

CÁSSIO VINHADELLI RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS H3K36ME3,  
H3K9AC, H4K12AC E H3S10PH EM TUMORES  
ODONTOGÊNICOS COM DIFERENCIACÃO AMELOBLÁSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Odontologia da Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do  
Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica  
Odontológica Integrada.

UBERLÂNDIA, 2017

CÁSSIO VINHADELLI RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS H3K36ME3,  
H3K9AC, H4K12AC E H3S10PH EM TUMORES  
ODONTOGÊNICOS COM DIFERENCIACÃO AMELOBLÁSTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Odontologia da Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do  
Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica  
Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Banca examinadora

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Prof(a). Dr(a). Roberta Rezende Rosa

UBERLÂNDIA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R484a  
2017

Ribeiro, Cássio Vinhadelli, 1991

Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em tumores odontogênicos em diferenciação ameloblastica / Cássio Vinhadelli Ribeiro. - 2017.

148 f. : il.

Orientador: Adriano Mota Loyola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Tumores odontogênicos - Teses. 3. Histonas - Teses. 4. Imunohistoquímica - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

---

CDU: 616.314



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº318 – COPOD

Data: 24/02/2017

Discente: Cássio Vinhadelli Ribeiro Matrícula: 11512ODO017

Título do Trabalho: Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em tumores odontogênicos com diferenciação ameloblastica.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Patologia e Diagnóstico Bucal.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Patologia e Diagnóstico Bucal.

As nove horas do dia vinte e quatro de fevereiro ano de 2017 no Anfiteatro do Bloco 4L, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2017, assim composta: Professores Doutores: Sérgio Vitorino Cardoso (UFU); Roberta Rezende Rosa (UNITRI); e Adriano Mota Loyola (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) Cássio Vinhadelli Ribeiro.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dr. Adriano Mota Loyola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores(as), que passaram a arguir o (a) candidato (a). Após a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) Aprovado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 13 horas e 00 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso – UFU

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola – UFU  
Orientador (a)

Prof. Dr. Roberta Rezende Rosa - UNITRI

## **Dedicatória**

Todo esse trabalho de mestrado eu dedico a minha família, mas dedico especialmente aquela menina que desde pequena sonhou ser professora, aquela que voltava da escola sonhando como seria as aulas que ela daria e que por motivos da vida teve esse sonho postergado, mas conseguiu atingi-lo. Essa menina que se tornou mulher e posteriormente mãe, uma mãe em todo o sentido da palavra, que perdeu noites de sono olhando seu filho na doença, que trocou muitas fraldas e limpou alguns vômitos, tem um amor em seu coração que não da para medir, que viu seu menino partir em busca de um futuro, sofrendo com sua ausência, saiba que ele também sofreu em silêncio. Essa mulher que sempre deu maior força a seu menino e por mais bobas que fossem suas conquitas, sempre se sentia toda orgulhosa. Enfim, aquela que tanto queria ser professora, hoje seu filho também se torna um professor... hoje ele volta para casa...

MUITO obrigado por tudo, de verdade... Amo você!!

## Agradecimentos

O meu primeiro e mais importante agradecimento de meu coração é a Deus... minha vida tomou rumo que não imaginava e Deus me conduz a cada curva dessa estrada. Agradeço a Ele, pois tudo que fiz até esse momento, se não fosse por Sua força não teria acontecido.

Agradeço em segundo lugar a minha mãe Gleucione, pai Luiz Assis e irmã Maria Leíza, os quais me ajudaram de forma ininterrupta ao longo dessa caminhada, sempre com MUITO carinho e amor. Agradeço por compreenderem os meus momentos de ausência e falta de paciência. Obrigado a Edielly, minha namorada, que me deu muita força, em especial ao longo do primeiro ano.

Agradeço aos colegas da pós-graduação Caio, Marcos, Lucas que de certa forma sempre se fizeram presentes. Agradeço ainda aqueles amigos de mestrado Roberta que tantos domingos me ajudou em meus experimentos, Vinicius que se tornou um grande parceiro e que sempre se colocou a disposição para me auxiliar. Aline, ahh Aline, MUITO obrigado por tudo, sem você, com certeza a estrada teria sido bem mais difícil. Agradeço ainda ao João Paulo, que NUNCA negou ajuda em qualquer momento. Sem vocês, com certeza tudo seria mais difícil.

Não há como deixar de agradecer a Ângela que sempre se dispôs a ajudar, cortando os casos necessários. Lúbia, muito obrigado pelos conselhos e ajuda a cada momento. Adalci, sempre com paciência, e disposição ao auxílio. Novamente, sem vocês, tudo teria sido bem mais difícil.

Agradeço aos amigos da graduação que sempre se dispuseram a ajudar, obrigado Maria Cecília, Ludiel, Anaíra, dentre muitos outros...

Por último e não menos importante, agradeço de coração aos professores Sérgio Vitorino, Paulo Rogério, João César e Gabriela, os quais sempre se dispuseram a ajudar de alguma forma. Muito obrigado a todos!

Agradeço ainda, para aquele que sempre fui um admirador e hoje tenho o prazer de podê-lo chama-lo de amigo, professor Adriano, obrigado! Um grande e forte abraço!

“Se Deus é por nós, quem s erá contra nós...” (Rm 8:31)

“Assim é, se lhe parece” (Pirandello)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	10
<b>RESUMO</b>	13
<b>ABSTRACT</b>	15
<b>1.0 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO</b>	17
<b>1.1 TUMORES ODONTOGÊNICOS</b>	22
<b>1.1.1 AMELOBLASTOMA</b>	22
<b>1.1.2 TUMOR ODONTOGÊNICO ADENOMATÓIDE</b>	28
<b>1.1.3 TUMOR ODONTOGÊNICO CÍSTICO CALCIFICANTE</b>	31
<b>1.1.4 TUMOR ODONTOGÊNICO EPITELIAL CALCIFICANTE</b>	33
<b>1.1.5 AMELOBLASTOMA ADENÓIDE</b>	35
<b>1.2 CARCINOMAS ODONTOGÊNICOS</b>	36
<b>1.2.1 CARCINOMA AMELOBLÁSTICO</b>	37
<b>1.2.2 CARCINOMA ODONTOGÊNICO DE CÉLULAS CLARAS</b>	39
<b>1.2.3 CARCINOMA ODONTOGÊNICO DE CÉLULAS FANTASMAS</b>	42
<b>1.3 EPIGENÉTICA</b>	44
<b>1.3.1 HISTONAS</b>	46
<b>1.3.1.1 H3K36me3</b>	48
<b>1.3.1.2 H3K9ac &amp; H4K12ac</b>	50
<b>1.3.1.3 H3S10ph</b>	54
<b>PROPOSIÇÃO</b>	57

<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b> -----	<b>58</b>
<b>2.1 HIPÓTESES</b> -----	<b>59</b>
<b>2.2 OBJETIVOS</b> -----	<b>59</b>
<b>2.3 OBJETIVO GERAL</b> -----	<b>59</b>
<b>2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> -----	<b>59</b>
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	<b>61</b>
<b>3.1 CASUÍSTICA</b> -----	<b>62</b>
<b>3.2 ENSAIOS IMUNO HISTOQUIMICOS</b> -----	<b>63</b>
<b>3.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE IMUNO HISTOQUIMICA</b> -----	<b>65</b>
<b>3.4 CALIBRAÇÃO DO IMAGEJ</b> -----	<b>65</b>
<b>3.5 ÍNDICE DE ABSORBÂNCIA (IOD)</b> -----	<b>67</b>
<b>3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> -----	<b>68</b>
<b>4.0 RESULTADOS</b> -----	<b>69</b>
<b>5.0 DISCUSSÃO</b> -----	<b>90</b>
<b>6.0 CONCLUSÃO</b> -----	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> -----	<b>104</b>
<b>ANEXO 1</b> -----	<b>140</b>
<b>ANEXO 2</b> -----	<b>148</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
AAD	Ameloblastoma Adenóide
AME	Ameloblastoma
AMPc	Do inglês, cyclic adenosine monophosphate, traduzido para o português como Monofosfato Cíclico de Adenosina
ARK2	Do inglês, $\beta$ -adrenenergic receptor quinase B, traduzido para o português como quinase do receptor $\beta$ adrenérgico (Aurora kinase B)
BRAF	proto-oncogene B-Raf
BSA	Do inglês, Bovine seric albumin, traduzida para o português como Albubina Sérica Bovina
CAME	Carcinoma Ameloblastico
CEC	Carcinoma de células escamosas
COC	Cisto Odontogênico Calcificante
COCC	Carcinoma Odontogênico de Células Claras
DNA	Do inglês, deoxyribonucleic acid, traduzido para o português como ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	gene <i>Enhancer of zeste 2</i>
FOA	Fibro Odontoma Ameloblastico
G <sub>2</sub>	Do inglês gap, referindo-se a fase da interfase no processo mitótico
GCCG	Granuloma Central de Células Gigantes
COCF	Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas
H1	histona H1
H2A	histona H2A
H2B	histona H2B
H3	histona H3
H4	histona H4
H3K36	Resíduo de lisina 36 da histona H3
H3K36me3	trimetilação da lisina 36 da histona H3

H3K9ac	acetilação da lisina 9 da histona H3
H3S10ph	fosforilação da serina 10 da histona H3
H4K12ac	acetilação da lisina 12 da histona H4
HAT	Do inglês histone acetyltransferase, traduzido para o português como acetil-transferase de histonas
HCl	ácido clorídrico
HDAC	desacetilase de histona (histone deacetylase)
HRAS	Gene responsável por regular a divisão celular
Ki-67	Proteína codificada pelo gene <i>MKI67</i> , é um marcador de proliferação celular
MAPK	Do inglês (Mitogen Activated Protein Kinases)
MSK2	Do inglês mitogen- and stress-activated protein kinase 2, traduzido para o português como proteína kinase 2 ativada pelo estresse e mitógenos
nm	Nanômetro
NSD1	Do inglês Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1, Proteína correguladora transcricional associada a síndrome de Soto e síndrome de Weaver
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	nível de significância
p16	Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 2 A
p53	Proteína p53, codificada pelo gene <i>P53</i>
<i>P53</i>	Gene <i>P53</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Do inglês proliferative nuclear cell antigen
PC4	Do inglês, positive cofactor 4, proteína reguladora de transcrição gênica potencial hidrogeniônico
pH	
Pim1	Do inglês, Serine/threonine-protein kinase pim-1, traduzida para o português como pim-1 kinase de resíduos de serina/treonina
pMSK1	Proteína quinase relacionada a fosforilação de histonas
Psip1	Coativador Transcricional
<i>RET-PTC</i>	Proto-oncogene

RNAPII	RNA Polimerase II
SF2	Proteína rica em serina e arginina
SHH	uma de três proteínas da família de sinalizadores chamada hedgehog
SMO	Do inglês Smoothened proteín
SMYD2	Do inglês SET And MYND Domain Containing 2 N-Lisina Metiltransferase
SETMAR	N-Lisina Metiltransferase de histonas
TNF	Do inglês Tumor necrosis factor
TOA	Tumor Odontogênico Adenomatóide
TOCC	Tumor Odontogênico Cístico Calcificante
TOEC	Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante
TO	Tumores Odontogênicos
TOQ	Tumor Odontogênico Queratocístico
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano (hydroxymethylaminomethane)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WNT	Via de sinalização responsável pela formação de tecidos

## **RESUMO**

---

## RESUMO

Tumores odontogênicos constituem um grupo heterogêneo de lesões com comportamento biológico variado. Modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese estando entre as anormalidades mais comuns nas neoplasias humanas. Dentre essas estão as modificações de histonas, as quais têm relação íntima com a regulação do ciclo celular, mantendo relação direta com o processo de tumorigênese. O objetivo do presente estudo foi investigar a expressão de antígenos relacionados às modificações histonas em amostras de tumores odontogênicos com diferenciação ameloblástica, benignos e malignos, através da técnica de imunoistoquímica. Para tanto, foram avaliados 8 de Ameloblastoma, 4 de Tumor Odontogênico Adenomatóide, 6 de Tumor Odontogênico Cístico Calcificante e 5 de Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, 4 casos de Ameloblastoma Adenóide, 12 de Carcinoma Ameloblástico, 6 de Carcinoma Odontogênico de Células Claras e 3 de Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Após revisão histopatológica foram realizadas as reações imunoistoquímicas com os anticorpos contra H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph. Foram avaliadas reatividade imunoistoquímica de cada anticorpo (IOD) além da área de marcação imunoistoquímica, para todos os diferentes tipos de tumor lesões e entre os grupos Benignos x Malignos, estes parâmetros foram avaliados com o software ImageJ. Houve diferença estatística da reatividade e área de marcação imunoistoquímica para H3K36me3, H3K9ac e H4K12ac entre os grupos benignos e malignos. Diferença estatística também foi encontrada em avaliação da reatividade imunoistoquímica entre as lesões para H4K12ac. Quanto à área de marcação, houve significância estatística entre as lesões para H3K36me3 e H4K12ac. Conclui-se que variação as modificações de histonas avaliadas estão relacionadas ao evento da carcinogênese.

**Palavras chave:** Histonas, tumores odontogênicos, epigenética

## **ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

Odontogenic tumors are a heterogeneous group of lesions with varied biological behavior. Epigenetic modifications have earned attention in the study of carcinogenesis as being among the most common abnormalities in human neoplasms. Histone modifications are epigenetic modifications intimately related to the relation with the regulation of the cell cycle and direct relationship with the process of tumorigenesis. The aim of the present study was to investigate the expression of antigens related to histone modifications in samples of benign and malignant odontogenic tumors with ameloblastic differentiation using immunohistochemical assay. To this end, the cases assessed included 8 ameloblastomas, 4 adenomatoid odontogenic tumors, 6 calcifying cystic odontogenic tumors, 5 calcifying epithelial odontogenic tumors, 4 adenoid ameloblastomas, 12 ameloblastic carcinomas, 6 clear cell odontogenic carcinomas and 3 ghost cell odontogenic carcinoma. After histopathological review of the cases, immunohistochemical reactions were performed with antibodies anti-histones H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac and H3S10ph. Immunoreactivity and staining area were assessed for each antibody in all tumors and between benign and malignant groups. These parameters were evaluated with the software ImageJ. Immunoreactivity and staining area were statistically different for H3K36me3, H3K9ac and H4K12ac between benign and malignant groups. Statistical difference was also found in the immunoreactivity assessment for H4K12ac among the tumors. With respect to the staining area, there was statistical significance for H3K36me3 and H4K12ac among the tumors. It could be concluded that the variation of histone modifications is related to carcinogenesis.

**Keywords:** Odontogenic tumors, histones, epigenetics

## **INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO**

---

## 1.0 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Os tumores de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, seios paranasais, complexos orofaríngeos, glândulas salivares e glândula tireoide. O sítio mais frequentemente atingido é a cavidade oral, correspondendo a cerca de 30% dessas (Cotran et al, 2000; Henriques et al, 2009).

Dentre esses tumores de cabeça e pescoço, destaque deve ser dado aos chamados, tumores odontogênicos (TO), que constituem um grupo heterogêneo de lesões, derivadas dos elementos epiteliais, ecto-mesenquimais e/ou mesenquimais do aparelho de formação embrionária dos dentes. Incluem lesões hamartomatosas, neoplasias benignas com comportamento biológico variado, e tumores malignos com alto potencial metastático. Estas lesões são incomuns, algumas são extremamente raras, e representam desafios significativos quanto ao entendimento de sua patogenia, formulação do diagnóstico e tratamento (Slootweg et al, 2009; Servato et al, 2013).

Esses tumores são encontrados no interior do esqueleto maxilo-facial (intraósseo ou centralmente localizados), ou nos tecidos moles do periodonto (extraósseos ou perifericamente localizados), podendo ser diagnosticados em qualquer estágio na vida de um indivíduo. Estes tumores têm sido agrupados em várias classificações, sendo a mais recente chancelada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005. Embora relativamente nova, tal classificação já se encontra desatualizada em relação ao conhecimento atual, em especial aqueles obtidos pelas técnicas de biologia molecular (Slootweg et al, 2009; Servato et al, 2013).

Dentre todos os 28 subtipos de TO conhecidos, o ameloblastoma é o segundo mais incidente, e é considerado clinicamente uma das neoplasias odontogênicas benignas mais importantes por apresentar alto potencial de crescimento, destruição, invasão e recidiva. Apesar de sua relativa raridade, o ameloblastoma continua a ser um tumor que desperta grande interesse para a área, muito em função de seu comportamento biológico imprevisível, etiopatogenia indefinida, e a possibilidade de progressão para o fenótipo maligno (Gardner et al, 2005; Slootweg et al, 2009; Servato et al, 2013).

Mesmo após mais de cem anos desde sua caracterização, subtipos histológicos raros de AME continuam a ser mapeados e discutidos pela literatura

internacional. Como exemplo, ressalta-se o AME de células claras, hoje amplamente reconhecido como Carcinoma Odontogênico de Células Claras (CCOC), o ameloblastoma adenoide (AAD), o Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas (COCF), além da contraparte maligna do AME, a qual é conhecida como carcinoma ameloblástico (CAME) (Loyola et al, 2014; Kar et al, 2014).

O COCC e o CAME são caracterizadas pelo seu potencial maligno, apresentando altas taxas de metastatização. Há ainda aquelas lesões caracterizadas por combinar padrões histológicos mistos que variam entre um AME benigno e um Tumor Odontogênico Adenomatoide (TOA), a qual se trata do Ameloblastoma Adenóide (Waldron et al, 1985; Hansen et al, 1985; Bang et al, 1989; Brannon, 1994; Evans et al, 2004; Bang & Koppang, 2005; Sciubba et al, 2005; Ghasemi-Moridani & Yazdi, 2008; Saxena et al, 2012; Yancoskie et al, 2014; Loyola et al, 2014; Kar et al, 2014).

Vale destacar ainda outros tumores odontogênicos benignos, que apresentam diferenciação ameloblástica. Podemos citar o Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC) também conhecido como *tumor de Pindborg*, Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC) além do Tumor Odontogênico Adenomatóide (TOA).

Esses tumores (TOA, TOEC e TOCC) são lesões raras, que representam cerca de 1-3% de todos dos tumores odontogênicos (Dayi et al, 1997). São tumores que podem se apresentar intra ou extra- ósseos, sendo que geralmente surgem como massa assintomática de crescimento lento que irão levar à uma expansão da região apresentando caráter invasivo local. Todos esses tumores (TOA e TOCC) são tratadas pela simples enucleação, apresentando baixas taxas de recorrência. O TOEC, por vezes pode necessitar de uma abordagem um tanto mais agressiva (maxilectomia/mandibulectomia), tendo em vista suas maiores taxas de recorrência (Philipsen & Reichart, 2000; Motamed et al, 2005; Slootweg, 2006; Li et al, 2013; Sahni et al, 2012; Kamal et al, 2014).

Nesse sentido, a literatura é permeada de trabalhos que discutem a necessidade de encontrar marcadores que auxiliem na definição tanto do diagnóstico, quanto na delimitação precisa dos fenótipos benignos e malignos (Gomes et al, 2010).

A epigenética é definida como o estudo de das alterações hereditárias na expressão do gene e na organização da cromatina que são independentes da sequência de DNA e que podem ser propagadas através de divisões celulares (Bird, 2007; Dawson et al, 2012; Taby & Issa, 2010).

Têm como função regular a expressão de genes e suas propriedades, além de também controlar o comportamento celular. Dessa forma, está diretamente relacionada com o processo de desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação celular, envelhecimento e demais processos fisiológicos (Chakravarthi et al, 2016).

Essas alterações representam um dos campos de maior amplitude, quando nos referimos aos estudos relacionados à doença câncer, tendo em vista que estão diretamente relacionadas com mecanismos fundamentais do desenvolvimento da doença. A desregulação epigenética pode afetar vários aspectos da biologia das células tumorais, incluindo o crescimento, diferenciação e morte celular, sendo dessa forma possível ligar esta desregulação ao prognóstico de várias lesões (Chakravarthi et al, 2016; Jones & Baylin, 2002).

Existem três classes distintas de alterações epigenéticas: a metilação do DNA, modificações de histonas e o silenciamento de genes mediados por RNA não codificantes, de diferentes tipos (Chakravarthi et al, 2016).

Nesse trabalho foram avaliadas as modificações ligadas as chamadas proteínas histonas, que constituem a principal porção proteica da cromatina (Youngson, 2006), sendo importantes no processo de compactação do DNA (Wolfe, 1998). Essas proteínas possuem caudas N e C-terminais, as quais podem sofrer modificações ditas pós-traducionais (acetilação, metilação, fosforilação, sumoilação, ribosilação e ubiquitinação), regulando de forma direta a estrutura da cromatina (Guo et al, 2014).

Dentre essas modificações, os processos de metilação, acetilação e fosforilação, têm sido mais amplamente estudados, devido a íntima relação que alterações nesses processos mantêm com o processo de carcinogênese (Kumamoto et al, 2001).

A acetilação nos resíduos de lisina 9 e 12 das histonas H3 e H4 respectivamente (H3K9ac e H4K12ac), altera a estrutura da cromatina, facilitando o processo de transcrição, além de atuar no processo de reparo do DNA, silenciamento gênico e progressão do ciclo celular (Choi et al, 2009). A trimetilação da lisina 36 que ocorre na histona H3 (H3K36me3) tem sido associada a ativação da cromatina, repressão da transcrição, splicing alternativo, replicação e reparo do DNA, metilação do DNA além da transmissão de memória genética de pais para filhos durante o desenvolvimento (Wagner & Carpenter, 2012) A fosforilação da serina 10 da histona H3 (H3S10ph) está implicada na condensação e segregação cromossômica, coesão de cromatídeos, assim como também na regulação da expressão genética durante a interfase, supressão de interações entre proteínas de ligação e as caudas de histonas (Kim et al, 2015). Alteração ou mal funcionamento de qualquer uma dessas funções implica em favorecimento ao processo de carcinogênese (Kumamoto et al, 2001).

Há relatos de que essas alterações estejam relacionadas a diversos tipos de cânceres, tais como, a metilação e acetilação com carcinomas de ovário, Adenocarcinoma esofágico, Adenocarcinoma da Bexiga e Carcinoma gástrico, Câncer de pulmão, linfoma de Burkitt, meduloblastoma, Adenocarcinoma pancreático, Melanoma, ou até mesmo a metilação e a fosforilação com carcinoma de células escamosas de boca, dentre outros (Chakravarthi et al, 2016 Chen et al, 2013). O reconhecimento dessas alterações está facilitando a melhor compreensão do processo de carcinogênese, diagnóstico e terapêutica dessas lesões (Chakravarthi et al, 2016)

Entretanto, ao abordar neoplasias odontogênicas, observa-se que o desconhecimento dessas alterações ainda impera. Dessa forma, o reconhecimento das alterações nesses tumores se faz necessária para melhor compreensão do processo de carcinogênese, na identificação de características para o diagnóstico precoce e definição de casos agressivos e de melhores terapêuticas aos pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão de抗ígenos relacionados a acetilação (H3K9ac; H4K12ac), metilação (H3K36me3) e fosforilação (H3S10ph) de histonas, em amostras de tumores odontogênicos benignos (AAD, AME, TOA, TOCC e TOEC) e malignos

(CAME, COCC e COCF), comparando a reatividade imunoistoquímica entre as lesões.

## **1.1 Tumores Odontogênicos**

Os tumores odontogênicos são lesões neoplásicas raras de difícil diagnóstico e terapêutica desafiadora, que compreendem 2,5% de todas as lesões biopsiadas nos consultórios odontológicos (Mosqueda-Taylor et al, 1997). São neoplasmas derivados dos tecidos epiteliais ou ectomesenquimais, que dão origem aos elementos dentais (Henriques et al, 2009) e constituem um grupo heterogêneo de lesões com características histopatológicas e manifestações clínicas diversas. O comportamento biológico destas lesões inclui proliferações hamartomatosas, tumores benignos não-agressivos, agressivos e tumores malignos (Henriques et al, 2009).

Com base na combinação de elementos histológicos que compõem essas lesões, os tumores odontogênicos benignos são classificados em 3 categorias: (1) tumores epiteliais odontogênicos sem ectomesenquima odontogênico; (2) tumores epiteliais odontogênicos com ectomesenquima odontogênico; e (3) tumores ectomesenquimais odontogênicos com ou sem epitélio (Barnes et al, 2005).

Os tumores odontogênicos benignos primários dos maxilares podem surgir a partir de remanescentes epiteliais odontogênicos dentro do segmento alveolar, assim como os tumores odontogênicos malignos, os quais também podem surgir a partir da transformação ou degeneração de lesões benignas (Goldenberg et al, 2004).

