, Lee AY, Swanson SA, Zhang J, Zhu Y, Kim A, Nery JR, Urich MA, Kuan S, Yen CA, Klugman S, Yu P, Suknuntha K, Propson NE, Chen H, Edsall LE, Wagner U, Li Y, Ye Z, Kulkarni A, Xuan Z, Chung WY, Chi NC, Antosiewicz-Bourget JE, Slukvin I, Stewart R, Zhang MQ, Wang W, Thomson JA, Ecker JR, Ren B. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*. 2013 May;153(5):1134-48.

Zornosa X, Muller S. Calcifying cystic odontogenic tumor. *Head Neck Pathol*. 2010 Dec;4(4):292-4.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão das DNA metiltransferases 1, 3A e 3B em tumores odontogênicos benignos

Pesquisador: Fabio Daumas Nunes

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 12604413.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 205.735

Data da Relatoria: 22/02/2013

Apresentação do Projeto:

O surgimento de diversas neoplasias humanas tem sido relacionado com o silenciamento epigenético de genes, impedindo seu correto funcionamento. Neste contexto, a hipermetilação da região promotora de genes-chave tem chamado mais atenção dos pesquisadores, pela sua frequência e importância clínica. A hipermetilação de genes é realizada pelas enzimas DNA metiltransferases.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é avaliar, por meio da técnica de imuno-histoquímica, a presença das enzimas DNA metiltransferase 1, 3A e 3B em um grupo de tumores odontogênicos benignos, as saber: ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico, tumor odontogênico epitelial calcificante, tumor odontogênico adenomatoide, fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico, fibroma odontogênico e mixoma. As reações serão feitas em blocos de parafina que estão arquivados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo será realizado em blocos de parafina pertencentes a um arquivo e, portanto, não há risco nem benefícios diretos.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem embasado e os resultados podem trazer um novo conhecimento importante para a área em que se insere.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos necessários foram todos apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está aprovado.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa adequado para aprovação do CEP-FOUSP.

SAO PAULO, 26 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br