### **1.1.1 Ameloblastoma (AME)**

Dentre os tumores de origem odontogênica, o segundo mais incidente, ficando atrás somente do odontoma é o ameloblastoma, o qual representa 30% de todos os tumores odontogênicos diagnosticados (Jones & Franklin 2006; Jordan et al, 2009).

Ameloblastoma é um tumor odontogênico raro que foi descrito em 1827 por Cusack, sendo batizado apenas em 1885 pelo médico francês Louis-Charles Malassez, pelo nome de Adamantioma (Malassez, 1885). Apenas em 1930, Ivey

e Churchill cunharam o termo Ameloblastoma para se referir a lesão (Bhandarwar et al, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) o define como uma neoplasia polimórfica localmente invasiva, que muitas vezes tem um padrão folicular ou plexiforme em um estroma fibroso (Takata, 2005).

É caracterizado um comportamento benigno, mas localmente invasivo com uma alta taxa de recorrência. A lesão parece surgir a partir de remanescentes da lâmina dental que podem ser encontrados na gengiva, osso alveolar, ápices dos dentes, e paredes foliculares de dentes inclusos (Gardner, 2005; Figueiredo, 2015).

Observa-se que o ameloblastoma, acomete principalmente a região posterior do osso mandibular (quatro vezes mais que a maxila). Esta neoplasia geralmente não causa dor e cresce lentamente, fazendo com que ocorra a expansão do osso. Tumores em estágios iniciais são assintomáticos. Mais comumente, os tumores em estágios mais avançados irão levar a expansão volumétrica, dor e por vezes parestesia (Milman et al, 2016).

Macroscopicamente a lesão pode se apresentar como um tumor cavernoso, aveludado com um fino revestimento. Por vezes observa-se inclusive ausência de cápsula tumoral. O tumor é preenchido por uma massa bancal-acinzentada ou substância gelatinosa. Reabsorção e deslocamento dentário também é um fato comumente encontrado. Reabsorção óssea em níveis variados também pode ocorrer, podendo inclusive levar a perfuração da cortical. Quando presente em maxila, sua expansão pode ocasionar obliteração do seio maxilar (Gardner, 2005; Masthan et al, 2015; Milman et al, 2016).

Gardner et al, 2005 categorizou os ameloblastomas em quatro tipos, baseando-se no padrão de comportamento, localização anatômica, características histológicas e aparência radiográfica da lesão. Dessa forma, foram criadas 4 categorias: sólido (multicística) (86% das lesões), unicístico (13% das lesões), desmoplásico e variedades periféricas (1% das lesões). As três primeiras são intraósseas / centrais, enquanto a variante periférica é extraóssea (Waldron et al, 2002; Sapp et al, 2004; Gardner et al, 2005).

Há ainda a existência de uma classificação que se baseia exclusivamente nas características histológicas da lesão. Quanto a essa classificação, observa-se a existência de seis diferentes variantes, as quais são: celular granular, de células basais, plexiforme, folicular e acantomatosa (Gardner et al, 2005; Loyola et al, 2015). É importante ressaltar que um terço dos tipos histológicos da lesão são de variedade plexiforme; e que diferentes tipos histológicos podem coexistir na mesma lesão (Gardner et al, 2005).

O ameloblastoma periférico ou extraósseo é uma lesão rara, que ocorre na gengiva (Masthan et al, 2015; Milman et al, 2016). Estas lesões parecem surgir a partir de qualquer remanescente da lámina dental dentro da gengiva ou do epitélio de superfície (Gardner, 1977; Shetty, 2005). É considerado um tumor benigno e não apresenta imagem radiográfica, uma vez que não leva a comprometimento ósseo. A falta de penetração óssea do tumor pode ser devido a uma barreira criada pelo tecido fibroso da gengiva e periósteo (Gardner, 1996). Poucos casos têm mostrado algum envolvimento ósseo, quando isso ocorre, é referido como um processo de escavação ou saucerização.

Quando visto ao microscópio (Quadro 1), observa-se crescimento ameloblastico sob uma camada de epitélio escamoso sobrejacente. As transições de crescimento ameloblastico para ilhas tumorais, consistem de uma massa central de células semelhantes ao retículo-estrelado, ligadas de forma bastante frouxa (Pekiner et al, 2007).

AME periférico é menos invasivo que suas contrapartes intraósseas. A excisão cirúrgica com margem de segurança é o tratamento de escolha para a lesão. Ao contrário dos ameloblastomas intraósseos, a recorrência após excisão cirúrgica não é comum (Ficara 1987).

O ameloblastoma desmoplásico (AD) foi inicialmente relatado por Eversole e colaboradores, no ano de 1984, como um “Ameloblastoma com Desmoplasia pronunciada” (Eversole, et al, 1984).

É um tumor benigno, localmente invasivo (Waldron et al, 1987; Philipsen et al, 2001), que surge em regiões anteriores, principalmente de maxila, por volta da 3-5 décadas de vida, e que não apresenta predileção por sexo (Philipsen et al, 2001; Desai et al, 2006). Exames de imagem retratam áreas de radiopacidade

refletindo o aspecto osteolítico da lesão (Masthan et al, 2015). Isso ocorre em contraste as demais formas de imagem dos outros tipos de ameloblastoma (Philipsen et al, 2001). Abordagen cirúrgica com margens de segurança é a forma de escolha para tratamento da lesão (Lamichhane et al, 2016).

O ameloblastoma multicístico é o subtipo mais comum do tumor, sendo responsável por 10% de todos os tumores odontogênicos mandibulares (Milman et al, 2016). A maioria dos casos de AME multicístico/sólido são diagnosticados em indivíduos com idade variando entre 30 e 60 anos, sendo de baixa prevalência abaixo dos 20 anos de idade (Fregnani et al, 2010).

80% dos casos ocorrem na mandíbula, com uma grande predileção pela região posterior do osso. Em países Africanos, observa-se uma maior incidência na região anterior da mandíbula, em região de sínfise (Chidzonga, 1996). Lesões pequenas são assintomáticas. Já grandes lesões podem levar a tumefação facial, alteração da oclusão, dor, parestesia, mobilidade dentária, perda de dentes, obstrução nasal e doença periodontal (Milman et al, 2016). Sangramento por vezes também pode ser observado (Abayom et al, 1993). A expansão óssea tanto vestibular, quanto lingual é mais comum no AME sólido/múlticístico que em outros tumores odontogênicos (Hertog et al, 2010). Ao exame de imagem observa-se uma radiolucência uni ou multilocular, sendo descrita como aspecto de “bolhas de sabão”, por vezes relacionado a um dente incluso (Wood et al, 2007).

Histologicamente (Quadro 1), ameloblastoma multicística/sólido se apresenta com padrão folicular ou plexiforme. De forma geral a lesão é caracterizada pela ocorrência de ilhas, cordões e configurações irregulares de epitélio tumoral, que consiste de uma massa central de células que se assemelham ao retículo estrelado rodeado por uma camada de células cubóides ou colunares, semelhante à pré-ameloblastos (Gardner et al, 2005).

Essa variante tende a infiltrar-se nas trabéculas do osso esponjoso, dessa forma, apesar de curetagem precisas, a incidência de taxas de recorrência é de até 90%, sendo assim, a ressecção em bloco com posterior reconstrução utilizando enxertos de ilíaco e fíbula estabilizadas por meio de placas de titâneo

é a forma de escolha para tratamento dessa variante (Chapelle et al, 2004; Masthan et al, 2015; Milman et al, 2016).

AME unicístico foi pela primeira vez descrito por Robinson e Martinez (Robinson et al, 1977). É caracterizado pela proliferação de epitélio ameloblastomatoso que pode ser confinado ao revestimento da cavidade cística, ou pode apresentar um crescimento ou proliferação intraluminal mural (Reichart et al, 2004).

Ameloblastomas unicísticos podem ser originários de epitélio reduzido do esmalte; ou como resultado da transformação de cisto dentígero em ameloblastoma unicístico (15-25 % dos casos); ou até mesmo como resultado de degeneração cística do ameloblastoma sólido / multicístico (Marx et al, 2003; Bajpai et al, 2013).

A literatura sugere que o ameloblastoma unicístico deva ser tratado de forma conservadora em comparação ao ameloblastomas sólidos/multicístico uma vez que eles exibem um comportamento biológico menos agressivo. No entanto, contrariamente a esta crença, de acordo com Gupta et al, 2011, Gardner em seu capítulo que trata sobre ameloblastomas no “Blue Book”, da OMS, sugeriu que as três variantes histológicas de exibição do ameloblastoma unicístico possuem um comportamento biológico diferente. O tipo mural apresenta comportamento mais agressivo, em comparação com as variantes luminais e intraluminais (Gupta et al, 2011). Assim, a possibilidade de prever a recorrência de um ameloblastoma antes da cirurgia iria permitir o ajustamento do plano de tratamento para cada caso (Bueno et al, 2007).

Quanto as características clínicas da lesão, observa-se que o AME unicístico é em cerca de 80% dos casos associado a um dente não erupcionado, em especial o terceiro molar. Acomete predominantemente indivíduos em idade pediátrica ou adolescência. Pode por vezes levar a expansão óssea. Radiograficamente, se assemelha bastante a imagem de um cisto, havendo a necessidade de diagnóstico diferencial para a lesão, em especial o cisto dentígero (Ackermann et al, 1988; Philipsen et al, 1998; Milman et al, 2016).

O diagnóstico diferencial, clínico-radiográfico para o AME, deve ser considerado para algumas lesões, dentre as quais podemos citar o tumor odontogênico epitelial odontogênico (TOEC), Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQ), Cisto Dentígero, granuloma central de células gigantes (GCCG) e mixoma odontogênico. Para tal, devem ser consideradas algumas características como idade, local, multilocularidade da lesão, e dentes impactados (White et al, 2004).

É importante ressaltar que estudos têm tentado definir marcadores de diagnóstico para o tumor, tais como marcadores de adesão e migração celular, por exemplo CD 118, caderinas (Brieher et al, 2013; Nagi et al, 2016), marcadores moleculares envolvidos no processo de proliferação celular, tais como p16, Ciclina D1, marcador de proliferação celular nuclear (PCNA) e Ki-67, marcadores de apoptose Fator de necrose tumoral (TNF) e supressores de tumor (p53, por exemplo) (Kumamoto et al, 2004; Naigi et al, 2016), além do estudo das vias de sinalização WNT e Sonic Hedgehog (SHH) (Kumamoto et al, 2004; Kumamoto et al, 2005; Naigi et al, 2016).

Em 2014, trabalhos identificaram mutações recorrentes de Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e (Smoothened) SMO no tumor (Brown et al, 2014; Sweeney et al, 2014). Essas mutações estão presentes em numerosas neoplasias, inclusive em tumores odontogênicos, tais como o CAME, odontoameloblastoma, COCC, TOA, TOQ, TOCC, TOEC, fibroma dentogênico e mixoma odontogênico, fato que nos faz acreditar que tumores ameloblásticos são um grupo distinto de tumores odontogênicos com anormalidades genéticas características (Brown et al, 2014; Brown et al, 2015).

**Quadro 1.** Aspectos histológicos das variantes do Ameloblastoma, OMS, 2005

Ameloblastoma			
Sólido/Múlticístico	Extraósseo/Periférico	Desmoplásico	Unicístico
<p><b>Padrão folicular:</b> Ilhas de epitélio odontogênico dentro de um estroma fibroso. As células basais destas ilhas são colunares, hiperchromáticas, e organizadas em paliçada. Normalmente seus núcleos são deslocados para longe a partir da membrana, e seu citoplasma é geralmente vacuolizado. As células centrais podem ser livremente dispostas, assemelhando-se ao retículo estrelado. Células fantasmas podem ser observadas.</p> <p><b>Padrão plexiforme:</b> Células basais dispostas em cordões anastomosados com um retículo estrelado discreto. O estroma é geralmente delicado, frequentemente com áreas apresentando degeneração cística. Para ambos os padrões histológicos, atividade mitótica e pleomorfismo celular raramente são notados.</p>	<p>Epitélio odontogênico com os mesmos tipos e padrões de células que podem ser encontrados em um AME sólido/múlticístico. Células escamosas nas áreas acantomatosas da lesão podem mostrar a formação de células fantasmas. Presença de células claras podem ocorrer, embora seja um achado raro.</p>	<p>Estroma dominante, comprimindo os componentes epiteliais odontogênicos. Ilhas epiteliais do tumor são muito irregulares e bizarras em forma de pontas, e aparência estrelada.</p> <p>Microcistos podem ocorrer de forma centralizada. Alterações mixoides do estroma são encontradas.</p>	<p><b>Padrão luminal:</b> Lesão cística revestida por epitélio ameloblastomatoso. Extensões intraluminais podem ocorrer. Não há qualquer infiltração do tumor na parede fibrosa.</p> <p><b>Padrão Mural:</b> Parede do cisto é infiltrada pelo epitélio ameloblastomatoso, podendo apresentar padrão folicular ou plexiforme. Por vezes, ambas as variantes podem ocorrer na mesma lesão.</p>

### 1.1.2 Tumor Odontogênico Adenomatóide (TOA)

O tumor odontogênico adenomatóide (TOA) é uma lesão benigna hamartomatosa não-invasiva, a qual foi primeiramente descrita por Steensland em 1905 (Jing et al, 2007), sendo descrito como pseudoadenameloblastoma por Dreiblatt em 1907 (Koma et al, 2011).

A distinção entre o TOA e outros tumores odontogênicos, em particular do ameloblastoma, foi problemática por décadas, como pode ser verificado pelo número de termos utilizados previamente ao atual (Unal et al, 1995; Gomez et al, 2013).

Unal et al, 1995, produziu um pequeno histórico sobre a nomenclatura da lesão, onde afirma que Stafne em 1948 considerava o TOA como uma entidade distinta, enquanto outros acreditavam ser uma variante do ameloblastoma (Rick 2004; Rashmi et al, 2009). Em 1969, Philipsen e Birn recusaram este pensamento e sugeriram o nome de "tumor odontogênico adenomatóide". Em 1971, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou o termo criado pelos pesquisadores. Max e Stern, em 2003, cunharam o termo "cisto odontogênico adenomatóide" (Rick, 2004). Vários termos como adenoameloblastoma, tumor adenomatoide ameloblastico, adamantinoma, e odontoma teratomatosos foram usadas antes de TOA (Rick, 2004).

Atualmente, o TOA é definido pela OMS como sendo uma lesão benigna composta por um epitélio odontogênico em uma variedade de padrões arquiteturais, incorporado em um estroma de tecido conjuntivo maduro e caracterizado por um crescimento lento, mas progressivo (Philipsen, 2005).

Observa-se que a lesão possui uma etiopatogenia ainda incerta e controversa, sendo considerada como uma consequência do desenvolvimento ou um hamartoma enquanto outros consideram-na como um grande crescimento neoplásico do epitélio odontogênico (Pindborg, 1971; Kramer, 1992; Dayi et al, 1997; Philipsen et al, 1998; Philipsen, 2005).

O TOA é responsável por 2-7% de todos os tumores odontogênicos (Philipsen, 2005), possuindo três variantes, conhecidas como folicular, extra-folicular e periférica. Todas essas variantes mostram comportamento biológico benigno e quase todas são encapsuladas. A variante folicular é a mais comum, a mesma envolve um dente incluso em particular os caninos, que juntos respondem por 60% dos casos; os caninos superiores sozinhos são responsáveis por 40%, sendo muitas vezes confundida com um cisto dentígero (Philipsen et al, 1991; Rick 2004; Angiero et al, 2013). A variante periférica surge como um fibroma gengival, quase exclusivamente na gengiva maxilar anterior (Dayi et al, 1997; Handschel et al, 2005).

Estas 3 variantes da lesão são distinguíveis. O subtipo do TOA é baseado em achados clínicos e radiográficos. O padrão folicular (intraóssea) é de longe o tipo de crescimento mais frequente do tumor (Singh et al, 2012).

TOA tem sido relatado em pacientes com idades variando entre 3-82 anos, com mais de dois terços dos casos diagnosticados entre os 10-19 anos (Rick, 2004; Handschel et al, 2005). A localização anatômica e a predileção por sexo parecem depender da idade de ocorrência, uma vez que observamos uma incidência duas vezes maior em maxila antes da idade dos 30 anos e o mesmo é observado para a mandíbula após os 30 (Rick, 2004; Handschel et al, 2005).

No geral, TOA acomete cerca de duas vezes mais indivíduos do sexo feminino. No entanto, após a 4<sup>a</sup> década de vida, observa-se uma inversão dessa proporção (Philipsen et al, 1998; Handschel et al, 2005; Philipsen, 2005). Embora 95% dos casos sejam intraósseos, quando estes ocorrem de forma extraóssea, na gengiva, a razão mulher/homem salta para 14:1 (Kramer, 1992; Philipsen et al, 1998; Motamed et al, 2005; Garg et al, 2009; Deepti et al, 2009).

Devido ao crescimento lento e natureza geralmente assintomática da lesão a maioria dos pacientes tolera o crescimento por anos, até que este produza uma deformidade e desconforto significativo. Tipicamente, o tumor possui de 3-4 cm de diâmetro máximo em sua apresentação clínica (Bulut et al, 2001).

Radiograficamente, o tumor apresenta-se de forma radiolúcida unilocular com limites bem definidos, contornando a coroa de um dente inclusivo (variante folicular intraóssea), formando dessa forma, uma imagem indistinguível de um cisto folicular (Li et al, 2013). Radiopacidades em torno do dente inclusivo podem ser encontradas em TOA e são consideradas como um achado característico, embora não patognomônico da lesão (Reichart et al, 2004; Rick, 2004). Cerca de 70% das imagens radiográficas dos tumores Odontogênicos Adenomatoides possuem essa característica (Handscler et al, 2005; Reichart et al, 2008).

De fato, os achados radiográficos da lesão freqüentemente compartilham características de outras lesões odontogênicas, como o cisto dentígero, cisto odontogênico calcificante ou até mesmo de lesões tumorais, como o ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico, ou de uma doença periapical (Angiero et al, 2013).

O Tumor odontogênico adenomatóide tem características citológicas semelhantes a vários componentes do órgão do esmalte, lámina dentária, epitélio reduzido do esmalte e seus restos (Garg et al, 2009). Histopatologicamente, TOA é um tumor epitelial odontogênica puro sem indução, apresenta uma histomorfologia distinta que apresenta uma consistência notável tornando o seu diagnóstico fácil e não ambíguo (Tahsinoglu 1980; Philipsen et al., 1998).

A histologia distinta do TOA é constituída por uma proliferação epitelial nodular contendo espaços pequenos, semelhantes a ductos revestidos por células epiteliais cuboides que mostram polaridade nuclear inversa (Philipsen et al, 1991; Philipsen et al, 1998, Philipsen, 2005).

Embora o tumor tenha sido tradicionalmente classificado como uma lesão de células epiteliais, ao invés de uma origem embrionária mesenquimal, a presença de elementos de tecidos duros tem sido bem documentada. Anéis concêntricos de material calcificado, dentina displásica, material dentinóide, e osteodentina, foram relatados em quantidades variáveis (Kramer, 1992; Philipsen et al, 1998; De Matos et al, 2012).

O diagnóstico diferencial da lesão é crucial em termos de tratamento cirúrgico. A simples excisão cirúrgica com enucleação e curetagem é suficiente para uma abordagem terapêutica adequada. Recorrências são raras (Philipsen, 2005; Segundo et al, 2008; Kamal et al, 2014).

### **1.1.3 Tumor Odontogênico Cístico Calcificante (TOCC)**

O TOCC foi inicialmente descrito como uma entidade patológica cística distinta por Gorlin em 1962, como um possível análogo bucal do epiteloma calcificante de Malherbe (pilomatricoma ou pilomatrixoma), devido à presença da queratinização celular que se expressa como células fantasmas, presentes em ambas as lesões. Naquela ocasião, recebeu o nome de cisto odontogênico calcificante (COC) (Gorlin et al, 1962).

Desde então, houve na literatura uma grande controvérsia sobre a terminologia e classificação da lesão. Em 1992, a OMS classificou o COC, como

um neoplasma, entretanto, confirmou que a maioria dos casos da lesão se manifestam como lesões císticas (Kramer, 1992). Tendo em vista essa dualidade, muitas terminologias diferentes foram aplicadas a lesão (Toida, 1998).

Após vários estudos sobre a apresentação e comportamento do Cisto Odontogênico Calcificante, em 2005, em sua nova publicação acerca dos tumores de cabeça e pescoço, a OMS propôs uma classificação histológica dos tumores odontogênicos em que o COC passou então definido como um "Tumor Odontogênico Cístico Calcificante" (TOCC) (Ledesma-Montes et al, 2007).

Esta lesão é rara e representa cerca de 0,03% das lesões de biopsiadas e menos de 2% de todos os cistos e tumores odontogênicos (Swan, et al, 1985; Praetorius, 2005; Shear et al, 2007). Clinicamente apresenta-se como um crescimento lento e indolor, afetando igualmente o osso maxilar e mandibular, com uma ligeira predileção pela região anterior dos ossos gnáticos (Li et al, 2003; Fregnani et al, 2003; Chindasombatjaroen et al, 2012). As lesões extra-ósseas são bem definidas com coloração semelhante a mucosa, com um diâmetro aproximado de 4 cm (Praetorius, 2005).

Existem relatos de acometimento de indivíduos cuja faixa etária varia de 5 a 92 anos de idade (Praetorius, 2005), com uma maior incidência variando entre a segunda e sexta décadas de vida (Rushton et al, 1997; Orsini et al, 2002; Reyes et al, 2007). Não há predileção por raça ou sexo (Praetorius, 2005).

Radiograficamente, observa-se uma imagem radiolúcida unilocular (Sapp et al, 1998; Praetorius, 2005; Iida et al, 2006) sendo que, por vezes imagens multiloculares são observadas (Erasmus et al, 2002). Essas imagens mostram limites bem circunscritos, apresentando áreas radiopacas difusas. (Sapp et al, 1998). Em pacientes mais jovens as lesões podem ser confundidas com um odontoma em desenvolvimento ou com um fibroodontoma ameloblástico (Sapp et al, 1998). Em cerca de um terço dos casos, a lesão está associada a um dente impactado, na maioria das vezes um canino (Chindasombatjaroen et al, 2012).

Ao microscópio, pode-se observar uma parede da lesão revestida por uma fina camada de epitélio ameloblastomatoso com a formação de células fantasmas. Estas células fantasmas podem sofrer calcificação. Uma proliferação

de epitélio odontogênico no tecido conjuntivo adjacente e a presença de dentina displásica pode também ser observada (Praetorius, 2005; Chindasombatjaroen et al, 2012).

A abordagem terapêutica indicada para o Tumor Odontogênico Cístico Calcificante é a simples enucleação da lesão. Recorrências têm sido relatados, o que leva alguns estudiosos a advogarem uma abordagem mais agressiva da lesão (Moleri et al, 2002; Rodrigues et al, 2003). Existem casos relatados de transformação maligna, após múltiplas recorrências (Li et al, 2009). Dessa forma, um acompanhamento de longo prazo é importante.

#### **1.1.4 Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC)**

O tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC) é um tumor odontogênico benigno raro que ocorre nos ossos gnáticos. Em 1946, Thoma e Goldman o identificaram como uma neoplasia resultante do epitélio odontogênico (Thoma et al, 1946).

Mais tarde, em 1955, o patologista holandês Jens Jorgen Pindborg reconheceu-o como uma entidade distinta, quando afirma que estava diante de uma lesão oriunda do epitélio odontogênico que apresentava algumas calcificações. Em homenagem a esse estudioso, esta lesão foi então batizada como tumor de Pindborg (Reichart et al, 2004; Shekarkhan et al, 2005).

Embora se verifique que TOEC surja a partir dos componentes epiteliais do órgão do esmalte, ainda não se sabe se o estrato intermediário, os restos da lámina dentária ou o epitélio reduzido do esmalte estão envolvidos na etiologia do tumor, dessa forma, pode-se afirmar que se trata de uma lesão com etiologia ainda incerta (Praetorius, 2005; Bridle et al, 2006)

O Tumor epitelial odontogênico calcificante (TOEC) é uma lesão rara, com uma frequência de ocorrência que varia de 0,1 a 1,8% entre todos os tumores odontogênicos. (Kaplan et al, 2001; Praetorius, 2005)

É definida como uma neoplasia oriunda do epitélio odontogênico, localmente invasiva, caracterizada pela presença de material amiloide que pode tornar-se calcificado (Praetorius, 2005). O modo mais comum de apresentação é como uma massa intraóssea de crescimento lento na mandíbula entre a quarta e quinta década de vida. Não há predileção por sexo. A etiologia é desconhecida, e não há fatores predisponentes identificados.

TOEC possui uma apresentação intraóssea (central) ou extra-ósseo (periférica). (Philipsen et al, 2000). O subtipo intra-ósseo afeta mais comumente a região de pré-molares do osso mandibular, sendo maiores e mais agressivos que as lesões periféricas, podendo chegar até quatro centímetros de diâmetro (Philipsen et al, 2000; Palatino et al, 2005). Já o subtipo periférico do tumor, na maior parte dos casos, atinge menos que dois centímetros de diâmetro, e acomete principalmente a gengiva anterior da mandíbula, o que pode confundir o diagnóstico, levando o clínico a acreditar estar diante de algum tipo de epúlide (Philipsen et al, 2000; Gopalakrishnan et al, 2006).

De forma geral, trata-se de uma lesão assintomática e de crescimento lento, sem predileção por sexo que acomete principalmente o osso mandibular, numa proporção de 2:1 com a maxila, acometendo principalmente indivíduos com idade entre 30-50 anos (Praetorius, 2005; Gopalakrishnan et al, 2006; Singh et al, 2011; Whitt et al, 2012; Lin et al, 2013).

Radiograficamente o TOEC é descrito como uma lesão unilocular, que apresenta manchas radiopacas em torno da coroa de um dente incluso, podendo lembrar um cisto dentígero (Kaplan et al, 2001). No entanto, as características de imagem da lesão podem apresentar grande oscilação, variando desde uma imagem radiolúcida uniforme até uma lesão radiopaca mista, com limites mal-definidos ou margens distintas. (Philipsen et al, 2000; Venkateswarlu et al, 2012). À medida que a lesão aumenta, a mesma pode perder seu aspecto uniloculado tornando-se multilocular, devido a destruição óssea e calcificação tumoral, passando a possuir características de favo de mel (Sahni et al, 2012).

O diagnóstico diferencial de TOEC deve incluir tumor odontogênico adenomatoide (TOA), cistos odontogênicos calcificantes (COC), fibro odontoma ameloblastico (AFO) além do odontoma (Kramer, 1992).

Ao microscópio, observa-se a presença de lençóis, cordões ou ninhos de células tumorais epiteliais poliédricas exibindo pleomorfismo nuclear e citoplasma eosinofílico, sem mitoses anormais, no tecido conjuntivo fibroso maduro, além de um material acelular eosinofílico hialino homogêneo contendo amiloide, o que pode ser confirmado por coloração positiva para Vermelho Congo e calcificações distróficas dentro do material hialino, muitas vezes dispostas em anéis concêntricos (anéis Liesegang), os quais são características patognomônicas do tumor (Kramer, 1992; Philipsen et al, 2000; Mujib et al, 2012; Kaushal et al, 2012; Whitt et al, 2012).

Inúmeras modalidades de tratamento cirúrgico são sugeridas, para a abordagem terapêutica da lesão. Pequenas lesões mandibulares intraósseas com bordas bem definidas são tratadas por enucleação ou simples curetagem, seguido por remoção cuidadosa de uma fina camada de osso adjacente ao tumor (Whitt et al, 2012). Tumores grandes requerem abordagem agressiva por ressecção segmentar (Bouckaert et al, 2000; Philipsen et al, 2000; Singh et al, 2012; Pereira et al, 2013). A taxa de recorrência varia de 10-20% após o tratamento, assim um maior período de acompanhamento é importante (Goldenberg et al, 2004; Sahni et al, 2012).

### **1.1.5 Ameloblastoma Adenóide (AAD)**

No ano de 1994, Brannon descreveu uma neoplasia caracterizada pela presença de um parênquima cujos aspectos histopatológicos sobreponham aqueles do Tumor Odontogênico Adenomatóide e do AME (Brannon, 1994). Além disso, observou-se deposição de dentinóide, levando o autor a cunhar o termo Ameloblastoma Adenóide (AAD), e a considerá-la como uma variante agressiva de AME, sendo considerado uma neoplasia (Brannon, 1994; Loyola et al, 2015).

Essa lesão, está presente em uma vasta faixa etária, havendo relatos de casos, que variam desde a segunda até a oitava décadas de vida. O AAD afeta predominantemente a maxila de indivíduos do sexo masculino (Loyola et al, 2015).

Clinicamente o tumor se apresenta como um volume persistente, geralmente sem dor e / ou dormência, sendo a abordagem cirúrgica a principal forma de tratamento descrita, para os casos até então descritos (Ghasemi-Moridani et al, 2008; Loyola et al, 2015). Há relatos em que se lançou mão da radioterapia como terapêutica adjuvante, devido ao envolvimento das margens da lesão (Loyola et al, 2015).

Altas taxas de recorrência são descritas, para o tumor, cerca de 70% dos casos, possivelmente devido a prevalência da lesão em maxila, onde é mais difícil de se fazer uma ressecção com margens de segurança (Loyola et al, 2015).

Histologicamente, a lesão apresenta arranjos foliculares e / ou plexiformes de epitélio odontogênico apresentarem áreas que lembram TOA, ou seja, a presença de pseudoductos rodeados por células cilíndricas em paliçada (Saxena et al, 2012; Ghasemi-Moridani et al, 2008; Sanone et al, 2011; Kumar et al, 2013).

De modo importante, as células dos pseudoductos que limitam os arranjos foliculares e plexiformes devem satisfazer principalmente os critérios morfológicos de Vickers e de Gorlin (1970), os quais caracterizam o processo de diferenciação ameloblastomatosa (Vickers & Gorlin, 1970).

Outros achados histológicos do AAD, podem incluir calcificações parenquimatosas, aglomerados de células fantasmas, presença de células claras, perda focal de diferenciação ameloblastos-like, degeneração mucóide dentro dos pseudoductos, e material dentinoide (Ghasemi-Moridani et al, 2008; Sanone et al, 2011; Saxena et al, 2012; Kumar et al, 2013).

Quanto aos aspectos imuno-histoquímicas da lesão, os principais marcadores são: citoqueratinas, p53 e p16, MDM2, entretanto, esses marcadores, apresentam pouco valor quando utilizados para distinguir um AAD de outras lesões com diferenciação ameloblastica (Kumamoto et al, 2001; Sharifi-Sistani et al, 2011; Pal et al, 2013; Loyola et al, 2015), fazendo-se necessária a investigação de novos marcadores que caminhem nesse sentido.

## 1.2 Carcinomas Odontogênicos

### 1.2.1 Carcinoma Ameloblástico (CAME)

Em sua última atualização da classificação dos tumores de cabeça e pescoço (2005), a Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica como carcinomas de origem odontogênica os chamados Ameloblastoma Metastatizante, o Carcinoma Ameloblastico (CAME), carcinoma intraóssea primário, Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas (COCF), além do Carcinoma Odontogênico de Células Claras (COCC) (Sciubba, 2005).

É definida como uma malignidade odontogênica rara que combina características histológicas de ameloblastoma com características citológicas de malignidade. As metástases dessa lesão podem ocorrer, em especial para os pulmões ou para os linfonodos regionais, embora metástases ósseas, para o fígado e cérebro, também possam ocorrer (Slootweg et al, 1984; Datta et al, 2003; Sciubba et al, 2005; Li et al, 2014; Loyola et al, 2016). O termo Carcinoma Ameloblástico foi introduzido por Shaffer (Shaffer, 1974). Essa lesão pode surgir como resultado de alterações malignas em um ameloblastoma benigno preexistente (carcinoma ex-ameloblastoma, tipo secundário) ou pode se desenvolver *de novo* como um Carcinoma Ameloblastico primário não precedido por um ameloblastoma simples (Sciubba, 2005).

O CAME é subdividido de duas formas: *Primário*, o qual se origina *de novo* e um tipo *Secundário*, resultante da transformação maligna do ameloblastoma. A maioria dos carcinomas ameloblásticas secundários resultam da transformação maligna de uma lesão primária após múltiplas recorrências (Benlyazid et al, 2007; Karakida et al, 2010).

Esta subclassificação distingue o CAME do chamado ameloblastoma maligno, o qual está associada com metástases, a pesar de manter características histológicas benignas, tanto no foco primário, quanto no foco metastático (Fonseca et al, 2016).

O Carcinoma Ameloblástico, acomete predominantemente a região posterior da mandíbula. Não há predileção por sexo aparente, embora alguns autores tenham descrito predominância no sexo masculino (Kruse et al, 2009; Loyola et al, 2016). A lesão parece não mostrar qualquer predileção por faixa etária, havendo relatos de acometimento em indivíduos cuja idade varia dos 15

até os 84 anos (Simko et al, 1998; Fitzpatrick et al, 2015; Carreón-Burciaga et al, 2015). A lesão manifesta-se clinicamente como aumento de volume localizado (sinal clínico mais comum), mas a dor, o crescimento rápido, e trismo e disfonia, os principais sintomas relatados (Suomalainen et al, 2006; Hall et al, 2007; Nai et al, 2011; Jensen et al, 2011; Pundir et al 2011; Loyola et al, 2016; Fonseca et al, 2016). Recorrência após ressecção é um acontecimento frequente (Sciubba, 2005)

Os achados radiográficos do Carcinoma Ameloblastico incluem a presença de uma radiolucencia uni ou multilocular, mal definida, com reabsorção radicular do dente. Há esclerose marginal sem a formação de novo osso periosteal, além de perda da lámina dura. As vezes observa-se a presença de radiopacidades focais (Loyola et al, 2016). Estas radiopacidades não são comuns no ameloblastoma, podendo resultar de necrose com sobreposição de calcificação distrófica, característica que tem sido relatada nos CAME (Gandy et al, 1992).

Como dito anteriormente, o Carcinoma Ameloblastico é determinado por características citológicas malignas em combinação com o padrão histológico global de um ameloblastoma. Observa-se que um grande pleomorfismo, com alta atividade mitótica, e necrose focal, além de invasão perineural e hipercromia nuclear podem estar presentes. A organização em paliçada da camada periférica e a polaridade nuclear invertida, também podem estar presentes. Uma estrutura semelhante ao retículo estrelado geralmente é encontrada. Espaços císticos revestidos por epitélio podem estar presentes (Sciuba, 2005; Nai et al, 2011; Jensen et al, 2011; Pundir et al, 2011; Fitzpatrick et al, 2015; Carreón-Burciaga et al, 2015; Fonseca et al, 2016; Loyola et al, 2016).

O diagnóstico do CAME é um tanto quanto desafiador, ainda mais quando consideramos a diferenciação ameloblastica e transições entre células claras e não-claras. Essa dificuldade pode ser exemplificada pelo achado de células claras serem observados tanto em casos de CAME, quanto de COCC (Loyola et al, 2016). Diante desses achados, Hall e seu grupo consideram o COCC como sendo um subtipo de células claras do CAME (Hall et al, 2007; Loyola et al, 2016). Há ainda relatos de CAME com presença de células claras, deposição de

dentinóide, calcificações e células fantasmas, o que têm dificultado e aumentado a complexidade do diagnóstico dessa lesão, em especial, o diagnóstico diferencial entre CAME, AAD, COCF e COCC (Loyola, et al, 2016).

Trabalhos já foram realizados no intuito de descobrirem possíveis marcadores de diagnóstico entre o CAME e o AME, entretanto ainda há a necessidade de se fazer essa mesma avaliação entre as diferentes lesões supracitadas (Bologna-Molina et al, 2009; Nobusawa et al, 2014; Loyola et al, 2016).

Sendo uma doença rara, não há diretrizes de tratamento, no entanto, a terapêutica padrão preconizada é a ressecção cirúrgica completa da lesão, com esvaziamento cervical. A remoção precoce, agressiva e completa do tumor parece oferecer a melhor chance de sobrevivência, além, de apresentar menores taxas de recorrência (Hall et al, 2007; Kishore et al, 2015). Radioterapia parece não apresentar grande efeito sobre o tumor, uma vez que o mesmo parece ser radio resistente, assim como também a quimioterapia parece apresentar limitados benefícios quanto ao tratamento da lesão (Benlyazid et al, 2007; Abiko et al, 2007; Yazici et al, 2008; Yoon et al, 2009; Jensen et al, 2011). O acompanhamento após o término do tratamento deve ser prolongado, tendo em vista inclusive a impossibilidade de se definir um prognóstico, uma vez que ainda são limitadas as informações acerca do carcinoma (Casaroto et al, 2012).

### **1.2.2 Carcinoma Odontogênico de Células Claras (COCC)**

Células claras podem estar presentes em diversos tumores e, normalmente, são o resultado de armazenamento intracelular de várias substâncias, por exemplo, glicogênio, mucina, lipídios, ou até mesmo pela escassez de organelas. Tumores de células claras, na região de cabeça e pescoço, são geralmente oriundos de glândulas salivares. (Macdonald et al, 1997).

Estas células claras também podem estar presentes em algumas lesões odontogênicas, tais como o tumor epitelial odontogênico calcificante (TOEC) (Schmidt-Westhausen et al, 1992; Hicks et al, 1994), ameloblastoma além dos carcinomas odontogênicos (Hansen et al, 1985; Waldron et al, 1985). Esse fato

não é surpresa, tendo em vista à sua origem a partir da lâmina dentária, que apresenta células claras como um de seus componentes (De Aguiar, et al, 1960).

Abordando de forma especial o grupo de lesões carcinomatosas de origem odontogênica, com componente de células claras, seus relatos ainda são recentes. Tudo começou em 1981, durante uma reunião internacional de Patologia Bucal, realizada em Gotemburgo, Suécia, onde o Dr. Gordon Rick apresentou um caso de um tumor mandibular que exibia comportamento clínico bastante agressivo. Histologicamente, o mesmo parecia ser de origem odontogênica, apresentando um componente de células claras. Ele batizou este tumor incomum como um Carcinoma Odontogênico de células claras (COCC). Esta foi a primeira descrição da entidade como um carcinoma (Bang et al, 1989).

Quatro anos depois, Hansen (Hansen et al, 1985) relataram 3 casos de um tumor localmente agressivo com um componente de células claras em destaque. Para esta lesão, os autores cunharam o nome tumor odontogênico de células claras. No mesmo ano Waldron descreveu duas lesões com as mesmas características, utilizando o termo ameloblastoma de células claras (Waldron, 1985). Em 1989, Bang (Bang et al, 1989) relataram mais 3 casos de neoplasia com características idênticas às descritas por Hansen. No entanto, um dos 3 casos havia sofrido metástase para um nódulo linfático regional, e os outros dois casos metastizado para os pulmões. Estas descobertas levaram os autores a propor uma alteração na nomenclatura da lesão de tumor odontogênico de células claras para Carcinoma Odontogênico de Células Claras (Bang et al, 1989).

Em 1992, baseada em estudos que afirmavam que a lesão em questão apresentava um padrão histológico bifásico variando de plexiforme a folicular, com um extenso componente de células claras, a OMS classificou a lesão como um tumor benigno, denominado Tumor Odontogênico de Células Claras ou Ameloblastoma de Células Claras, sendo considerado uma variante agressiva do ameloblastoma (Waldron et al, 1985; Kramer, 1992).

Já em 2005, em sua nova classificação, a OMS reclassificou o COCC, agora como um tumor maligno de origem odontogênica, devido sua capacidade

de crescimento agressivo e destrutivo, além de suas metástases pulmonares e linfonodais (Brinck et al, 2001; Kumar et al, 2003; Loyola et al, 2015).

Clinicamente observa-se um aumento progressivo de volume na região posterior da mandíbula principalmente de homens cuja idade varia por volta de 20-64 anos de idade (Loyola et al, 2015). Pode haver também dor, sangramento, mobilidade dentária e perda ou alteração na sensibilidade do nervo alveolar inferior (Adamo et al, 2002; Bang, 2005; Werle et al, 2009; Kim et al, 2014). Aos exames radiográficos observa-se área radiolúcida osteolítica, por vezes bem, por vezes mal definida, podendo haver reabsorção radicular. Múltiplas perfurações corticais com aparente invasão de tecido mole também podem ser notadas (Brinck et al, 2001; Bang, 2005; Loyola et al, 2015).

Microscopicamente a lesão é composta por lóbulos e trabéculas de células neoplásicas situadas num estroma fibroso. Ostensiva diferenciação dos ameloblastos-like em torno das áreas centrais da lesão podem ser identificados. Há casos em que um padrão bifásico clássico, no qual a maioria das células tumorais se apresentam de forma cúbica com vacuolação clara a citoplasmas fracamente eosinofílicos. Remanescentes do retículo estrelado podem, também, ser observados. Moderado pleomorfismo celular, anisocitose, anisocariose, aumento do número de mitoses e hipercromatismo nuclear são encontrados no tumor (Bang, 2005; Bilodeau et al, 2013; Yancoskie et al, 2014; Loyola et al, 2015).

Devido a semelhança microscópica com outras lesões com características de células claras, é importante se fazer um diagnóstico histológico diferencial. Dentre essas lesões podemos citar o ameloblastoma, TOEC, carcinoma de células escamosas (CEC), e tumores de glândulas salivares bem como certos tumores metastáticos, tal como carcinomas renais, uroteliais (Avninder et al, 2006). Quanto a imuno-histoquímica, esses carcinomas são negativos para os marcadores mioepiteliais (S100, GFAP, SMA, calponina) (Bilodeau et al, 2011; Ginat et al, 2015). Outro cenário desafiador é encontrado quando se aborda o diagnóstico diferencial entre o COCC, AME e CAME. Células claras são encontradas em variantes do AME assim como no COCC. É necessário ainda elucidar em que grau a presença de células claras são indicativas de um fenótipo

maligno. Outro ponto importante é a transição entre fenótipos de células claras e células não claras e a perda de diferenciação de ameloblastos, fato que pode ser visto no COCC, assim como também no CAME, sugerindo que CAME e COCC são variações fenotípicas da mesma lesão (Loyola et al, 2015).

Com base nos achados acima mencionados, a hipótese de que AME, CAME e COCC são tumores patogênicamente relacionados é plausível, onde o Ameloblastoma poderia sofrer transformação em AMECA ou CCOC (Hall et al, 2007; Loyola et al, 2015).

Marcadores biológicos (p16, PCNA, Ki-67, p53, etc) (Bologna-Molina et al, 2009; Nobusawa et al, 2014; Loyola et al, 2015) têm sido pesquisados para tentar elucidar essa dúvida, entretanto, a mesma ainda continua vigente, se fazendo necessário novos estudos mais aprofundados nesse sentido, o que poderá facilitar a segregação de tais tumores.

O tratamento de escolha para a lesão é a ressecção tumoral com margens de segurança. Um longo período de acompanhamento é sugerido, tendo em vista as taxas de recorrência e metástases do carcinoma. Radioterapia adjuvante em doses de até 61Gy tem sido utilizada, assim como, a utilização de dicloro platina diamina, como quimioterápicos. Estas abordagens terapêuticas têm sido relatadas especialmente em casos em que não foi possível identificar margens livres de lesão. (Fan et al, 1992; Brandwein et al, 2002; Adamo et al, 2002; Bang, 2005; Kumar et al, 2003; Chera et al, 2008; Loyola et al, 2015).

### **1.2.3 Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas (COCF)**

O carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas (COCF), é uma rara manifestação dos tumores odontogicos. É uma lesão que foi descrita pela primeira vez, por IKemura e cols em 1985, como um foco maligno dentro de um cisto odontogênico calcificante (COC) (IKemura et al, 1985).

Uma vasta gama de termos fora utilizada para nomear a lesão, dentre os quais, pode-se citar: cisto odontogênico calcificante (COC), termo que foi pela primeira vez utilizado por Gorlin et al, em 1962; ameloblastoma queratinizante (Bhaskar, 1965), tumor odontogênico de células fantasmas (Fejerskov & Krogh, 1972); tumor odontogênico periférico com queratinização e células fantasmas

(Vuletin et al, 1978); Tumor Odontogênico Calcificante de Células Fantasmas (Hong et al, 1992), dentre outros.

Buscando reduzir e homogeneizar toda essa diversidade de termos, na 3<sup>a</sup> edição de seu “Blue book”, a OMS, os uniu substituindo-os pelo termo “carcinoma odontogênico de células fantasmas” (Takata, 2005).

Dessa forma, desde 2005 o COCF é definido como um tumor odontogênico epitelial maligno com características de Cisto Odontogênico Calcificante e/ou Tumor dentinogênico de células fantasmas (Takata, 2005). É um tumor que acomete mais comumente a maxila de indivíduos do sexo masculino, estando presente em uma ampla faixa etária, dos 13-72 anos, com um pico de incidência na quarta década de vida (Ellis & Shmookler, 1986; Grodjesk et al, 1987; Takata, 2005).

Clinicamente, a lesão se apresenta como um inchaço sintomática na maxila ou mandíbula, levando a destruição óssea por vezes associada a parestesia (Ellis et al, 1986). Quanto ao comportamento biológico, percebe-se uma certa imprevisibilidade nesse aspecto. Alguns casos são caracterizados por um crescimento indolente enquanto que em outros, observa-se um curso agressivo e potencialmente fatal (Takata, 2005). Metástases à distância são incomuns. Até à data, apenas um caso de metástases pulmonares foi descrito (Grodjesk et al 1987). A taxa de sobrevida é de aproximadamente 73% em 5 anos (Lu et al, 1999).

Nos exames radiográficos, os COCF têm sido descritos como uma lesão puramente radiolúcida ou mista. As imagens radiográficas costumam mostrar uma grande lesão osteolítica com limites mal definidos com vários focos radiopacos em seu interior (Castle et al, 1999; Kim et al, 2000; Goldenberg, 2004; Nazarettian et al, 2007).

Quanto aos aspectos histológicos, estes tumores apresentam-se de forma levemente eosinofílica. Há casos em que são vistos apenas o esboço dos núcleos originais de células epiteliais queratinizadas, que perderam seu núcleo, daí o termo “células fantasmas”. COCF são lesões infiltrativas, sólidas compostas por epitélio odontogênico proliferado associado a essas células

fantasmas. Por vezes, encontra-se formação e produção de uma substância fundamental dentinoide (Mori et al, 2000; Goldenberg, 2004; Tanaka, 2005).

A principal forma terapêutica recomendada para o tratamento do COCF é a abordagem cirúrgica, com ampla excisão. O uso da terapia de radiação pós-operatório, com ou sem quimioterapia adjuvante é controversa (Limonelli et al, 1997; Kamijo et al, 1999; Kim et al, 2000; Zhu et al, 2012)

O diagnóstico da lesão baseia-se na identificação de um componente epitelial maligno associado a um componente de COC benigno clássico. (Grodjesk et al, 1987; Kramer et al, 1992; Takata, 2005). Entretanto, faz-se necessário ressaltar o complexo diagnóstico diferencial a que esse tumor deve ser submetido, em especial quando o comparamos com o CAME e o COCC (Loyola et al, 2016). São necessários estudos a nível de marcadores biológicos que facilitem esse processo, tendo em vista a íntima relação que o COCF mantém com os tumores anteriormente citados, conforme já foi relatado nos itens 1.2.2 e 1.2.1

### **1.3 Epigenética**

O termo “epigenética” vem do grego, onde o prefixo *epi* possui significado de “acima de”, ou “em adição a” e o sufixo “*genesis*”, (criação), o qual é oriundo de “*geno*” (formação) (Wolffe & Matzke, 1999).

Foi definido, na década de 1950, pelo biólogo britânico Conrad Waddington, como sendo uma “forma fenotípica estável e hereditária resultante de alterações no cromossomo, sem, no entanto, haver alterações na sequência do DNA”, ou seja, “epigenética” é o estudo de todas as alterações hereditárias na expressão do gene e na organização da cromatina que são independentes da sequência de DNA e que podem ser propagadas através de divisões celulares (Bird, 2007; Dawson et al, 2012).

Quando falamos em pesquisas relacionadas ao câncer, a epigenética representa um dos campos que estão em grande expansão, tendo em vista a íntima relação que alterações epigenéticas mantém com mecanismos fundamentais do desenvolvimento da doença (Chakravarthi et al, 2016). Tendo

em vista que a função de regular a expressão de genes e suas propriedades estará alterada assim como o comportamento da célula (Chakravarthi et al 2016).

Existem três classes distintas de alterações epigenéticas que podem ser herdadas ao longo de gerações de células: a metilação do DNA, modificações de histonas, silenciamento de genes, mediados por RNA (Chakravarthi et al, 2016).

As modificações de histonas incluem uma variedade de alterações pós-traducionais dessas proteínas. São representadas principalmente pelos processos de acetilação, fosforilação, ubiquitinação e metilação, que ocorrem em resíduos de aminoácido específicos das histonas (Jenuwein & Allis, 2001).

Essas modificações desempenham papéis essenciais na transmissão da memória transcripcional epigenética. A memória epigenética dentro de uma célula é armazenada sob a forma de um código de histona que define a estrutura e a atividade de diferentes regiões da cromatina (Jenuwein & Allis, 2001).

Sendo um regulador global da expressão do gene, a maioria dessas modificações afetam profundamente a progressão do câncer (Jenuwein & Allis, 2001; Jones & Bayli, 2007).

O processo de metilação do DNA envolve a transferência enzimática de um grupo metil da S-adenosilmetionina para o carbono do anel de pirimidina de uma citosina, sendo esse processo mediado pela família de DNA metiltransferases (Bird, 2002; Denis et al, 2011). Exemplos de regiões altamente metiladas, são regiões centroméricas, DNA satélite e transposons. Estes locais são essenciais para a estabilidade do genoma (Konkel & Batzer, 2010; Ross et al, 2010).

Faz-se dessa forma necessário destacar que a metilação do DNA é um processo fisiológico que participa na manutenção do estado de atividade do gene e identidade da célula, bem como dos mecanismos de defesa do genoma, agindo contra potenciais elementos deletérios (Esteller, 2005; Jeschke et al, 2015).

Já os MicroRNAs (miRNAs), outro tipo de mecanismo epigenético, são pequenos RNAs não-codificantes que inibem a tradução e/ou promovem a degradação de seus RNAs mensageiros-alvo. Estes representam o mais recente relatado mecanismo epigenético, desempenhando um papel importante na regulação da transcrição de genes (Calin & Croce, 2006). Desempenham um papel crucial no controle epigenético, com diversos modos de ação, o que leva a diferentes consequências funcionais. Portanto, é provável que a expressão aberrante de miRNAs contribua para o desenvolvimento de vários tipos de cânceres (Krutovskikh & Herceg, 2004; Hauptman & Glavač, 2013).

Trabalhos indicam que todas as três classes de modificações epigenéticas se inter-relacionam nos casos de malignidades humanas (Herceg, 2016). Exemplo disso é que miRNAs agem como reguladores transpcionais através do recrutamento de complexos modificadores de histonas de forma a segmentar o locus em *cis* ou *trans* (Brockdorff, 2013). Como consequência disso, os locus alvo pode ser ativado ou silenciado de acordo com as modificações sofridas pelas proteínas histonas. É sabido que esse processo é diretamente relacionado a diversos tipos de cânceres (Brockdorff, 2013).

Outro exemplo são as chamadas alterações globais de histona que têm o potencial de afetar a estrutura e integridade do genoma e perturbar os padrões normais da expressão do gene, interferindo de forma direta no processo de metilação do DNA. Levando assim a alterações nesse processo, o que pode ser fator causal do câncer, tendo em vista que levam a perturbações na expressão de genes, particularmente os chamados genes supressores de tumor (Fraga et al, 2004; Wilson et al, 2007; Berger et al, 2009).

### **1.3.1 Histonias**

A estrutura da cromatina é organizada em nucleossomos, cada um dos quais consistindo de um segmento de DNA (~ 200 pb) enrolado em torno de um octâmero proteico composto de quatro pares de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4); o DNA especificamente enrolado em torno do octâmero (147 pb) é “estabilizado” por uma outra histona, a H1, constituindo o núcleo do nucleossomos, designado como cromatossomo (van Holde, 1988)

Dados cristalográficos revelam que esse octâmero apresenta uma estrutura tripartida por um tetrâmero centralmente localizado, o qual é formado a partir de dois dímeros H3-H4 além de dois dímeros de H2AH2B (Arents et al, 1991). Este dímero H2AH2B e os dois dímeros H3-H4 se acomodam em lados opostos, sendo esta interação denominada “aperto de mãos” (Alberts et al., 2010).

As histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) mostram dois domínios: um domínio “de dobra” (*histone-fold domain*) que interage com outras histonas e com o enrolamento do DNA em torno das histonas do nucleossomos, e o domínio amino-terminal que se estende para fora do nucleossomos. Essas caudas podem sofrer modificações ditas pós-traducionais, as quais podem regular de forma direta a estrutura e função da cromatina; frequentemente agem de forma a recrutar outras proteínas não-histonas à cromatina, a fim de manter o estado modificado (Arnaudo & Garcia, 2013; Zhang et al, 2015).

Essas modificações desempenham um papel importante na regulação da expressão de diversos genes. Além de alterar a estrutura da cromatina, fazendo com que esta fique aberta ou fechada, mais ou menos susceptível a transcrição (acesso de fatores de transcrição e RNA polimerases), são capazes ainda de neutralizar a ação de agentes deletérios que possam atuar sobre o nucleossomo, alterando assim sua estrutura (Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001; Felsenfeld & Groudine, 2003; Liang & Shoudan 2010).

Estas modificações são elementos importantes da regulação epigenéticas do DNA, sendo reconhecidas como acetilação, metilação, fosforilação, sumoilação, ribosilação e ubiquitinação, envolvendo principalmente resíduos de lisina, arginina e serina (Cannon, 1955; Zhang et al, 2007; Guo et al, 2014; Zhang et al, 2015). Tem sido proposto que essas modificações pós-traducionais das histonas agem de forma isolada ou combinada no estabelecimento de estados específicos da cromatina específicos associados a expressão gênica. Embora sua ação seja relacionada a função do DNA, tem sido relatada modificações de atividades funcionais de certas histonas a partir de modificações em outras histonas (Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001).

As caudas N-terminais das histonas são complementadas por novas caudas das chamadas histona-variantes (Choo, 2001). Dado o número de cromossomos por célula, o número de nucleossomos por cromossomo, o número de diferentes caudas de histona, e o número de diferentes modificações, a complexidade potencial de diferentes formas de ação que modificações ditas pós traducionais nas caudas N-terminais das histonas é imenso. Essa dedução levou Strahl e Allis a proporem o chamado "código de histona", o qual é responsável por modular a expressão gênica, afetando o acesso da maquinaria transcrecional da célula ao DNA (Roach et al, 2011).

Quando ocorrem de forma isolada, essas modificações que ocorrem nas caudas N-terminais das histonas irão frequentemente desempenhar um papel não-independente, ou seja, dependem um dos outros para que possam executar sua função, enquanto que combinações de diferentes modificações atuam de forma mutua, afetando de forma conjunta a expressão e transcrição genética através de formas regulatórias diferentes como sinergismo e antagonismo de funções, (Kalebic, 2003; Schones & Zhao, 2008; Shahbazian & Grunstein, 2007).

Esse modo de agir (sinergismo e antagonismo), pode ser exemplificado pelo fato de que algumas modificações geram condensação da cromatina (heterocromatina), na qual o DNA e as proteínas histonas são firmemente embalados, bloqueando o acesso dos fatores de transcrição e outras levam a abertura da cromatina, instigando dessa forma a expressão gênica, é dessa forma que o "código de histona" executa sua função (Roach et al, 2011).

Modificações pós-traducionais das proteínas histonas são responsáveis por modular as propriedades da cromatina, havendo assim um impacto no estado celular, afetando de forma direta o processo de diferenciação e a determinação do resultado de praticamente todos processos relacionados ao DNA em eucariotos (Wagner & Carpenter, 2012). A seguir, revisaremos alguns tipos de modificações envolvendo processos de acetilação, metilação e fosforilação que importarão aos objetivos do presente trabalho.

### **1.3.1.1 H3K36me3**

O processo de mono-, di- e tri metilação em H3K36 já é observado em leveduras. Nos eucariotos, esses processos se apresentam bastante abundantes e altamente conservados (Kizer et al, 2005; Lee et al, 2007).

As funções biológicas da mono- / dimetilação de H3K36 ainda são desconhecidas, enquanto que a trimetilação de H3K36 parece estar relacionada com a regulação do processo de reparo do DNA, *splicing* alternativo e remodelação da cromatina, nos eucariotos (Zhang et al, 2015).

De forma geral, a metilação de H3K36 é uma marca das histonas e tem sido amplamente associada a ativação da cromatina (execução das funções de transcrição, por exemplo), mas também com a repressão da transcrição, *splicing* alternativo, replicação e reparo do DNA, metilação do DNA além da transmissão de memória genética de pais para filhos durante o desenvolvimento (Wagner & Carpenter, 2012).

A enzima histona metiltransferase (HMTase) usa S-adenosilmetionina (SET) para adicionar grupos metil à resíduos específicos (Lisina (Lys) ou Arginina (Arg)) da proteína histona H3. Aproximadamente, oito enzimas distintas (NSD1 família 1/2/3, ASH1L, SMYD2, SETMAR e SETD2) executam esse processo *in vitro/in vivo* na Lys36 (H3K36) de mamíferos. Dessas, apenas SETD2 é responsável por realizar o processo de trimetilação do resíduo 36 de lisina da histona H3 *in vivo* (Hu et al, 2010; Wagner & Carpenter, 2012).

A distribuição de H3K36me3 depende do *splicing*, e este é regulado pela expressão de H3K36me3 (Luco et al, 2010; Almeida et al, 2011; Kim et al, 2011; Pradeepa et al, 2012). H3K36me3 pode ser transmitida para a maquinaria do *splicing* através de uma interação entre um gene-MORF e uma proteína contendo cromodomínio (Blair et al, 2011). Essa proteína se liga diretamente à H3K36me3, e ao trato de polipirimidina, o qual, inibe o exon inclusivo (Luco et al, 2010). Após esse processo, um fator de interação *splicing*-proteína (Psip1; PC4 e SF2-interagindo proteína 1) é igualmente expresso para se ligar à H3K36me3 (Pradeepa et al, 2012).

É sabido que em leveduras, H3K36me3 tem um papel bem definido na coordenação de eventos associados à fase de alongamento da transcrição (Lee & Shilatifard, 2007). Já nos eucariotos superiores, H3K36me3 é responsável, em

especial, por regular a reparação do DNA, splicing alternativo, e remodelação da cromatina (Botuyan et al, 2006; Luco et al, 2010; Vermeulen et al, 2010; Li et al, 2013; Fontebasso et al, 2013).

Essas funções estão ligadas aos chamados "leitores" de cromatina com domínios prolina-triptofano-triptofano-prolina, os quais interagem com resíduos de lisina metilados (Luco et al, 2010; Vermeulen et al, 2010; Li et al, 2013). A má execução dessas funções faz com que haja uma má-regulação na expressão de alguns genes, o que pode facilitar dessa forma o desenvolvimento de cânceres (Zhao et al, 2009; Nimura et al, 2009; Kolasinska-Zwierz et al, 2009).

As afirmações anteriores são suportadas por algumas evidências, tais como: fenótipos de câncer foram alterados em modelos em que ocorreram a perda da função de H3K36me3 ou SETD2 através da desregulação dos chamados "leitores" de cromatina (Ho et al, 2016).

A perda de H3K36me3 está diretamente relacionada com o surgimento de gliomas e condroblastomas (Behjati et al, 2013). Há ainda, relatos de surgimento e progressão de carcinomas de células claras renais; cânceres de mama; leucemia, dentre outros (Marango et al, 2008; Newbold et al, 2010; Kudithipudi & Jeltsch, 2014). Diante dessas evidências, os autores supõem que desregulação de H3K36me3 desempenha um papel de destaque na origem e progressão de outros tumores (Behjati et al, 2013; Kudithipudi & Jeltsch, 2014; Ho et al, 2016).

Diante desses achados, torna-se importante ressaltar que a trimetilação da lisina 36 na Histona 3 deve ser estudado, para que haja uma melhor elucidação da origem e progressão de neoplasias, tendo em vista as funções dessa modificação global de histona (Bannister et al, 2005; Barski et al, 2007; Kimura, 2013).

### **1.3.1.2 H3K9ac, H4K12ac**

Entre as modificações ditas pós traducionais das proteínas histonas, a acetilação apresenta um papel de destaque no controle da expressão gênica, sendo o processo de acetilação responsável por ativar o processo de transcrição gênica, tendo em vista que, a cromatina torna-se mais acessível a uma série de

fatores e complexos coativadores, enquanto a desacetilação é responsável por regular o silenciamento gênico, inclusive daqueles genes supressores de tumor, resultando no desenvolvimento e progressão tumoral. (Mizzen et al, 1998; Juliano et al, 2016).

Essas modificações das proteínas histonas, ocorrem em sua calda N-terminal e são importantes reguladoras da atividade transcrecional (Kouzarides, 2007). O processo de acetilação / desacetilação de diferentes resíduos de lisinas nas caudas N-terminais das histonas H3 e H4 foram uma das primeiras modificações descritas (Roth et al, 2001; Calestagne-Morelli A & Ausio, 2006; Nightingale et al, 2006).

As mesmas são reguladas por dois diferentes grupos de enzimas, as denominadas acetil transferases de histonas (HAT), as quais podem se localizar tanto no citoplasma, quanto no núcleo celular. Elas são responsáveis por adicionar um grupo acetil, derivado do composto acetil-Co-A a resíduos de lisina (Yang, 2004).

Há ainda, as chamadas desacetilases de histona (HDAC), as quais são responsáveis por remover o grupo acetil daqueles resíduos de lisina (Taby & Issa, 2010). Essas desacetilases de histona são divididas em quatro classes (I-IV) (Yang & Seto, 2008). Classes I, II e IV apresentam grande correlação em termos de estrutura e mecanismo, já as HDAC's de classe III compreendem os membros da família das sirtuinas, proteínas que apresentam relação direta com a estabilidade do genoma (Rine et al, 1979; Takata et al, 2003; Serrano et al, 2013).

O equilíbrio entre as atividades de HAT e HDAC é fundamental no processo de regulação da cromatina como resposta às diversas alterações que ocorrerem de forma ininterrupta nas células do organismo (Vaquero et al, 2003; Kurdistani & Grunstein, 2003).

A acetilação de resíduos de lisina em proteínas histona ocorre principalmente por dois motivos: (I) alterar a estrutura da cromatina de forma direta, tornando-a mais acessível, facilitando o processo de transcrição; e (II) atuar como um recruta de complexos modificadores de cromatina. Complexos

estes que, mantêm relação direta com o processo de reparo do DNA, silenciamento gênico e progressão do ciclo celular (Carrozza et al; 2003; Choi & Howe, 2009).

Trabalhos têm demonstrado correlação entre a expressão de H3K9ac e agressividade/sobrevida de pacientes com os mais diversos tipos de câncer. Barlesi, et al, 2007 afirmam que a acetilação de H3K9 possui grande influência na sobrevida de pacientes com adenocarcinomas de pulmão. Os pacientes que apresentavam níveis menores de expressão de H3K9ac apresentavam maior sobrevida.

Zhen et al, 2010, ratificam os resultados de Barlesi, et al, 2007, ao afirmarem que a expressão de H3K9ac em carcinomas de ovário diminuem à medida que há um aumento na diferenciação. Dessa forma, aqueles pacientes que apresentavam menores taxas de expressão da proteína, apresentavam uma maior sobrevida.

Liu et al, 2015, ao estudar gliomas, encontram os mesmos resultados de seus antecessores, pois, observaram uma maior expressão da proteína em tecidos tumorais, quando comparados a tecidos não tumorais. Lutz et al, 2016, afirmam que a proteína em questão é significativamente associada com estágios mais avançados de carcinoma colo-rectal. Os autores afirmam que a sobrevida é maior nos pacientes com menor expressão de H3K9ac.

De forma oposta a esses resultados, Elsheikh et al, 2009, afirmam que baixos níveis de H3K9ac foram significativamente associados com menor sobrevida em pacientes portadores de tumores de mama.

Os resultados encontrados por Elsheikh et al, 2009, são ratificados por Arita et al, 2012, ao afirmar que indivíduos com carcinoma de pulmão com baixo grau de diferenciação tem menores níveis de expressão de H3K9ac que as lesões com maior grau de diferenciação, ou seja, os baixos níveis de expressão de H3K9ac está associado a uma pior sobrevida.

Essa relação de expressão/agressividade/sobrevida parece seguir pelo mesmo caminho, quando tratamos da proteína H4K12ac. Seus níveis de

expressão são altamente correlacionados com o grau de diferenciação das mais diversas neoplasias, embora não haja um consenso entre elas.

Manuyakorn et al, 2010, ao estudarem cânceres de pâncreas, afirmaram que a baixa expressão de H4K12ac está relacionada com lesões em estágio inicial. Resultado que é reiterado por Tzao et al, 2009, ao estudar carcinoma de células escamosas de esôfago. O mesmo resultado também foi encontrado em estudo realizado por Juliano et al, 2016, que afirma que alta expressão de H4K12ac é significativamente maior em casos mais avançados da doença, quando comparados aquelas lesões em estágios iniciais (Juliano et al, 2016).

Há ainda de se ressaltar, os resultados apresentados por Puppin et al, 2011, em os autores afirmam que H4K12ac é altamente expresso em adenomas foliculares de tireóide, e apresenta baixa expressão em carcinomas papilares de tireóide. Os autores acreditam que isso ocorra pelo fato de que a presença de oncogenes (*BRAF*; *HRAS*, *RET-PTC*), faz com que haja uma diminuição dos níveis de H4K12ac, devido a disparidade de ação entre HAT e HDAC.

O conhecimento das reais funções das modificações de histonas pode favorecer a criação de drogas contra neoplasias. Por exemplo, já há o desenvolvimento de drogas que interagem com modificações de histonas, inibindo por exemplo as HDAC's (Gilbert et al, 2004). Entretanto, a limitação de conhecimento acerca do real papel, das HDAC's, por exemplo, tem sido um limitante para esse processo (Gilbert et al, 2004).

Alguns trabalhos têm afirmado que H3K9ac e H4K12ac poderiam ser um biomarcador de prognóstico (Zhen et al, 2010), entretanto o seu real efeito sobre o câncer ainda não é claro (Johnson et al, 2002; Snowden et al, 2002; Ko et al, 2010).

Outro fato interessante que nos mostra o desconhecimento real das funções dessas proteínas sobre o câncer, assim como sobre tecidos normais é que diferenças na acetilação H3 e H4 ao longo de um mesmo gene tem sido relatadas. Hiperacetilação de H3 parece ser mais limitada à região promotora do gene, enquanto a hiperacetilação de H4 se estende por um domínio mais amplo. Como exemplo observa-se que vários genes se apresentam hipoacetilados para

H3 em regiões promotoras e hiperacetilados para H4 nas demais regiões (Vignali et al, 2000).

### 1.3.1.3 H3S10ph

Fosforilação de histona foi pela primeira vez descrita na década de 1960 por Gutierrez. Pouco tempo depois, descobriu-se que uma kinase dependente de AMPc era a responsável por esse processo (Gutierrez & Hnilica, 1967; Langan, 1968). Shoemaker e Chalkley, em 1978, afirmaram que a proteína histona H3 é fosforilada *in vivo* durante a metáfase, sendo que para isso, era necessária uma única proteína kinase independente de AMPc (Shoemaker & Chalkley, 1978).

Quatro anos após essa descoberta, Taylor identificou uma proteína kinase, dependente de AMPc, capaz de fosforilar H3 em serina 10 *in vitro* (Taylor, 1982). Assim, desde a década de 1970, um número crescente de proteínas kinases têm sido relacionadas com o processo de fosforilação das histonas, sendo que as mais comentadas são: a Aurora Kinase B (ARK2), pMSK1, MSK2, Pim1 (DeManno et al, 1999; Schmitt et al, 2002; Prigent & Dimitrov, 2003; Schluter et al, 2010; Kim et al, 2016).

Nos vertebrados, H3S10ph ocorre no início da fase G2 dentro da heterocromatina pericentromérica e depois se espalha ao longo dos braços cromossômicos (Crosio et al., 2002), aqui ela é correlacionada principalmente com processos de condensação do cromossomo durante a mitose e a transcrição. Em plantas, a fosforilação de H3S10 começa mais tarde, na fase de prófase e não se estende para além da região pericêntrica (Houben et al, 1999; Manzanero et al, 2000).

Especificamente em mamíferos, durante o ciclo de célula, três tipos de histonas (H1, H2A e H3) são extensivamente fosforiladas (Klimberg et al, 2015). Em contraste daquilo que ocorre em H1, onde a fosforilação ocorre em todo o ciclo celular, em histona H3, esse processo ocorre de forma reduzida em células no período de interfase, ocorrendo quase que exclusivamente durante a mitose. Isso se deve, principalmente à fosforilação que ocorre na posição 10 do resíduo de serina (H3S10ph) (Kurita et al, 2014).

Estudos bioquímicos revelaram que, embora cinco tipos de resíduos N-terminais de histona H3 possam sofrer fosforilação (Ser10, Ser28, Thr3, Thr6 e Thr11), a mais estudada é aquela que ocorre na posição 10 do resíduo de serina (H3S10ph), uma vez que ela é dependente do ciclo celular (Prigent e Dimitrov, 2003; Cerutti & Casas-Mollano de 2009; Banerjee et al, 2011).

Como dito anteriormente, H3S10ph é detectada pela primeira vez na fase tardia de G2, atingindo a sua expressão máxima naqueles cromossomos que estão na fase de metáfase (Gurley et al, 1978; Paulson et al, 1982; Hendzel et al, 1997). Ela é essencial para a iniciação do processo de condensação do cromossomo, mas não é necessária para sua manutenção (Van Hooser et al, 1998; Wei et al, 1999).

H3S10ph é expressa de forma bastante acentuada ao longo dos cromossomas, durante a mitose, mas também está associada com as regiões da cromatina que estão restritas à transcrição ativa durante a interfase (Prigent & Dimitrov, 2003; Cerutti & Casas-Mollano, 2009).

A fosforilação de H3S10 em mitose, começa naqueles cromossomos em fase de prófase e vai se expandindo por toda a extensão destes até alcançar a anáfase em que é rapidamente desfosforilada (Hendzel et al., 1997; Van Hooser et al; 1998; Sauvé et al., 1999; Cobb et al, 1999a, b; Manzanero et al, 2000; Teperek-Tkacz et al, 2010), esse processo sugere que essa modificação seja essencial para a transição metáfase-anáfase (Sotero-Caio et al, 2011).

Dentre as modificações de histonas, a fosforilação reversível da histona H3 tem sido amplamente investigada e parece ser um fenômeno altamente conservado, ocorrendo em todos os eucariotos estudados até então (Prigent & Dimitrov, 2003). De maneira ampla, esta modificação tem sido implicada na condensação e segregação cromossômica, coesão de cromatídeos, assim como, também na regulação da expressão de diversos genes durante a interfase, supressão de interações entre proteínas de ligação e as caudas de histonas (Peters et al, 2003; Fischle et al, 2005; Fischle et al, 2008; Cerutti & Casas-Mollano, 2009; Hayashi-Takanaka et al, 2009; Wilkins et al, 2014; Yoshida et al, 2014; Kim et al, 2016).

Por desempenhar tais funções, H3S10ph é normalmente utilizada como um marcador de mitose (Cerutti & Casas- Mollano, 2009; Tang et al, 2012) e de condensação cromossômica (Van Hooser et al., 1998; Wilkins et al, 2014; Yoshida et al, 2014).

Esse processo tem sido também relacionado com algumas outras alterações de histonas, em especial a acetilação de H3K14 e a metilação de H3K4 e H3K9, alterações que parecem ser essenciais para que H3S10ph seja capaz de condensar cromossomos durante a mitose (Fischle et al, 2005; Hirota et al, 2005; Teperek-Tkacz et al, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que a fosforilação de histona H3 em Ser10 (H3S10ph) é crítica durante o processo de transformação neoplásica, uma vez que a expressão da proteína é elevada em células transformadas por oncogenes, e de maneira oposta é diminuta naquelas células em que está ocorrendo um processo de resposta ao dano do DNA (Graber et al, 1996; Chadee et al, 1999; Choi et al, 2005; Kim et al, 2008; Lee et al, 2011; Chen et al, 2016). Além disso, níveis aumentados de fosforilação de H3S10 resultantes da ação de uma sobre expressão de ARK2 é um fator precipitante da instabilidade cromossômica, podendo desempenhar um papel de destaque na carcinogênese (Adams et al, 2001; Espino et al, 2009). Trabalhos têm afirmado ainda que essa alteração pode ser um potencial alvo terapêutico no tratamento contra o câncer (Lee et al, 2011).

Mesmo diante de tais informações, o verdadeiro papel da fosforilação no resíduo de serina 10 que ocorre na histona H3 ainda permanece controverso (Teperek-Tkacz et al, 2010), principalmente quando tratamos de neoplasias de origem odontogênica, havendo assim, a necessidade, de estudos contínuos e aprofundados, na busca de desvendar tal papel.

## **PROPOSIÇÃO**

---

Baseado na revisão acima, considermos oportuno investigar a presença das modificações de histonas em tumores odontogênicos epiteliais com diferenciação ameloblastica, por meio de ensaio imuno-histoquímico, avaliando a presença de抗ígenos identificados com modificações gerais de histonas referentes as proteínas H3K9ac, H4K12ac, H3K36me3 e H3S10ph, verificando sua possível associação com sua patogenia e investigando a possibilidade de sua utilização como marcador de comportamento das lesões.

## 2.0 JUSTIFICATIVA

As alterações epigenéticas tem sido alvo de intensa pesquisa em cancerologia, em especial a metilação do DNA, envolvimento de miRNA e modificações globais de histonas na patogenia do câncer, seu significado para o diagnóstico e prognóstico dos tumores, e mesmo como possibilidade de inovação terapêutica. Tem sido evidenciado que estas alterações parecem estar entre as anormalidades mais comuns nas neoplasias humanas. Sua expressão tem sido observada na tumorigênese de pulmão, próstata, mama, rim, estômago, esôfago, fígado, pâncreas, vulva. Entretanto quando falamos em lesões do complexo bucomaxilofacial, observamos escassez de estudos, particularmente voltados ao papel das modificações de histonas no processo. Esses poucos estudos associam as modificações globais de histonas e/ou metilação do DNA com esse grupo de lesões, em amostra limitada de tumores. Todavia, estes estudos veem demonstrando possíveis associações entre anormalidades epigenéticas, em especial alterações nas histonas, e o aparecimento de neoplasias, além de relacionarem seus achados com preditivos de diagnóstico. Consequentemente, a avaliação do status e das alterações ligados às lesões do complexo bucomaxilofacial constitui-se em campo promissor de investigação. A revisão da literatura mostra ainda uma lacuna importante neste campo relativo a tumorigênese odontogênica. Neste sentido, o presente estudo trata a questão de forma exploratória, investigando a partir de técnica imuno-histoquímica, a expressão antigênica de um grupo limitado de alterações de histonas (H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph) em amostra de tumores odontogênicos benignos e malignos com evidência de diferenciação ameloblastica.

## **2.1 Hipóteses**

Considerando a metodologia de análise, levantamos as seguintes questões:

1. As modificações de histonas referentes aos antígenos H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph estão presentes nos tumores odontogênicos com diferenciação ameloblastica;
2. Consideramos que a patogenia das lesões malignas está vinculada a expressão diferenciada das modificações de histonas, comparativamente as benignas;
3. Consideramos a possibilidade de utilizar estes níveis de expressão diferenciada como um marcador diagnóstico diferencial entre o ameloblastoma e os carcinomas odontogênicos, em especial o carcinoma ameloblastico e o carcinoma odontogênico de células claras.
4. Acreditamos que as alterações de histonas em carcinomas odontogênicos estariam associadas com prognóstico desfavorável dos pacientes.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.3 OBJETIVO GERAL**

Identificar, por método imuno-histoquímico, a presença de antígenos identificados com modificações gerais de histonas referentes as proteínas, H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph, em amostras de tumores odontogênicos benignos e malignos, analisando sua relação com a tumorigênese odontogênica.

### **2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever e quantificar os padrões de reatividade imunoistoquímica de antígenos representativos das proteínas H3K9ac, H4K12ac, H3K36me3, H3S10ph na amostra de tumores odontogênicos composta por tumores benignos (Ameloblastoma, Tumor Odontogênico Adenomatóide, Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante e Ameloblastoma Adenóide) e malignos (Carcinoma Ameloblastico, Carcinoma

Odontogênico de Células Claras e Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas);

Analisar a existência de padrões diferenciados de reatividade imuno-histoquímica dos抗ígenos pesquisados entre os grupos de tumores odontogênicos benignos e malignos;

Analisar a existência de padrões diferenciados de reatividade imunohistoquímica dos抗ígenos pesquisados entre o ameloblastoma e o grupo de tumores malignos com diferenciação ameloblástica;

Analisar a existência de relação entre a reatividade para os抗ígenos pesquisados e os dados clínico-patológicos dos diferentes tumores investigados em busca de associações entre os padrões de comportamento biológico das lesões e o prognóstico da doença

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.0 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (CAAE: 52906815.7.0000.5152, parecer CEP-UFG #1.516.159, Anexo A).

#### **3.1 Casuística**

Para a execução do presente estudo, foi selecionada uma amostra de conveniência envolvendo grupos de tumores benignos e malignos, conformando um total de 48 tumores, assim categorizados: AME multicístico ( $n = 8$  casos); AAD ( $n = 4$  casos); TOA ( $n = 4$  casos); TOCC ( $n = 6$ ); TOEC ( $n = 5$  casos); CAME ( $n = 12$  casos); COCC ( $n = 6$  casos); COCF ( $n = 3$  casos). Todos esses tumores apresentam nas suas expressões histológicas células com diferenciação ameloblastica ou morfologia que apresente semelhança com pré-ameloblastos, caracterizada pela presença de células semelhantes aos pré-ameloblastos ou que se confundam morfologicamente com ela. Como critério de inclusão, consideramos: dados clinicopatológicos completos; presença de tecido tumoral em quantidade adequada que permitisse o experimento e ainda preservasse um resíduo que permitisse revisão de diagnóstico quando necessário. Os critérios de exclusão foram os casos em que não havia dados clinicopatológicos completos, e quando não havia presença de tecido tumoral suficiente para o experimento e nem permitisse revisão de diagnóstico quando necessário.

Todos os casos tiveram seus diagnósticos histopatológicos revisados a partir das lâminas histológicas originais, coradas pelo método de rotina (hematoxilina e eosina) empregado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Esta revisão foi realizada considerando os parâmetros histológicos descritos na última classificação dos tumores odontogênicos idealizada pela OMS (Barnes et al, 2005).

A caracterização clinicodemográfica da amostra da amostra foram considerados os seguintes parâmetros: idade, sexo e cor da pele dos pacientes; sitio primário e localização das lesões; presença de metástases e sua localização

para os tumores malignos; e o estado atual do paciente (*vivo versus óbito*), baseado nos dados de sua última consulta.

### **3.2 Ensaios Imunoistoquímicos**

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados sobre cortes histológicos de 3um, a partir dos blocos de parafina selecionados das lesões, depositados em lâminas de vidro polarizadas StarFrost® (Knittel, Alemanha). Nossos ensaios imunoistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório Integrado de Biologia e Patologia Oral (LIBIPO), abaixo descrito.

Inicialmente, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol (Synth, São Paulo, SP, Brasil), de 60 minutos, respectivamente, ambos a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em soluções decrescentes de etanol: dois banhos a 100%, um a 95% e um a 80%, por cinco minutos cada um. Para a remoção do pigmento formólico, usou-se solução de hidróxido de amônio a 10% (Synth) em etanol a 95%, em banho de 10 minutos, seguidos de sete lavagens em água destilada.

O processo de recuperação antigênica foi realizado com os cortes imersos em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Amresco, Solon, OH, EUA), a 1,0mM, tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em um ciclo de 15 minutos à temperatura de 110º C, em câmara termopressurizada (Steamer – Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Após resfriamento por 40 minutos, os cortes foram submetidos a cinco banhos de água destilada.

O bloqueio da atividade endógena de biotina foi realizado imergindo os cortes por 15 minutos à temperatura ambiente em solução feita com duas claras de ovo dissolvidas em 200mL de água deionizada e filtrada por três vezes em gaze, seguido de 10 banhos em água destilada. Para o bloqueio da atividade endógena de avidina, os cortes foram imersos por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de 30g de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil, São Paulo, SP, Brasil) dissolvido em 180mL de água deionizada, seguido de dez banhos em água destilada (Miller, et al, 1999).

Para bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram submetidos a três banhos de 10 minutos cada em solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, SP, Brasil) a 10 volumes, seguidos por cinco banhos em água destilada e três lavagens de cinco minutos cada uma em solução tampão tris hidroximetil-aminometano hidroclorídrico, 20nM pH 7,4 (Amresco). Cada banho foi feito a temperatura ambiente.

Os cortes foram então incubados, à temperatura ambiente, em solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (Background Snipper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 minutos. Em seguida, os anticorpos primários, diluídos em solução PBS-BSA na titulação previamente estabelecida em testes de padronização (Quadro 2), foram incubados e armazenados em câmara úmida por duas horas a temperatura ambiente. Todos os anticorpos utilizados foram fornecidos pela Abcam (Cambridge, Reino Unido). Para controle negativo omitiu-se os anticorpos primários na solução de PBS-BSA.

**Quadro 2.** Anticorpos utilizados para os ensaios imuno-histoquímicos

Anticorpo	Código	Fabricante	Diluição
H3K36me3	ab9050	ABCAM	1:5.000
H3K9ac	ab10812	ABCAM	1:2.000
H4K12ac	ab61238	ABCAM	1:10.000
H3S10ph	ab5176	ABCAM	1:500

Em seguida, os cortes foram desincubados e então, lavados em dois banhos de solução de Tris-HCl por dois minutos cada. Na sequência, os cortes foram incubados, por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com sistema de amplificação estreptavidina-biotina-peroxidase (Trekkie Universal Link, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) que consiste em solução de anticorpo secundário biotinilado. Depois, os cortes foram lavados por dois banhos de dois minutos cada um em solução de Tris-HCl.

Posteriormente, os cortes foram incubados em complexo terciário a base de estreptavidina conjugada a peroxidase (Trekkie Avidin-HRP Label, Biocare Medical) por dez minutos em câmara úmida à temperatura ambiente; após esse

processo, os mesmos foram submetidos a duas lavagens de dois minutos em tampão Tris-HCl.

O processo de revelação da reação foi feito utilizando-se substrato cromogênico 3.3'tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (Betazoid DAB Chromogen Solution, Biocare Medical) por cinco minutos, seguido por lavagem em água corrente durante cinco minutos.

As lâminas foram então contracoradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas em solução de etanol 100% por 10 minutos, secas em estufa a 60C e montadas com lamínulas de vidro em resina histológica (Permount, Fisher Scientific International, Pittsburgh PA, EUA).

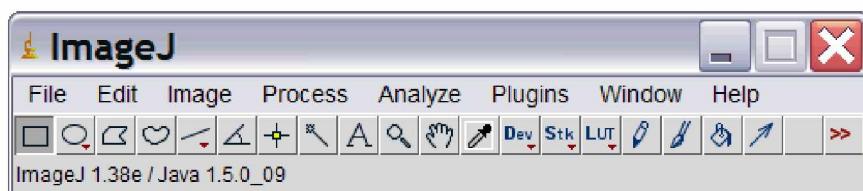
### **3.3 Análise da reatividade imunoistoquímica**

Para proceder a análise das reações imuno-histoquímica de cada um dos anticorpos empregados, foi utilizado o *software* ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, versão 1.38e/Java 1.5.0\_09) através da ferramenta que avalia o índice de absorbância (IOD) da imagem.

Inicialmente, as lâminas de cada caso/anticorpo foram escaneadas, usando o Slide Scanner Aperio AT2 (Leica Biosystem Imaging, Inc., Nussloch, Germany) no aumento de 400x, acoplado a um computador com tela de 15 polegadas. Para cada caso, o “hotspot” da marcação obtida foi capturado. A partir deste, foi então submetida a avaliação através do ImageJ (Jensen et al, 2013).

### **3.4. Calibração do ImageJ**

Para calibração do ImageJ, utilizou-se o protocolo disponível no site [www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov). e auxílio do Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes (ICBIM/UFU). Assim, realizou-se a calibração de distância (Analyze – Set Scale – 316 pixels – 50 - unidade 1 $\mu$ m – global), da escala de cinza (Image – Type – 8bit) e, por fim, do IOD (Analyze – Calibrate – inserção dos valores pré-definidos – Rodbard – IOD) (Figura 1, 2 e 3).



**Figura 1.** Tela Inicial do Image J (Fonte: rsb.info.nih.gov)



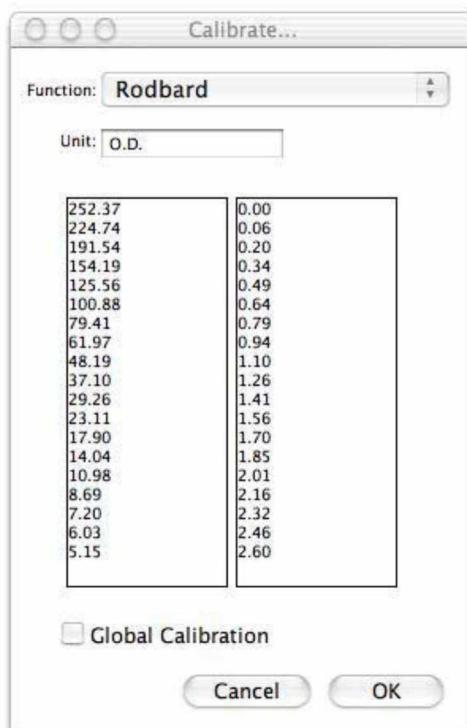
**Figura 2.** Régua usada para calibrar a distância. Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>

O primeiro passo na calibração é estabelecer a media dos valores de cinza usando uma barra contendo 21 *steps* com densidade variando de 0,05 a 3,05 (Figura 3). Para isso, mediu-se os primeiros 18 *steps* porque os três últimos são indistinguíveis e o ImageJ se limita a 20 medições. Para medir os 18 *steps*, desenhou-se um retângulo amarelo tal que a sua área não sobrepusesse a área imediatamente ao lado e o mesmo era movimentado da esquerda para a direita e a densidade de cinza registrada (Figura 3). Para distinguir os últimos *steps* da barra de cinza, o contraste era aumentado usando o menu *LUT* do ImageJ.



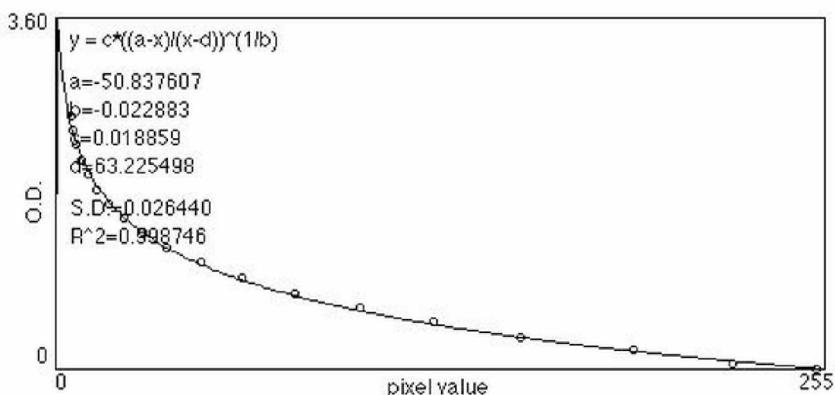
**Figura 3.** Barra de calibração da Kodak nº3 usado para calibração do ImageJ. O retângulo em amarelo indica a área de cada passo com sua respectiva densidade óptica. Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>

Após a determinação dos valores correspondentes a cada densidade de cinza, estes eram automaticamente colocados na janela de Calibração, e a função *Rodbard* a unidade *IOD* selecionadas (Figura 4) para estabelecer a curva de calibração em que relaciona valor de pixel e IOD através de uma curva exponencial (Figura 5).



**Figura 4.** Valores determinados a partir da escala de cinza.

Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>



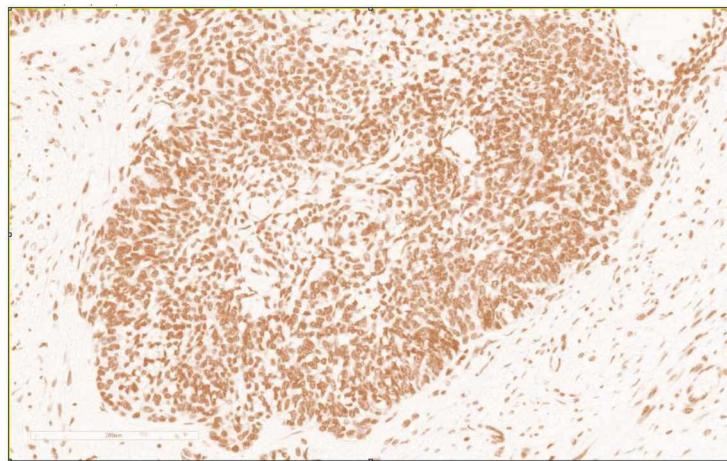
**Figura 5.** Curva de calibração.

Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>

### 3.5 Índice de Absorbância (IOD)

Para a determinação dos IOD, foi necessário analisar a área total do *hotspot* (Figura 6) fotografado, local em que esse índice deveria ser medido pelo ImageJ. Estabeleceu-se como critério um mínimo de 30% de intensidade de IOD para ser analisado, tendo em vista protocolo do programa disponível no site [www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov). Imagens que obtiveram valores superiores à média de IOD do controle para o anticorpo analisado foram considerados de alta marcação,

enquanto que aquelas que apresentavam valores inferiores à média de IOD foram considerados de baixa marcação (Anexo 2). Juntamente com a análise do IOD o software fornece ainda o valor da área total de marcação.



**Figura 6.** Hotspot fotografado evidenciando área total de marcação (linha amarela contornando a imagem).

### 3.6 Análise estatística

Para definição de qual teste estatístico a ser empregado em cada análise, utilizou-se previamente o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para dados com distribuição normal, foram empregados os testes ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, e Test *t* de Student para comparações de dois grupos. Para os dados não normais empregou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, para múltiplas comparações e teste de *U* Mann-Whitney, para comparações entre dois grupos. Análise de associação foram realizadas pelos testes do Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Para estes testes as tabelas de contingência consideraram níveis alto e baixo de IOD e as seguintes categorias para os dados clínico patológicos dos tumores estudados: tumores benignos e malignos; localização (mandíbula e maxila); metástases (presentes e ausentes); recorrências (presente e ausente) e estado atual do paciente (óbito e vivo). A significância estatística foi identificada para as análises em que os valores de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, EUA).

## **RESULTADOS**

---

## 4.0 RESULTADOS

As características demográficas e clínicas dos pacientes são sumarizadas na **Tabela 1**.

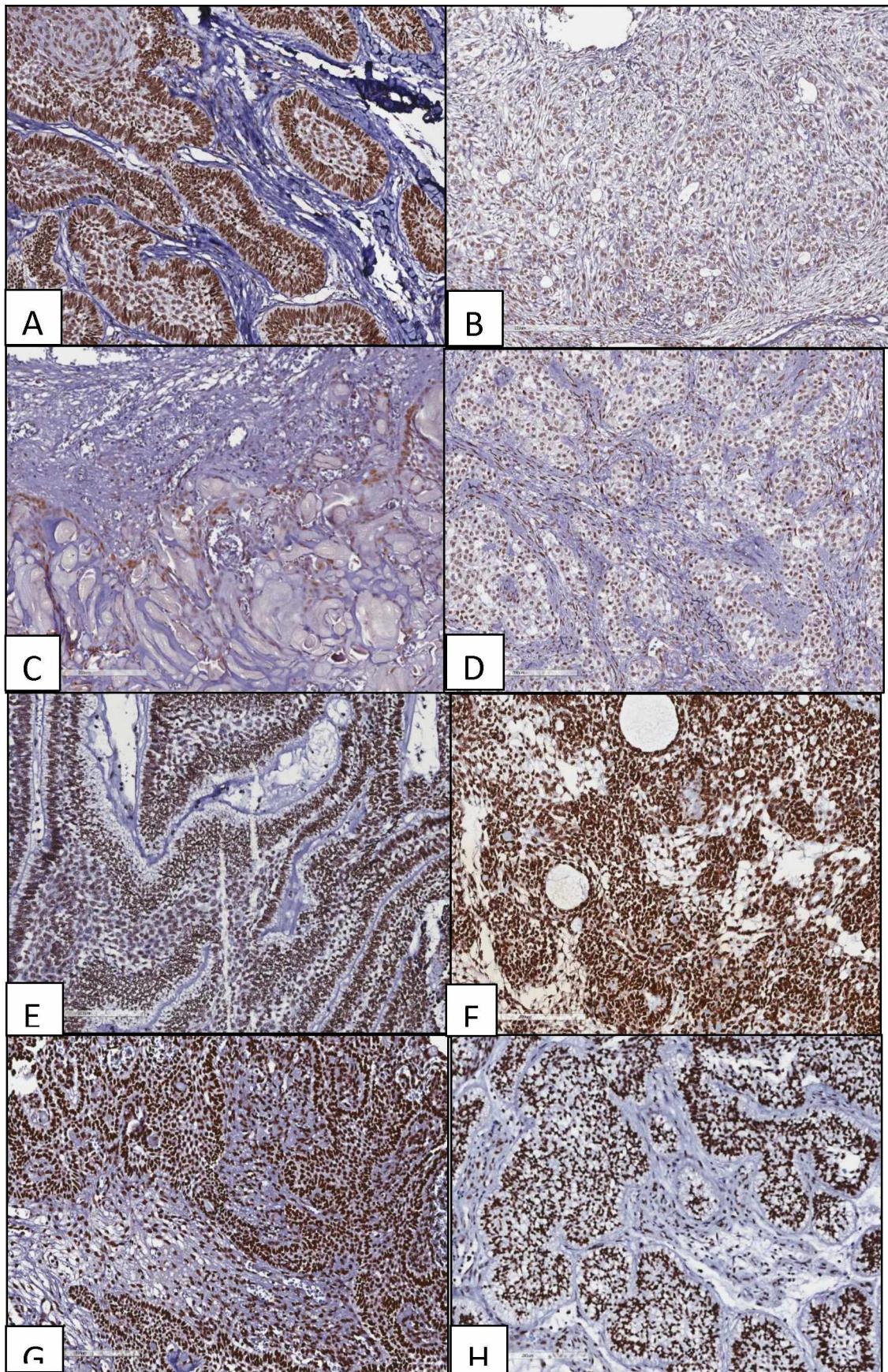
**Tabela 1.** Características demográficas e clínicas dos pacientes estudados por esse projeto.

Variável		AME <sup>1</sup>	TOA <sup>2</sup>	TOEC <sup>3</sup>	TOCC <sup>4</sup>	AAD <sup>5</sup>	CAME <sup>6</sup>	COCC <sup>7</sup>	COCF <sup>8</sup>
<b>Gênero</b>									
	Masculino	5 (62,5%)	4 (100%)	2 (40%)	3 (50%)	2 (50%)	8 (66,7%)	4 (66,7%)	3 (100%)
	Feminino	3 (37,5%)	0 (0%)	3 (60%)	3 (50%)	2 (50%)	4 (33,3%)	2 (33,3%)	0 (0%)
<b>Idade</b>	Média ± DP <sup>9</sup>	37,9±19,1	12,5±1,3	38,5±12,2	35,7±20,6	43,3±11,4	45,4±17,6	44,8±17,6	47±17,3
	Variação	11-63	9-14	21-70	13-66	33-55	21-71	20-55	27-57
<b>Cor/raça</b>									
	Branca	2 (25%)	2 (50%)	4 (80%)	2 (33,3%)	2 (50%)	6 (50%)	3 (50%)	2 (75%)
	Não Branca (Preto, pardo)	3 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	2 (50%)	6 (50%)	3 (50%)	1 (25%)
	Desconhecido (não informado)	3 (37,5%)	2 (50%)	1 (20%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Localização</b>									
	Mandíbula	6 (75%)	1 (25%)	4 (80%)	2 (33,3%)	1 (25%)	11 (91,6%)	4 (66,7%)	2 (66,7%)
	Maxila	2 (25%)	3 (75%)	1 (20%)	2 (33,3%)	3 (75%)	1 (8,4%)	2 (33,3%)	1 (33,3%)
	Desconhecido (não informado)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Tamanho (cm)</b>	Média ± DP	2,5±1,8	1,5±0,7	5±0,8	5,6±4,8	4,5±2,1	9,7±5,6	6,4±2,3	2,3±1,2
	Variação	0,5-5	1-2	4-6	0,8-13	3-6	2-20	4,5-10	1-3
<b>Metastases</b>									
	Presente	—	—	—	—	—	3 (25%)	2 (33,3%)	0 (0%)
	Ausente	—	—	—	—	—	9 (75%)	4 (66,7%)	3 (100%)
<b>Tratamento</b>									
	Cirúrgico	8 (100%)	4 (100%)	5 (100%)	6 (100%)	4 (100%)	12 (100%)	6 (100%)	3 (100%)
	Radioterapia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (30%)	2 (16%)	1 (16%)	1 (33,3%)
	Quimioterapia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (70%)	0 (0%)	1 (16%)	0 (0%)
	Radio e Quimioterapia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33,3%)	0 (0%)
<b>Sintomatologia</b>									
	Sintomáticos	2 (25%)	4 (100%)	5 (100%)	3 (50%)	4 (100%)	8 (77%)	2 (83%)	2 (77%)
	Assintomáticos	6 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33%)
	Desconhecido (não informado)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	4 (33%)	1 (17%)	0 (0%)
<b>Tempo de doença</b>	Média ± DP	38,6±49,6	24	22,5±12,3	8,7±2,2	57,5±20,5	53,2±64,1	7±4,5	25±30,6
	Variação	8-96	—	6-36	7-12	43-72	2-180	3-12dez	3-60
	Vivos	—	—	—	—	4 (100%)	4 (33,3%)	3 (50%)	1 (33,4%)
	Óbitos	—	—	—	—	0 (0%)	4 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (66,6%)

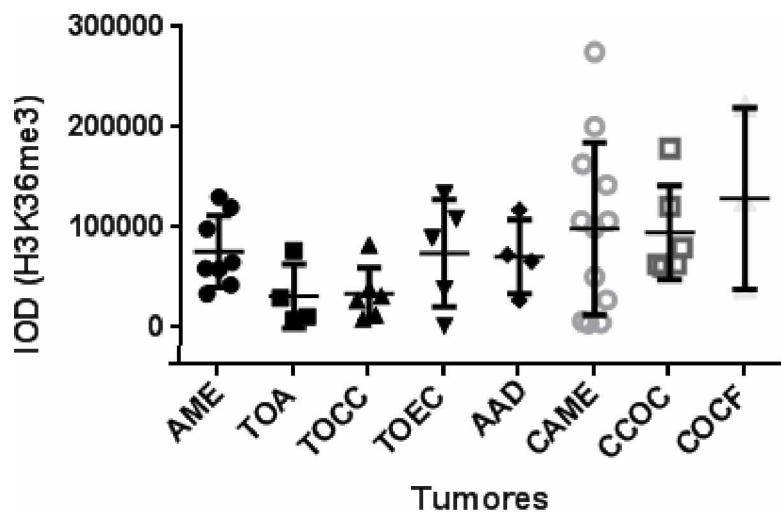
**Tabela 1.** 1.AME: ameloblastoma; 2.TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide; 3.TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; 4.TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; 5. AAD: Ameloblastoma Adenóide; 6.CAME: Carcinoma Ameloblastico; 7.COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras; 8.COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas; 9. DP- desvio padrão.

Em relação a avaliação realizada para H3K36me3, observou-se que o antígeno foi identificado na maioria das amostras malignas e benignas estudadas.

H3K36me3, em todos os grupos de tumores malignos, observou-se prevalência de IOD alto, ou seja, com uma forte marcação, cujos valores de medianas para cada lesão foram: CAME (102706,9), COCC (71637,2) e COCF (126538,5). Fato que se repete para o AME (61969,3), TOEC (89444,1) e AAD (69293,6) no grupo de lesões benignas (Figura 7). Não foi identificada diferença estatística significativa nos índices de IOD entre os diferentes tipos de tumores, para H3K36me3 (Figura 8).



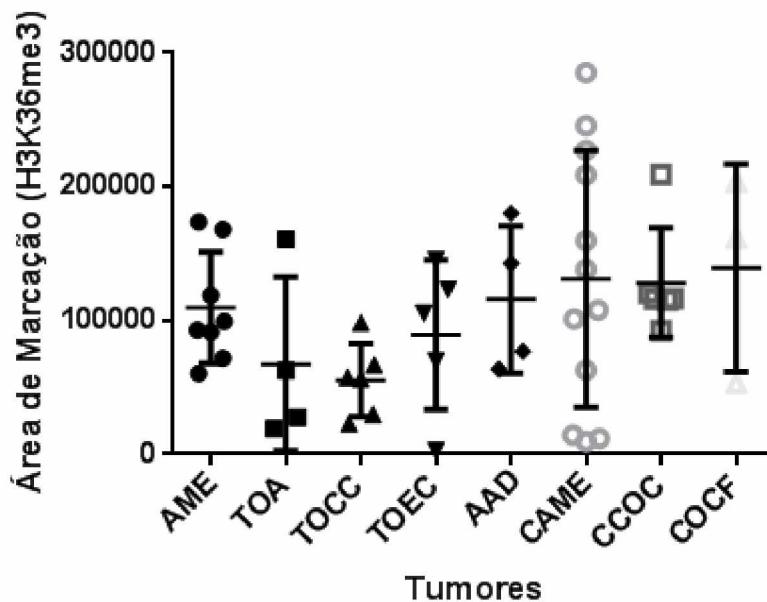
**Figura 7.** Reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 em diferentes tumores odontogênicos estudados. Observa-se maior reatividade nos tumores malignos comparativamente aos tumores benignos. (A): Ameloblastoma; (B): Tumor Odontogênico adenomatóide; (C): Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; (D): Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; (E): Ameloblastoma Adenóide; (F): Carcinoma Amelobástico; (G): Carcinoma Odontogênico de Células Claras; (H): Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Em todas as figuras a ampliação original foi de 200x, técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.



**Figura 8.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) observadas, segundo a reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma; TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide; TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; AAD: Ameloblastoma Adenóide; CAME: Carcinoma Amelobástico; COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras; COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Barras centrais correspondem à mediana (Teste de ANOVA,  $p = 0,2139$ ).

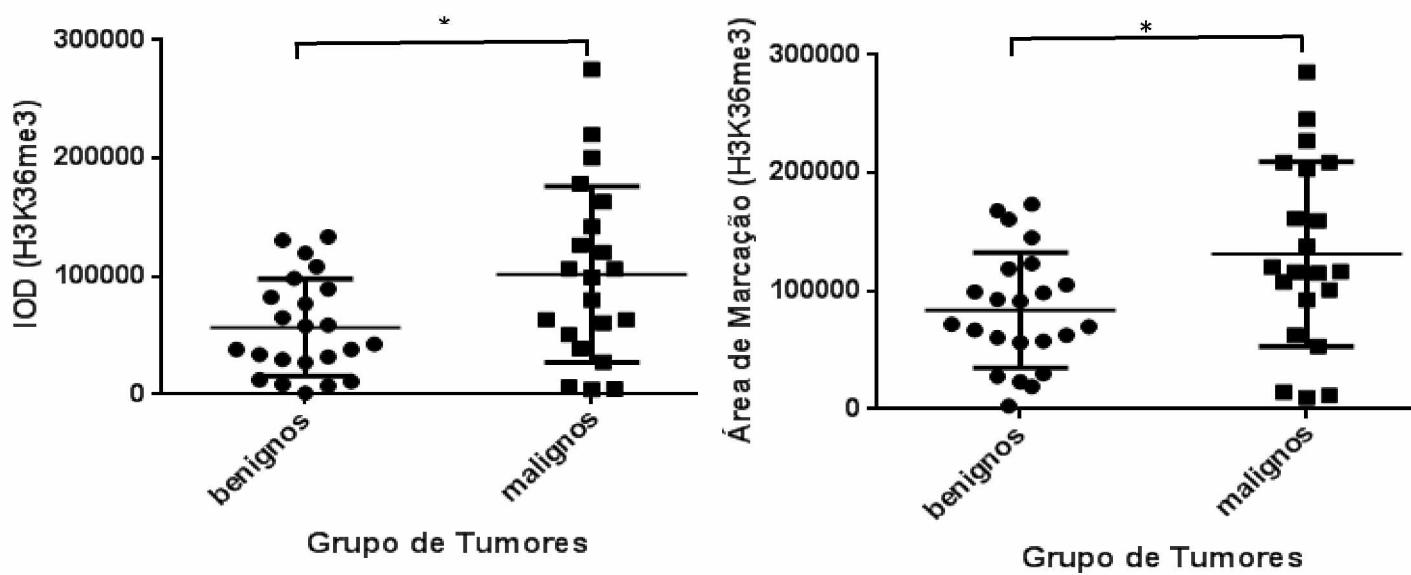
Os valores das áreas de reatividade para H3K36me3 foram semelhantes para todos os tumores malignos, sendo maiores que os benignos. Chama a atenção que, entre os tumores benignos, o AME (mediana=96113,6) e o AAD (mediana= 109692,4) tiveram os maiores valores de áreas marcadas. Não

obstante, nenhuma diferença estatística foi observada entre os tumores estudados (Figura 9).



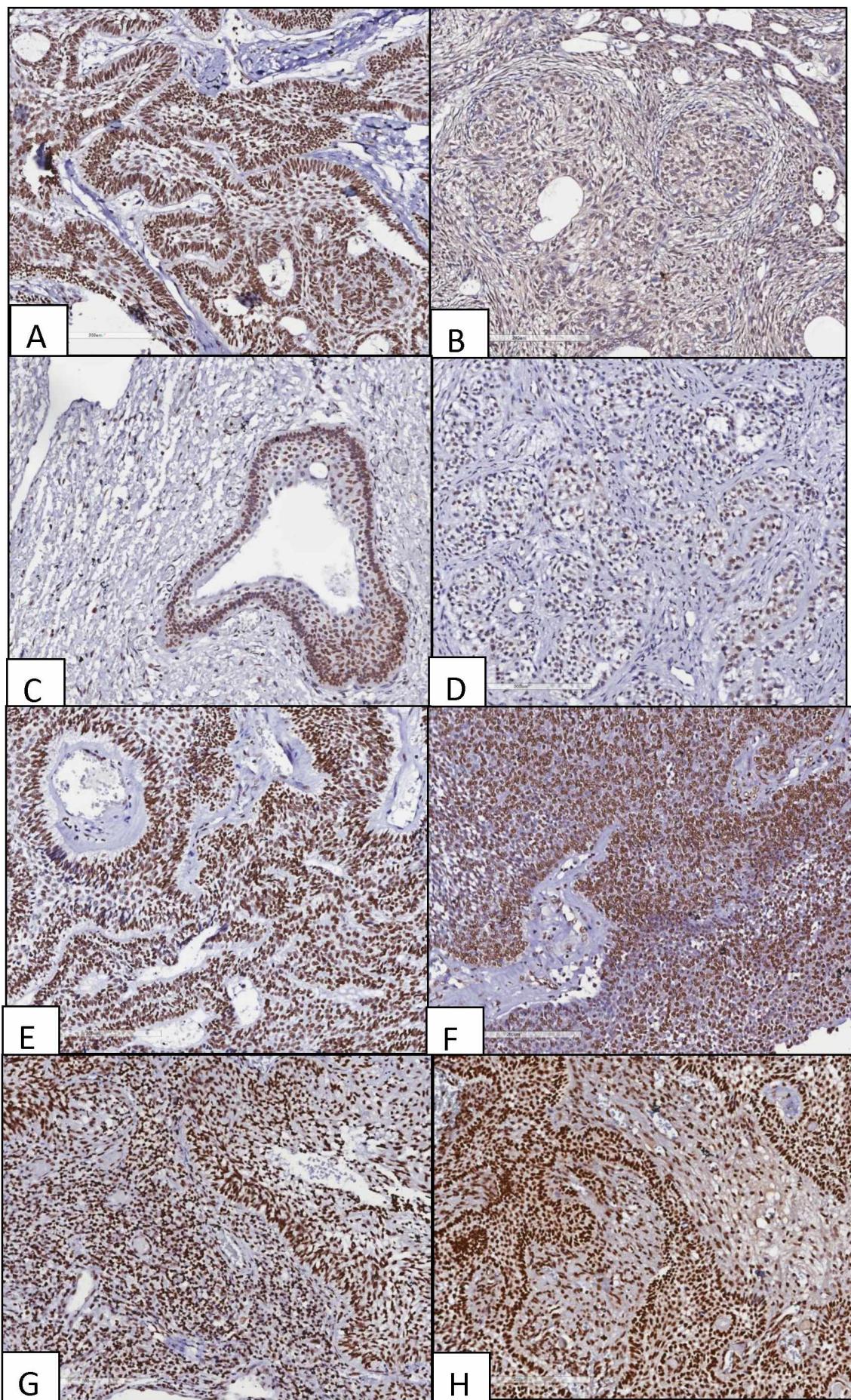
**Figura 9.** Distribuição dos da área total de reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Barras centrais correspondem à mediana. (Teste de ANOVA,  $p = 0,047$ ).

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores de IOD ( $p=0,016$ ) e de área total de reatividade ( $p=0,0185$ ) entre os tumores benignos e malignos analisados como grupos distintos (Figura 10). Tanto os valores de IOD como aqueles relativos a área de reatividade mostraram-se maiores para os tumores malignos em relação aos tumores benignos.

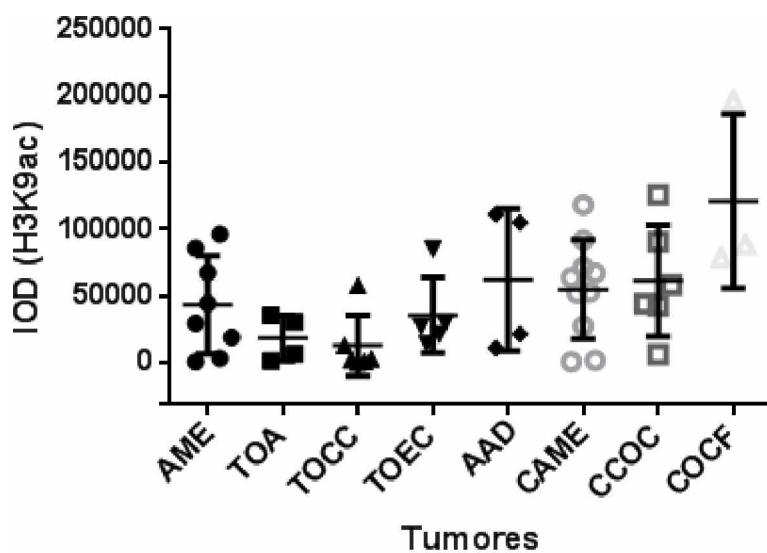


**Figura 10.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) (A) e de área total de reatividade (B) para os tumores benignos e malignos relativos à histona H3K36me3. Barras centrais correspondem à mediana (A:  $p = 0,0185$ ; B:  $p = 0,016$ , Teste  $t$  de Student).

Reatividade imunoistoquímica para H3K9ac foi identificada na maioria das amostras de tumores malignos, e benignos. Em todos os tipos de tumores malignos que foram submetidos a avaliação para H3K9ac, houve prevalência de alta marcação. Esta reatividade foi mais alta nos malignos comparativamente aos benignos. Para estes, houve uma prevalência de baixa marcação, exceto para AAD (mediana= 63429,5) e AME (mediana= 37099,1). Neste caso, o IOD para AAD foi maior que a do AME e superior as do CAME (mediana= 36967,1) e do COCC (mediana= 51482,6) (Figura 11). Não obstante, não foi identificada diferença estatística significativa nos índices de IOD entre os diferentes tipos de tumores (Figura 12).



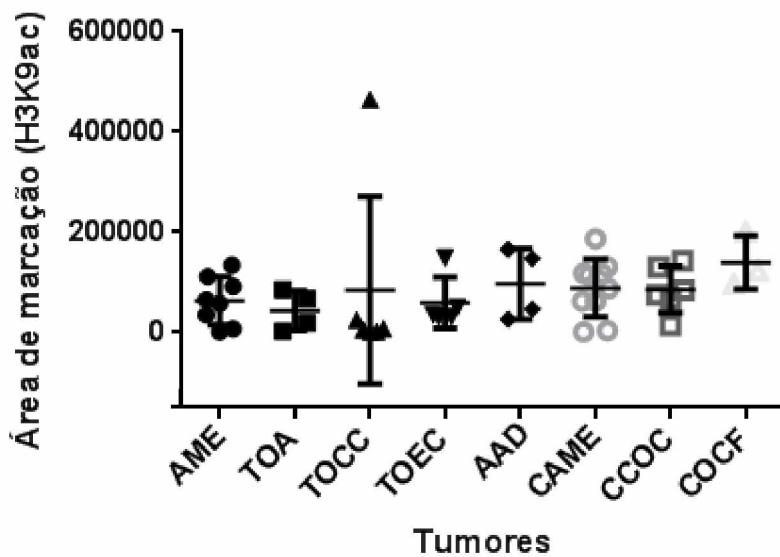
**Figura 11.** Reatividade imuno-histoquímica para H3K9ac em diferentes tumores odontogênicos estudados. Observa-se maior reatividade nos tumores malignos comparativamente aos tumores benignos. (A): Ameloblastoma; (B): Tumor Odontogênico adenomatóide; (C): Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; (D): Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; (E): Ameloblastoma Adenóide; (F): Carcinoma Amelobástico; (G): Carcinoma Odontogênico de Células Claras; (H): Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Em todas as figuras a ampliação original foi de 200x, técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.



**Figura 12.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) observadas, segundo a reatividade imuno-histoquímica para H3K9ac nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas, segundo IOD para H3K9ac. Barras centrais correspondem à mediana ( $p = 0,0549$ , Teste de Kruskal-Wallis).

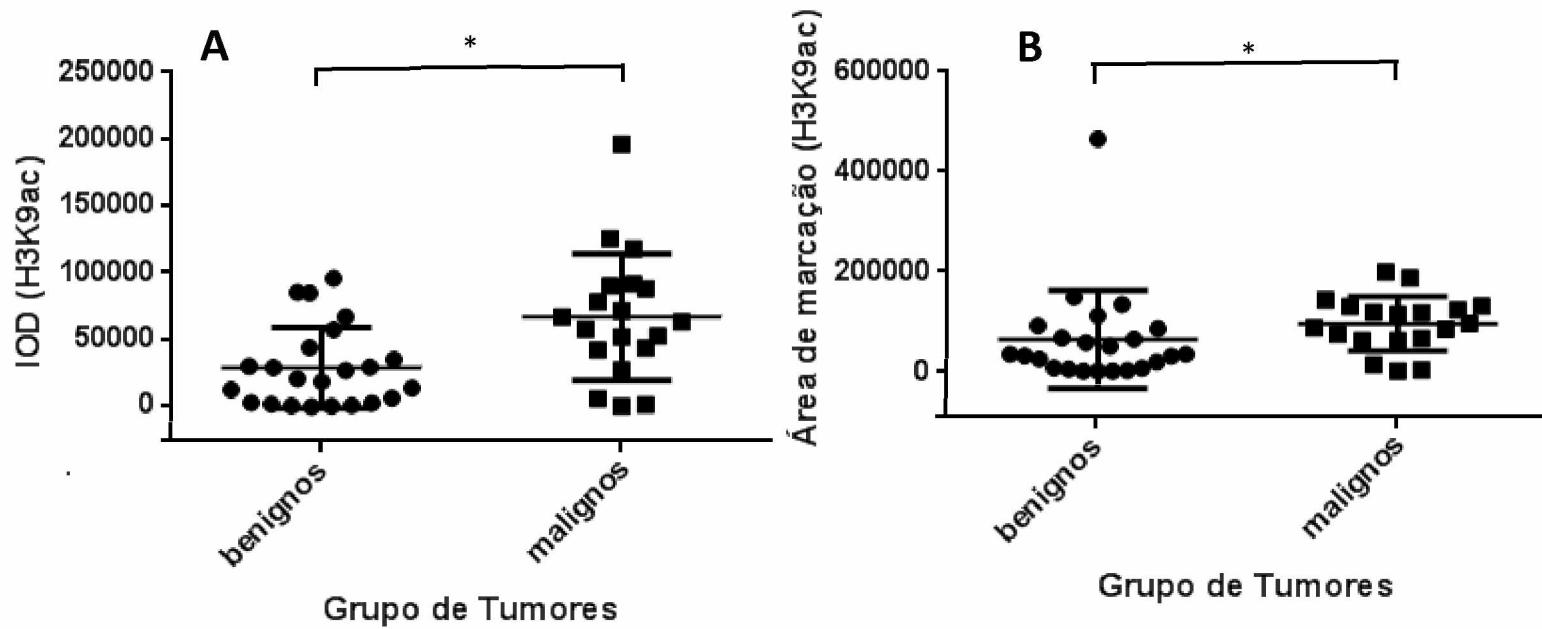
Analizando a área total de marcação observou-se que, em geral, os tumores malignos apresentavam maior área de reatividade, com o COCF (mediana = 123397,5), apresentando a maior área no grupo. Já para os tumores benignos, o AAD (mediana= 97377,14) e o TOCC (mediana= 63746,95) mostraram maiores áreas de reatividade, assemelhando-se aos tumores

malignos e superior as do AME convencional (mediana=61617,6). A menor reatividade foi observada para o TOA (mediana= 43342,3). Não obstante, não se identificou diferença estatística significativa entre os valores obtidos para os tumores estudados (Figura 13).



**Figura 13.** Distribuição da área total imuno-histoquímica para H3K9ac nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Barras centrais correspondem à mediana. ( $p = 0,2187$ , Teste de Kruskal-Wallis,).

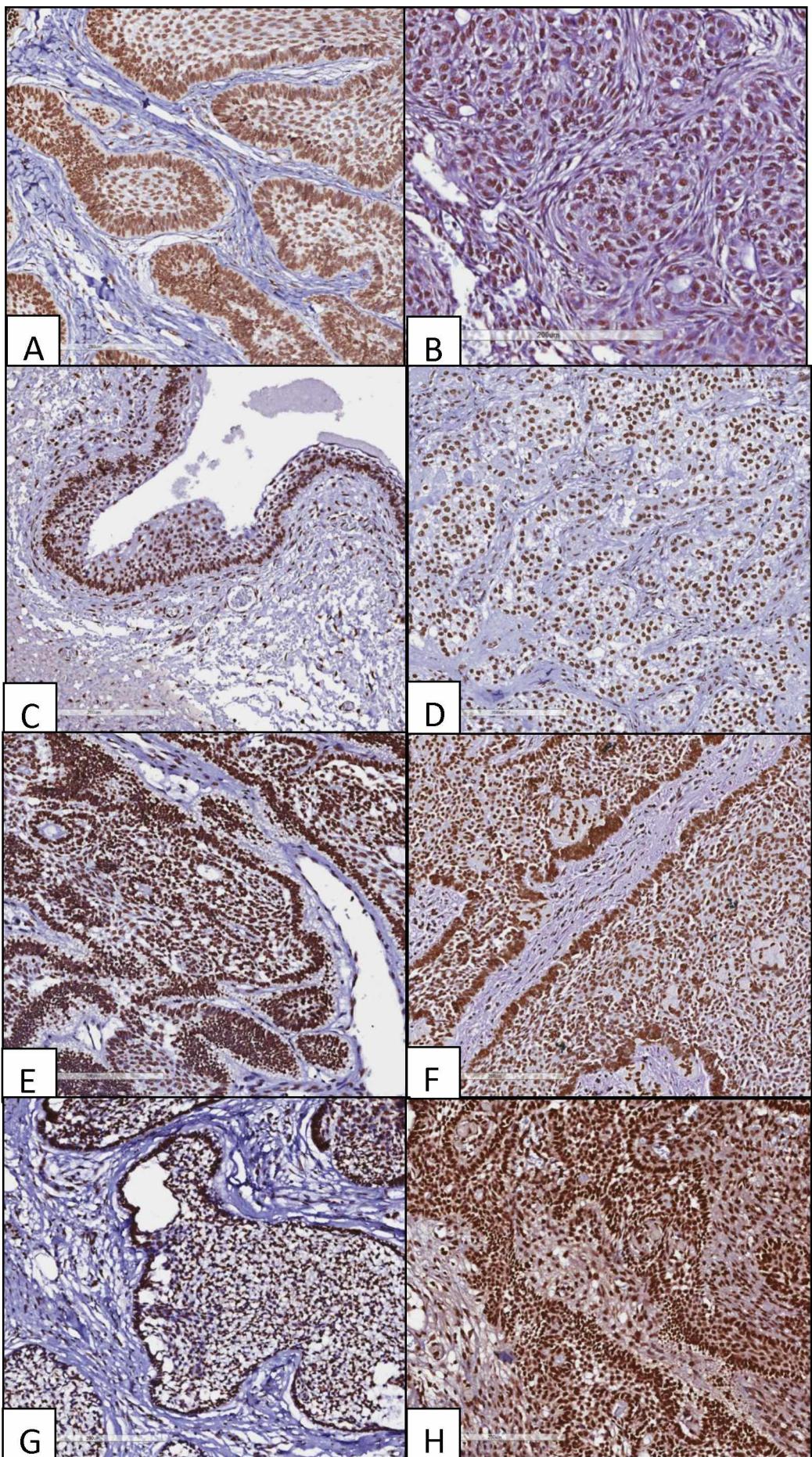
Ao fazermos a análise dessas mesmas variáveis (IOD e área total de marcação) contrapondo os benignos e malignos, observamos que houve diferença estatística significante entre os grupos quanto ao IOD ( $p=0,0050$ ), assim como também quanto a área total de marcação imunohistoquímica ( $p=0,0152$ ), conforme figura 14. Quando as análises foram realizadas comparando os tumores malignos como grupo ou isoladamente (CAME e COCC) com os AME, não foi possível identificar diferenças estatísticas significantes.



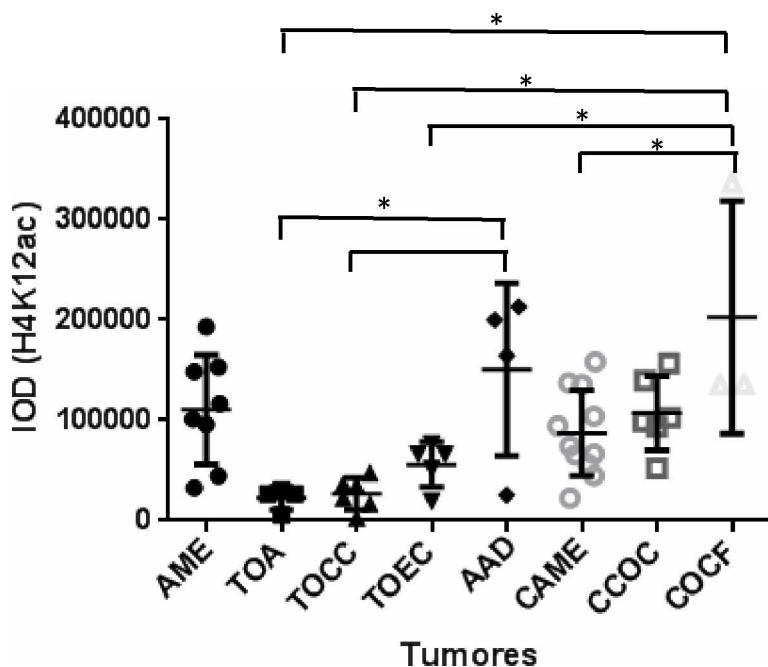
**Figura 14.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) (A) e de área total de reatividade (B) para os tumores benignos e malignos relativos à histona H3K9ac. Barras centrais correspondem à mediana (A:  $p = 0,0152$  e B:  $p = 0,0050$ , Teste de  $U$  Mann-Whitney).

Neste trabalho, a maioria dos tumores benignos e malignos mostraram reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac. Para este antígeno, a reatividade foi maior para os tumores malignos, comparativamente aos benignos (Figura 15).

Observou-se, também, que em todos os tipos de tumores malignos, houve prevalência de alto IOD: COCF (mediana=202674,3) mostrou maior índice, seguido de COCC (mediana=107280,3) e CAME (mediana=87295,4). Em relação aos tumores benignos, interessante, AAD (mediana=150771) e o AME (mediana=142138,8), mostraram IOD dentro do intervalo das medianas de IOD dos tumores malignos. Em relação as lesões benignas apenas TOA e TOEC apresentaram prevalência de baixo IOD, cujas medianas foram de 26731,88 e 66111,58, respectivamente. Os níveis de IOD para H4K12ac foram estatisticamente diferentes entre os diferentes tipos de tumores como ilustrado na Figura 16.



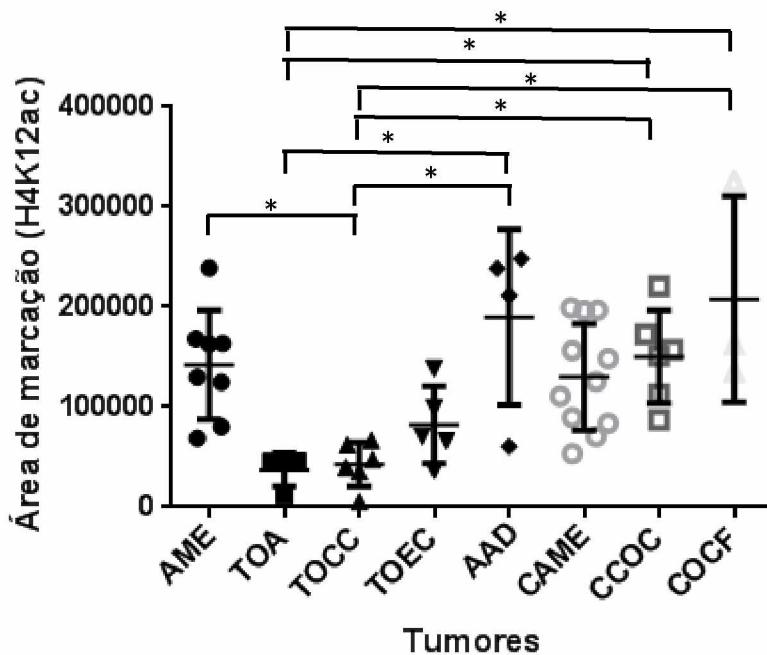
**Figura 15.** Reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac em diferentes tumores odontogênicos estudados. Observa-se maior reatividade nos tumores malignos comparativamente aos tumores benignos. (A): Ameloblastoma; (B): Tumor Odontogênico adenomatóide; (C): Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; (D): Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; (E): Ameloblastoma Adenóide; (F): Carcinoma Amelobástico; (G): Carcinoma Odontogênico de Células Claras; (H): Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Em todas as figuras a ampliação original foi de 200x, técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.



**Figura 16.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) observadas, segundo a reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas, segundo índice de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Barras centrais correspondem à mediana (Em todos os casos houve  $*p < 0,0001$ , para todas a análises estatisticamente significantes. Teste de ANOVA, com pós-teste de Tukey).

Os valores relativos a área total de marcação para H4K12ac seguiram hierarquicamente a mesma disposição encontrada para valores de IOD, com o

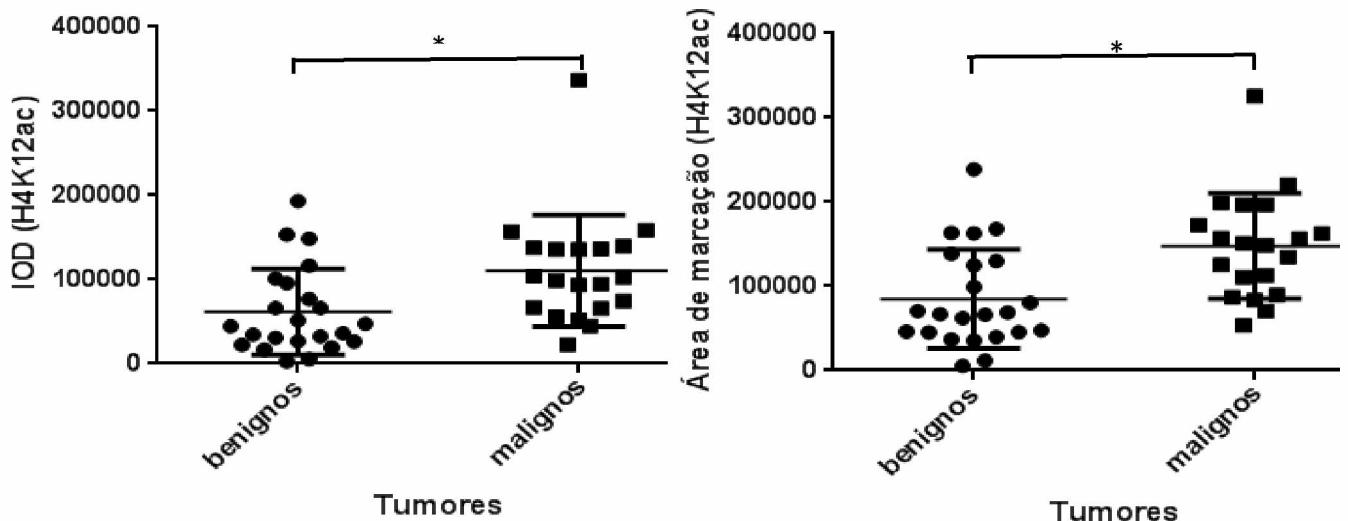
COCF mostrando a maior mediana de área marcada (207707,6). Chama a atenção, o fato de que entre os tumores benignos, AAD (mediana= 189738,3) e AME (mediana = 110681,5) terem mostrado valores de mediana dentro do intervalo daquelas obtidas para as neoplasias malignas. Nessa análise foram também identificadas diferenças estatísticas entre os tumores, em especial entre os malignos e os benignos de diferentes tipos (Figura 17).



**Figura 17.** Distribuição dos da área total imuno-histoquímica para H4K12ac nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Barras centrais correspondem à mediana. (Em todos os casos houve  $*p < 0,0001$  para todas a análises estatisticamente significantes, Teste de ANOVA, com pós-teste de Tukey).

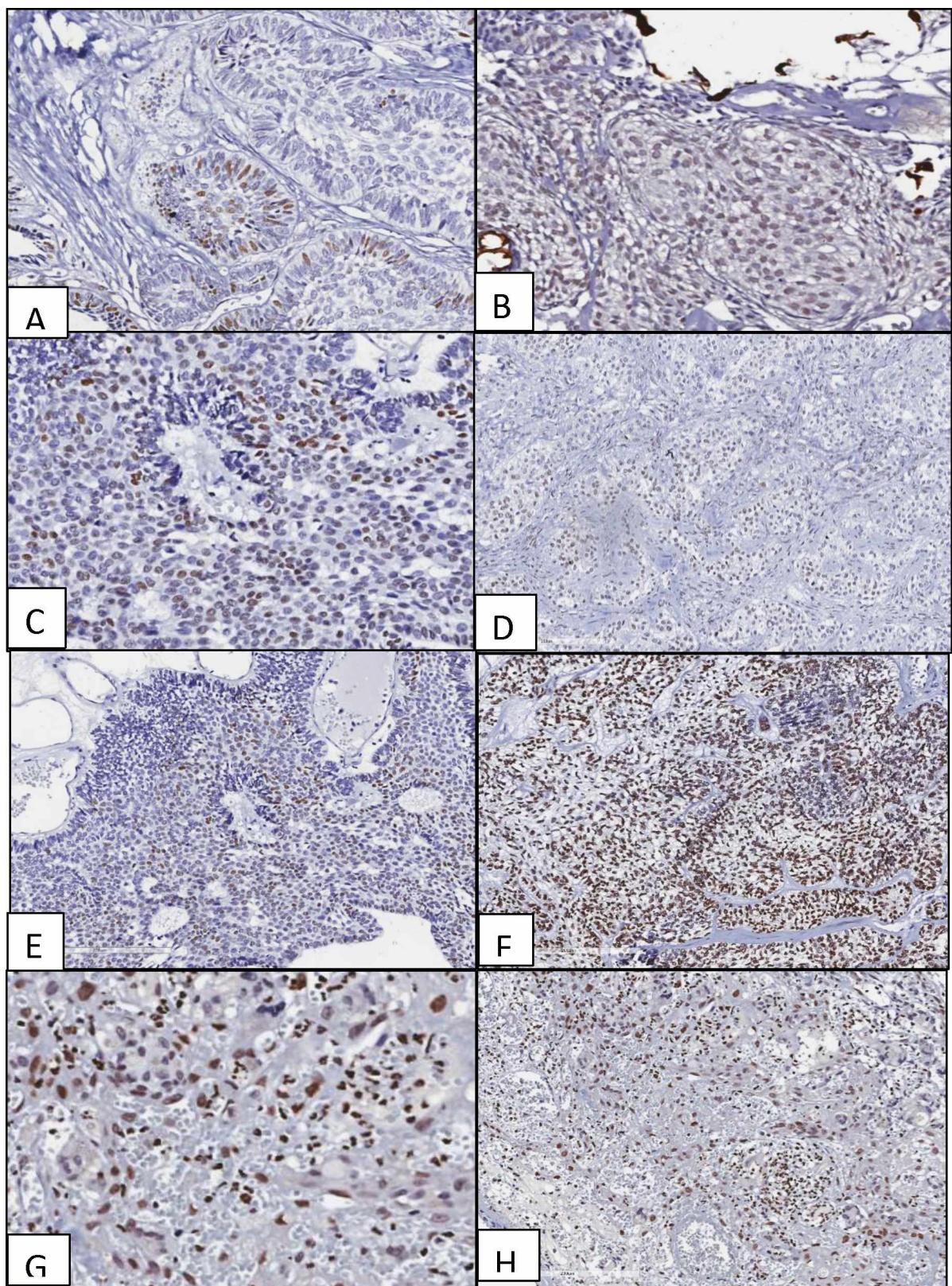
Ao fazermos a análise dessas mesmas variáveis (IOD e área total de marcação) contrapondo os benignos e malignos, observou-se que houve diferença estatística significante entre os grupos quanto ao índice IOD

( $p=0,0038$ ), assim como também quanto a área total de marcação imuno-histoquímica ( $p=0,0010$ ), conforme figura 18.



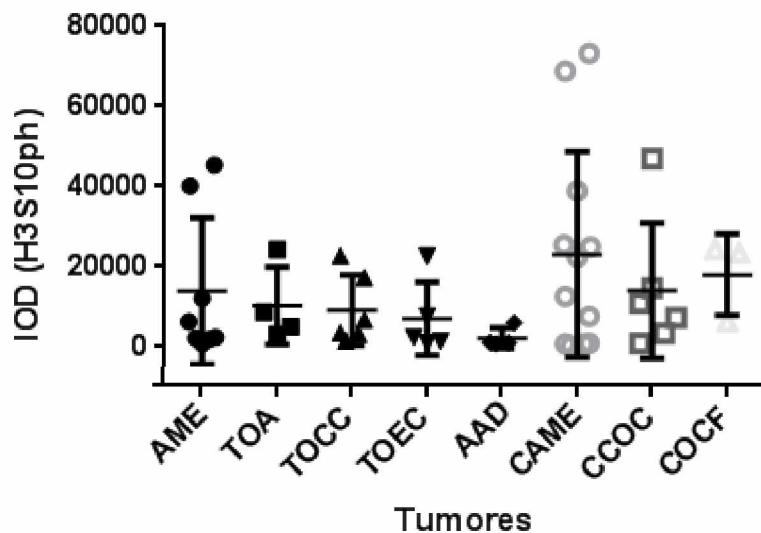
**Figura 18.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) (A) e de área total de reatividade (B) para os tumores benignos e malignos relativos à histona H4K12ac. Barras centrais correspondem à mediana (A:  $p = 0,0038$  e B:  $p = 0,0010$ , Teste  $U$  de Mann-Whitney).

Em relação a H3S10ph (Figura 19), pôde-se também observar que a reatividade imuno-histoquímica ocorreu na maioria dos tumores estudados, tanto malignos como benignos. Para ambos os grupos se identificou baixa IOD. Não obstante o baixo nível de expressão encontrado, as neoplasias malignas apresentaram IOD mais alto que aqueles obtidos para os tumores benignos. (COCF: mediana= 23410,4; CAME: mediana= 17490; COCC: mediana= 9083,7; AAD: mediana= 2240,4; TOA: mediana= 10274,5; TOEC: mediana= 7024,9; TOCC: mediana= 9201). Não foi identificada diferença estatística significativa entre os IOD dos diferentes tipos de tumor estudados (Figura 20).



**Figura 19.** Reatividade imuno-histoquímica para H3S10ph em diferentes tumores odontogênicos estudados. Observa-se maior reatividade nos tumores malignos comparativamente aos tumores benignos. (A): Ameloblastoma; (B): Tumor Odontogênico

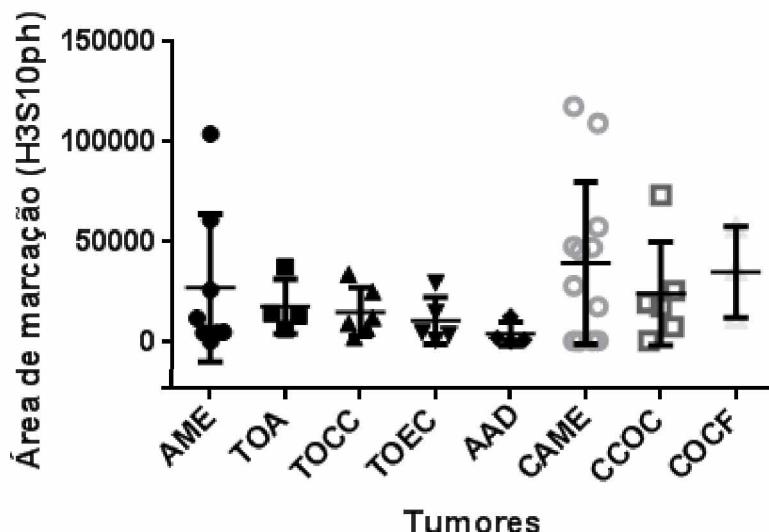
adenomatóide; (C): Tumor Odontogênico Cístico Calcificante; (D): Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante; (E): Ameloblastoma Adenóide; (F): Carcinoma Amelobástico; (G): Carcinoma Odontogênico de Células Claras; (H): Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Em todas as figuras a ampliação original foi de 200x, técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.



**Figura 20.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) resultantes da análise de reatividade imuno-histoquímica para H3S10ph, nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas, segundo IOD para H3S10ph. Barras centrais correspondem à mediana ( $p = 0,4706$  Teste de Kruskal-Wallis,).

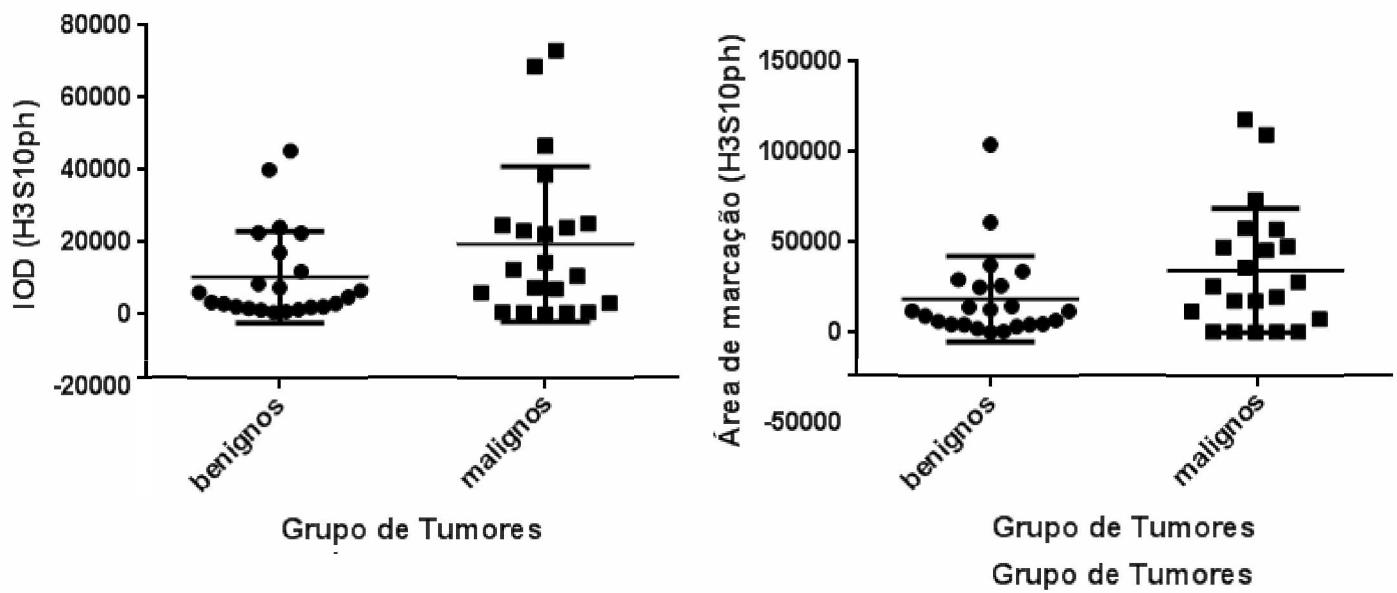
Quanto a área total de marcação para H3S10ph, entre os diferentes tipos de tumor estudados, foi observado que CAME (mediana= 36967,1) apresentou a maior área de marcação dentre o grupo de tumores malignos e que AME (mediana= 8538,1) se destacou frente ao grupo de tumores benignos, seguindo uma tendência já encontrada para a análise de IOD. Não foi identificada

diferença estatística significativa na avaliação das áreas totais de marcação entre os diferentes tipos de tumores. (Figura 21).



**Figura 21.** Distribuição dos da área total imuno-histoquímica para H3S10ph nos tumores odontogênicos estudados. AME: Ameloblastoma, TOA: Tumor Odontogênico Adenomatóide, TOCC: Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, TOEC: Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, AAD: Ameloblastoma Adenóide, CAME: Carcinoma Amelobástico, COCC: Carcinoma Odontogênico de Células Claras e COCF: Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas. Barras centrais correspondem à mediana ( $p = 0,4884$ , Teste de Kruskal-Wallis).

Ao se fazer a análise das variáveis IOD e área total de reatividade para H3S10ph, contrapondo os tumores benignos e malignos, observou-se que não houve diferença estatística significante entre os grupos quanto aos índices testados (IOD:  $p = 0,2228$ ; área total de reatividade:  $p = 0,1663$ ), conforme figura 22.



**Figura 22.** Distribuição dos valores de absorbância (IOD) (A) e de área total de reatividade (B) para os tumores benignos e malignos relativos à histona H3S10ph. Barras centrais correspondem à mediana (A:  $p = 0,1663$ ; B:  $p = 0,2228$ , respectivamente, Teste  $U$  de Mann-Whitney).

Os dados da associação da reatividade imunoistoquímica (baixa e alta) para pacientes portadores dos tumores estudados podem ser vistos na tabela 2. Foi observada correlação estatisticamente significante entre os grupos benignos e malignos para H4K12ac e H3K9ac. Acreditamos que não foi encontrada diferença estatística entre benignos e malignos para H3K36me3, pelo fato de que nos grupos de AME e AAD ter ocorrido uma alta marcação em praticamente todas as lesões.

**Tabela 2.** Associação entre variáveis relativas aos tumores e a reatividade imuno-histoquímica para as diferentes alterações de histonas estudadas.

Variáveis	H3K36me3		$p^3$	H3K9ac		$p$	H4K12ac		$p$	H3S10ph		$P$
	Alta <sup>1</sup>	Baixa <sup>2</sup>		Alta	Baixa		Alta	Baixa		Alta	baixa	
<b>Tumores</b>												
<i>Benignos</i>	14	13	0,084	8	19	0,001	17	10	0,046	2	25	0,6413
<i>Malignos</i>	16	5		16	4		18	2		3	18	
<b>Localização</b>												
<i>Mandíbula</i>	11	4	0,859	10	3	1,0	13	1	0,5211	2	13	0,5439
<i>Maxila</i>	5	1		5	1		5	1		2	4	
<b>Recorrências<sup>4</sup></b>												
<i>Sim</i>	11	3	0,785	10	4	0,5412	14	1	0,3137	2	14	1,0
<i>Não</i>	5	0		3	0		2	1		0	13	
<b>Metástases<sup>5</sup></b>												
<i>Sim</i>	4	1	1,0	3	1	1,0	5	0	1,0	1	4	1,0
<i>Não</i>	12	4		12	3		13	2		2	14	
<b>Estado atual do paciente</b>												
<i>Vivo</i>	9	2	1,0	9	1	0,25	11	0	0,1373	3	8	0,2281
<i>Óbito</i>	6	2		4	3		5	2		0	8	

1. Número de casos com IOD alta; 2. Número de casos com IOD baixa; 3. valor de  $p$  para a análise estatística de associação (Qui-quadrado e teste exato de Fisher); 4. Presença de recorrência, independentemente do número de episódios registrados; 5. Presença de metástases, independentemente de sua localização.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5.0 DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo estudar o perfil de expressão de histonas em amostras de tumores odontogênicos com diferenciação ameloblástica, benignos e malignos, coletados retrospectivamente a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

No grupo de lesões benignas estudadas, observamos que nos casos de AAD, não houve predileção por sexo e os pacientes acometidos apresentavam idade média de 43,3 anos. AME se fez mais presente em homens com idade média de 37,9 anos. O TOA seguiu a mesma prevalência em indivíduos do sexo masculino, apresentando uma idade média de 12,5 anos. Em nossa amostra o TOEC acometeu principalmente as mulheres com idade média de 38,5 anos de idade. Já o TOCC não apresentou predileção por sexo, atingindo idade média de acometimento de 35,7 anos. De forma geral, esses achados, exceto aqueles relacionados a sexo do TOA, são similares ao observado por outros estudos utilizando esses tumores (Handschel et al, 2005; Reyes et al, 2007; Fregnani et al, 2010; Angiero et al, 2013; Lin et al, 2013; Rani et al, 2016).

Como observado, a maioria de pacientes acometidos por CAME era do sexo masculino, com a média de idade de 45,4 anos vida. No grupo de lesões diagnosticadas com COCF, observamos que todos os indivíduos acometidos eram do sexo masculino e com idade média de 47 anos. Todos esses achados vão de encontro aquilo que é trazido pela literatura acerca desses tumores (Takata, 2005; Fitzpatrick et al, 2015; Carreón-Burciaga et al, 2015; Loyola et al, 2015).

Com relação à cor da pele, a maioria dos casos foram diagnosticados indivíduos brancos, sendo que nos grupos de TOCC, AAD, CAME e COCC não houve predileção. Os sítios de maior acometimento desses tumores foram a região posterior da mandíbula principalmente para os casos de AME e CAME, e anterior de maxila, principalmente para os casos de AAD, dois sítios anatômicos que são classicamente acometidos (Handschel et al, 2005; Chindasombatjaroen et al, 2012; Kim et al, 2014; Martos-Fernández et al, 2014; Rani et al, 2016).

Esses tumores em alguns casos se expandiram para cavidade nasal, região parotídea e cordas vocais.

Tumoração foi a principal forma de apresentação das lesões malignas, sendo os principais sitomas relatados a dor, disfagia, sangramento e ulceração, indo de encontro aquilo que é relatado pela literatura (Ellis et al, 1986; Kim et al, 2014; Loyola et al, 2015; Fonseca et al, 2016). Já no grupo de lesões benignas, observou-se que a ausência de sintomatologia, o que está diretamente relacionado com aquilo que relata a literatura (Singh et al, 2011; Chindasombatjaroen et al, 2012; Rani et al, 2016).

O tempo de doença das lesões malignas variou de 2 a 156 meses, enquanto que nas lesões benignas observamos uma variação de 6-96 meses. A dificuldade dos pacientes em terem acesso a tratamento especializado também é um fator que concorre para o atraso no diagnóstico dos casos de lesões malignas. Toda essa falha no processo reduz muito as chances de cura dos pacientes e, no caso do Brasil, reflete o problema da Saúde Pública em todos os seus níveis: administrativo e profissional (Bonfante et al, 2014).

Em nossas amostras de tumores benignos, todos os pacientes foram tratados conforme a literatura, com enucleação e curetagem das lesões para TOCC e TOA, remoção da lesão com alguma margem de segurança para o TOEC, assim como também para o AME multicístico. Apenas um paciente portador de Ameloblastoma Adenóide foi submetido à radioterapia, cuja dose chegou a 1200cG (Rodrigues et al, 2003; Pereira et al, 2013; Sano et al, 2013; Kamal et al, 2014).

Já nas amostras de tumores malignos, a maioria dos pacientes foram tratados apenas de forma cirúrgica. Apenas um paciente acometido por Cacinoma Odontogênico de Células Fantasmas e um paciente acometido por Carcinoma Odontogênico de Células Claras foram submetidos à radioterapia após a cirurgia cujas doses máximas foram de 5000cG e 1600cG respectivamente. Quanto ao Carcinoma Ameloblástico, dois indivíduos foram submetidos à radioterapia, cuja dose máxima recebida foi de 6000cG. Apenas um paciente portador de COCC foi submetido a quimioterapia, o qual recebeu Taxol (294 mg) e Carboplatina (789 mg).

As abordagens realizadas para cada tipo de tumor vão de encontro aquilo preconizado pela literatura especializada, onde observa-se que a abordagem cirúrgica é o tratamento preconizado para os casos até então relatados (Zhu et al, 2012; Kishore et al, 2015; Loyola et al, 2015). O uso da terapia de radiação pós-operatório, com ou sem quimioterapia adjuvante é controversa, estando indicados apenas especialmente nos casos de tratamento paliativo, tendo em vista que radioterapia parece não apresentar grande efeito sobre essas lesões, em especial o CAME que parece ser radio resistente, assim como também a quimioterapia parece apresentar limitados benefícios quanto ao tratamento desse grupo de lesões (Chera et al, 2008; Jensen et al, 2011; Zhu et al, 2012; Loyola et al, 2015).

Vale destacar que o acompanhamento após do término do tratamento deve ser prolongado, tendo em vista a falta de definição de um prognóstico, devido as ainda limitadas informações acerca desse grupo de tumores malignos (Casaroto et al, 2012).

As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas (Issa, 2008; Taby & Issa; 2010). Várias modificações epigenéticas têm sido relatadas: metilação do DNA, modificações globais de histonas (principalmente, acetilação, fosforilação e metilação), sumoilação, presença de RNAs não codificantes, alterações físicas de posicionamento de nucleossomos e outros (Jones & Baylin, 2007; Taby & Issa, 2010).

Essas alterações parecem estar entre as anormalidades mais comuns nas neoplasias humanas. No que tange as modificações globais de histonas, observamos que sua expressão tem sido observada em várias lesões, tais como tumores de pulmão, próstata, mama, rim, estômago, fígado, pâncreas (Park et al, 2008; Manuyakorn et al, 2010; Ellinger et al, 2010; Ellinger et al, 2012; He et al, 2012; Behbahani et al, 2012; Song et al, 2012). Entretanto quando falamos em lesões do complexo bucomaxilofacial, observamos escassez de estudos. Consequentemente, a avaliação do status e das alterações ligados às lesões do complexo bucomaxilofacial é necessário e urgente.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, como dito no início do capítulo, demonstrar a existência de algumas modificações de histonas em amostras de tumores odontogênicos benignos (Ameloblastoma, Tumor

Odontogênico Adenomatóide, Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante, e Ameloblastoma Adenóide) e malignos (Carcinoma Ameloblastico, Carcinoma Odontogênico de Células Claras e Carcinoma Odontogênico de Células Fantasmas), ambos com diferenciação ameloblastica. Em busca de informações potencialmente úteis ao conhecimento do mecanismo de desenvolvimento e evolução das doenças de interesse, bem como ao seu diagnóstico.

Estudos com a avaliação das modificações de histonas em amostras de lesões odontogênicas são bastante limitados e os trabalhos publicados na literatura apresentam-se similares a este estudo em relação ao uso da técnica de imunoistoquímica e proposta de análise comparativa a diversos parâmetros clínico-patológicos (Kumamoto et al, 2001).

Não foram encontrados estudos referentes à avaliação das modificações globais de histonas nas lesões estudadas nesse projeto, ou seja, ainda não está elucidado o papel desses fenômenos na carcinogênese e progressão tumoral das lesões aqui trabalhadas, ou seja, esse estudo é inédito no que diz respeito ao estudo epigenético nessas lesões, especialmente quando fazemos referência à expressão de histonas.

Modificações globais das proteínas histonas, tem como objetivo modular as propriedades da cromatina, impactando de forma direta no estado celular, o que afeta o processo de diferenciação e o resultado de praticamente todos processos relacionados ao DNA nos eucariotos (Wagner & Carpenter, 2012).

É sabido que, a metilação de H3K36 tem sido amplamente associada a ativação da cromatina, assim como também com a repressão da transcrição, splicing alternativo, replicação e reparo do DNA, metilação do DNA além da transmissão de memória genética de pais para filhos durante o desenvolvimento (Wagner & Carpenter, 2012).

Diante dessas informações, os processos de repressão da transcrição e reparo do DNA, foram aqueles que em especial, motivaram o estudo da trimetilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36me3) por esse projeto (Wagner & Carpenter, 2012; Li et al, 2013; Fontebasso et al, 2013).

Essas duas supracitadas funções estão relacionadas aos chamados "leitores" de cromatina, que interagem com resíduos de lisina metilados (Luco et

al, 2010; Vermeulen et al, 2010; Li et al, 2013). Assim, de forma resumida, podemos afirmar que a trimetilação de H3K36, é necessária para recrutamento da chamada proteína *mismatch* (hMutS $\alpha$ ), através de interação com um domínio específico. Células com ausência ou má função de SETD2, que por consequência apresentam alteração de H3K36me3, exibem instabilidade de microssatélite e elevada freqüência de mutação espontânea (Li et al, 2013).

Tudo isso faz com que haja uma desregulação na expressão de alguns genes, facilitando dessa forma o desenvolvimento de cânceres (Zhao et al, 2009; Nimura et al, 2009; Kolasinska-Zwierz et al, 2009). Fatos esses que podem ser confirmados por evidências de alteração fenotípica de alguns tipos de cânceres, em que foram detectadas perda da função de H3K36me3 ou SETD2 (Ho et al, 2016).

Nas amostras analisadas, foi detectada maior reatividade de H3K36me3 em muitos casos de lesões malignas. Quando comparados de forma agrupada benignos *versus* malignos, observamos que aqui também houve maior IOD no grupo de lesões malignas. Apenas na comparação benignos *versus* malignos foi encontrada diferença estatística significante.

Ao avaliarmos a área total de marcação, observamos que novamente apenas a comparação benignos *versus* malignos apresentou diferença estatística significante. Avaliando de forma isolada cada tumor, observamos um maior destaque dos tumores malignos.

Diante desses dados, talvez a frequência aumentada dessa metilação possa de alguma forma estar relacionada com uma inativação da expressão de alguns genes relacionados ao processo de supressão tumoral.

Essa hipótese pode ser suportada pelo fato de que a má execução das funções de reparação do DNA, splicing alternativo, e remodelação da cromatina faz com que haja uma má-regulação na expressão de alguns genes, tais como Brpf1, dentre outros muitos relacionados ao processo de carcinogênese, facilitando dessa forma o desenvolvimento de tumores (Laue et al, 2008; Zhao et al, 2009; Nimura et al, 2009; Fontebasso et al, 2013).

Levando em consideração a função de reparo de DNA exercida por H3K36me3, os resultados encontrados aqui estão dentro daquilo que era esperado, tendo em vista que em lesões malignas, o processo de reparo deve

estar sendo realizado de forma mais intensa quando comparados às lesões de caráter benignas.

A alta expressão da proteína em TOEC, AME e AAD quando comparados aos outros tumores benignos é explicada pela forma mais agressiva de apresentação dessas lesões, comparadas as outras lesões benignas estudadas (Gupta et al, 2011; Singh et al, 2012; Pereira et al, 2013; Oliveira et al, 2013). Por representar a contraparte maligna do ameloblastoma, era de se esperar uma maior expressão de H3K36me3 no CAME, fato que foi encontrado (Li et al, 2014).

Há ainda que se ressaltar que vários trabalhos trazem como resultados uma alta expressão de H3K36me3 em diversos tipos de câncer, tais como carcinomas de células claras renais; cânceres de mama e leucemia (Marango et al, 2008; Newbold et al, 2010; Kudithipudi & Jeltsch, 2014; Mar et al, 2014). Isso sustenta a hipótese de que H3K36me3 desempenha um papel de destaque na origem e progressão de neoplasias (Behjati et al, 2013; Kudithipudi & Jeltsch, 2014; Ho et al, 2016).

O processo de acetilação / desacetilação de resíduos de lisinas em proteínas histonas H3 e H4, foram uma das primeiras modificações descritas dessas proteínas (Roth et al, 2001; Calestagne-Morelli A & Ausio, 2006; Nightingale et al, 2006). Esse processo é responsável por tornar a cromatina mais acessível ao processo de transcrição, além de manter relação direta com o processo de reparo do DNA, silenciamento gênico e progressão do ciclo celular (Carrozza et al., 2003; Choi & Howe, 2009).

Essas informações motivaram a escolha dos pesquisadores por estudar proteínas histonas acetiladas, em especial aquelas que sofreram acetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9ac) e da lisina 12 da histona H4 (H4K12ac), tendo em vista o amplo histórico de investigação que ambas apresentam em diversos tipos de cânceres (Elsheikh et al, 2009; Zhen et al, 2010; Puppin et al, 2011; Arita et al, 2012; Juliano et al, 2016).

Os dados encontrados acerca da reatividade imuno-histoquímica para H3K9ac foram de aumento significativo em nossas amostras de tumores malignos em relação às neoplasias benignos.

Ao avaliarmos a área total de marcação, observamos que novamente apenas a comparação benignos *versus* malignos apresentou diferença estatística significante. Avaliando de forma isolada cada tumor, observamos que os casos malignos obtiveram um maior destaque. Não foi encontrada diferença estatística nessas comparações.

Nossos achados, sugerem um aumento da aparente da atividade de reparo do DNA. Sugerem ainda que pode estar ocorrendo um desequilíbrio entre as atividades de HAT e HDAC, o que leva a uma desregulação da cromatina, impossibilitando respostas efetivas às diversas alterações (Vaquero et al, 2003; Kurdistani & Grunstein, 2003). O silenciamento de genes supressores de tumor, conforme sugerido por Lehrmann et al, 2002 é também uma outra possibilidade. Vale ressaltar que é válida verificação por métodos experimentais mais amplos (método enzimático, PCR, por exemplo) dessas afirmações.

Nossos resultados vão ainda de encontro com aquilo que é trazido pela literatura, ao observarmos uma maior expressão de H3K9ac em nosso grupo de tumores malignos. Nossos resultados vão de encontro aquilo que Barlesi et al, 2007, Zhen et al, 2010, Liu et al, 2015 e Lutz et al, 2016, afirmam em seus trabalhos, onde percebem a maior expressão da proteína em adenocarcinomas de pulmão, carcinomas de ovário, gliomas e carcinoma colo-rectal, respectivamente, quando comparados a tecidos não tumorais.

É importante ressaltar a existência de trabalhos que caminham no sentido oposto aos resultados aqui encontrados, Elsheikh et al, 2009 e Arita et al, 2012, afirmam ter encontrado menor expressão de H3K9ac em lesões tumorais e não em tecidos normais.

Resultados da reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac foram semelhantes aos observados para H3K9ac. Ocorreu diminuição importante da reatividade em nossas amostras de tumores benignos em relação às neoplasias malignas. Diante de nosso resultado estatístico, percebemos que o mesmo corrobora a afirmação anterior. Encontramos significância estatística ao compararmos os diferentes tipos de tumores de forma independente um com o outro, havendo diferença entre os seguintes grupos: CAME x COCF; TOEC x COCF; TOCC x COCF; TOCC x AAD; TOA x COCF e TOA x AAD.

Ao avaliarmos a área total de marcação, observamos que novamente na comparação benignos x malignos e de tipo entre si, houve diferença estatística significante. Aqui, em nossa comparação entre os diferentes tipos de tumores de forma independente um com o outro, encontramos diferença entre os seguintes grupos: TOCC x COCF; TOCC x COCC; TOA x COCF; TOA x COCC e TOA x AAD.

Levando em consideração que a acetilação torna a cromatina mais acessível a um certo número de fatores de transcrição, potencializando dessa forma a atividade transcrional (Wade 2001; Lehrmann et al, 2002; Taby & Issa, 2010), acreditamos nossos resultados nos levam a acreditar que a maior expressão de H4K12ac em nosso grupo de tumores malignos esteja diretamente relacionada com aumento da transcrição e da atividade mitótica nessas lesões (Carroza et al, 2003).

Os resultados aqui descritos confirmam alguns dos dados já descritos na literatura para H4K12ac. H4K12ac está expressa em maior intensidade em lesões com maior grau de malignidade, quando comparadas a tecidos em menor grau de malignidade, como acontece em casos de cânceres de pâncreas, de tireóide e até mesmo de esôfago (Tzao et al, 2009; Manuyakorn et al, 2010; Puppin et al, 2011; Juliano et al, 2016). É importante ressaltar que outros trabalhos encontraram resultados contrários aqueles que aqui observados, Van Den Breck et al, 2008, por exemplo, afirmam que a expressão da proteína ocorre de forma mais importante em casos de doenças em estado inicial, ou seja, ainda muito próximos do aspecto de normalidade.

Como dito anteriormente, a expressão imunoistoquímica de H4K12ac pode ser preditiva de prognóstico para alguns tipos de cânceres, conforme trabalhado por Chervona & Costa, 2012. De acordo com os autores a elevada expressão da proteína está associada a um pior prognóstico, fato também encontrado no presente trabalho.

Mesmo diante da evidência e da afirmação de alguns trabalhos que tanto H3K9ac quanto H4K12ac poderiam ser utilizadas como possíveis biomarcadores de prognóstico (Zhen et al, 2010), somos favoráveis as afirmações feitas por Snowden et al, 2002 e Ko et al, 2010, que ressaltam o ainda desconhecimento do real efeito dessas proteínas sobre o câncer. É importante destacar que no caso específico desse trabalho, podemos afirmar que esse desconhecimento é

ainda maior, tendo em vista a ausência de estudos com neoplasias de origem odontogênica.

Sabe-se que a proteína histona H3 é fosforilada *in vivo* durante a metáfase, e que embora cinco tipos de resíduos N-terminais de histona H3 possam sofrer fosforilação, a mais estudada é aquela que ocorre na posição 10 do resíduo de serina (H3S10ph), uma vez que ela é dependente do ciclo celular (Shoemaker e Chalkley, 1978; Prigent e Dimitrov, 2003; Cerutti & Casas-Mollano de 2009; Banerjee et al, 2011).

Tem sido relatado que essa forma da proteína (H3S10ph) mantém associação com o processo de condensação e segregação cromossômica, coesão de cromatídeos, assim como também na regulação da expressão de diversos genes durante a interfase, supressão de interações entre proteínas de ligação e as caudas de histonas (Peters et al, 2003; Fischle et al, 2005; Fischle et al, 2008; Cerutti & Casas-Mollano, 2009; Hayashi-Takanaka et al, 2009; Wilkins et al, 2014; Yoshida et al, 2014; Kim et al, 2016), sendo utilizada também como um marcador de mitose (Cerutti & Casas- Mollano, 2009; Tang et al, 2012) e de condensação cromossômica (Van Hooser et al., 1998; Wilkins et al, 2014; Yoshida et al, 2014). Diante desses dados, os autores desse trabalho foram motivados a estudar essa proteína.

Dessa forma após a análise dos dados relativos à reatividade imuno-histoquímica para H3S10ph, em todos os casos de tumores malignos, houve maior expressão da proteína quando comparados ao grupo de tumores benignos. Ao se avaliar de forma agrupada benignos *versus* malignos, foi observada maior reatividade da proteína no grupo de tumores malignos, embora assim como na avaliação anterior, não tenha sido encontrada diferença estatística significante.

Ao avaliar-se a área total de marcação, observamos que novamente que em nenhuma das variáveis estudadas houve diferença estatística digna de nota.

Os resultados encontrados para H3S10ph por esse estudo ratificam conclusões de outros trabalhos, onde foi observado que a fosforilação de histona H3 em Ser10 é crítica durante o processo de transformação maligna, tendo em

vista a elevada expressão da proteína em células transformadas por oncogenes (lesões malignas) (Kim et al, 2008; Lee et al, 2011; Chen et al, 2016).

Além do que altos níveis de H3S10ph resultantes da ação de ARK2 tem sido relatado como um fator precipitante da instabilidade cromossômica, desempenhando um papel de destaque na carcinogênese (Adams et al, 2001; Espino et al, 2009).

A fosforilação de H3S10 em mitose, começa naqueles cromossomos em fase de prófase e nesta fase é impossível de se identificar mitoses pela coloração Hematoxilina-Eosina (Veras et al, 2009). A marcação imunohistoquímica para a proteína estudada colabora na identificação de células em proliferação, fato confirmado por Tsuta, et al, 2011 que afirmam que a contagem de mitoses por avaliação imunoistoquímica de H3S10ph apresentou-se de forma confiável em carcinomas neuroendócrinos de pulmão (Tang et al, 2012)

Os dados obtidos por esse trabalho quanto à reatividade imuno-histoquímica do Ameloblastoma Adenóide para H3S10ph e para H3K36me3, pode ser explicado pela similaridade que a lesão apresenta com o Tumor Odontogênico Adenomatóide, a qual é claramente uma lesão benigna (Sonone et al, 2011; Saxena et al, 2012; Loyola et al, 2015).

Observou-se que AME e AAD na avaliação de H3K36me3, H3K9ac e H4K12ac apresentaram similaridade com CAME, COCC e COCF, o que deixa evidente a similaridade existente entre tais tumores, justificado por exemplo, pela presença de células claras, deposição de dentinóide, calcificações e células fantasmas em CAME (Loyola et al, 2016) ou pela afirmação de que COCC seja um subtipo do CAME (Hall et al, 2007).

O resultado encontrado para AME, AAD, CAME, COCC e COCF mostra a dificuldade em se fazer um diagnóstico diferencial entre tais tumores, além da necessidade em se descobrir marcadores que permitam tal processo (Loyola et al, 2015).

Vale ressaltar ainda que o TOEC em nossas análises para H3K36me3 e H3S10ph apresentou similaridade com os tumores malignos. O que é justificado pelo comportamento agressivo do TOEC (Pereira et al, 2013).

É importante ainda ressaltar a necessidade de novos estudos, tais como avaliação enzimática, estudos de biologia celular, avaliação da expressão de Ki 67, sobre o assunto aqui abordado, para que seja possível, de fato, desvendar qual as reais funções das proteínas aqui trabalhadas com a tumorigênese, em especial aquelas de natureza odontogênica.

## CONCLUSÃO

---

## 6.0 CONCLUSÃO

Nossos achados permitem concluir que:

1. As modificações de histonas ocorrem em ambos os grupos de tumores odontogênicos benignos e malignos, com associação significativa para H3K9ac e H4K12ac em tumores malignos.
2. As modificações de histonas estudadas são mais intensas em relação a IOD e área de reatividade para os tumores malignos.
3. Os tumores benignos mais frequentemente relacionados a aumento na presença de modificações de histonas são os ameloblastomas convencionais, os adenoides e o Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante.
4. Não foi possível encontrar uma relação entre a intensidade de reatividade para as modificações de histonas e localização tumoral, recorrência, metástases e a sobrevida dos pacientes.
5. Estes achados sugerem que estas alterações estão associadas a tumorigênese odontogênica.

## **<sup>1</sup>REFERÊNCIAS**

1-A. V. Jones and C. D. Franklin, An analysis of oral and maxillofacial pathology found in adults over a 30-year period. *Jour Oral Pathol Med.* 2006;35(7):392–401.

2-Abiko Y, Nagayasu H, Takeshima M, Yamazaki M, Nishimura M, Kusano K, et al. Ameloblastic carcinoma ex ameloblastoma: report of a case-possible involvement of CpG island hypermethylation of the p16 gene in malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:72-76.

3-Ackermann GL, Altini M and Shear M: The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. *J Oral Pathol.* 1988;17:541-46.

4-Adamo A K, Boguslaw B, Coomaraswamy M A. Clear cell odontogenic carcinoma of the mandible: case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:121-26

5-Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC, Carmena M: Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol.* 2001;153(4):865-80.

6-Alberts, B. **Biologia molecular da célula.** Tradução de Ana Letícia de Souza Vanz et al. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1.268 p.

7-Almeida SF; Grosso A; Koch F; Fenouil R; Carvalho S; Andrade J, et al. Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 lysine 36. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011.

8-Angiero F, Borloni R, Macchi M, Stefani M. Ameloblastic carcinoma of the maxillary sinus. *Anticancer Res.* 2008;28(6B):3847-54.

9-Arents, G, Burlingame, R W, Wang, B C, Love, W E and Moudrianakis, E N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein

assembly and a left-handed superhelix. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1991;88:10148-52.

10-Arita A, Shamy MY, Chervona Y, Clancy HA, Sun H, Hall MN, et al. The effect of exposure to carcinogenic metals on histone tail modifications and gene expression in human subjects. **J Trace Elem Med Biol.** 2012;26(2-3):174-8.

11-Arnaudo AM, Garcia BA Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. **Epigenetics Chromatin** 2013;6:24.

12-B.J. Wilkins, N.A. Rall, Y. Ostwal, T. Kruitwagen, K. Hiragami-Hamada, M. Win-kler, Y. Barral, W. Fischle, H. Neumann, A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis, **Science**. 2014;343:77-80.

13-Bajpai M, Agarwal D, Bhalla A, Kumar M, Garg R, Kumar M. Multilocular unicystic ameloblastoma of mandible. **Case Rep Dent.** 2013;2013:835892.

14-Banerjee, T., and Chakravarti, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Mol. Cell. Biol.** 2011;31:4858-73.

15-Bang G, Koppang H S, Hansen L S. Clear cell odontogenic carcinoma: report of three cases with pulmonary and lymph node metastasis. **J Oral Pathol Med.** 1989;18:113-18.

16-Bang, G; Koppang, H. Clear Cell Odontogenic carcinoma, in: Barnes, L; Eveson, J W; Reichart, P; Sidransky, D (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, IARC Press, Lyon, p. 292, 2005.

17-Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. **J Biol Chem.** 2005;280:17732-36.

18-Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, Kruyt FA, Rodriguez JA. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. **J Clin Oncol.** 2007;25(28):4358-64.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P; Sidransky D (eds.): World Health Organization Classification of Tumours: **Pathology and Genetics Head and Neck Tumours.** Lyon, France, International Agency for Research on Cancer Press, 2005.

19-Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell.** 2007; 129:823–37

20-Behjati S, Tarpey PS, Presneau N, Scheipl S, Pillay N, Van Loo P, et al. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nat Genet.** 2013;45(12):1479-82.

21-Benlyazid A, Lacroix-Triki M, Aziza R, Gomez-Brouchet A, Guichard M; Sarini J. Ameloblastic carcinoma of the maxilla: case report and review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007;104:17-24.

22-Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev.** 2009;23:781–3.

23-Bhaskar SN. Gingival cyst and the keratinizing ameloblastoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1965; 19:796–807.

24-Bilodeau EA, Weinreb I, Antonescu CR. Clear cell odontogenic carcinomas show EWSR1 rearrangements: a novel finding and a biologic link to salivary clear cell carcinomas. **Am J Surg Pathol.** 2013;37:1001-5.

25-Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.** 2002;16:6–21.

26-Bird A. Perceptions of epigenetics. **Nature.** 2007;447(7143):396-8.

27-Blair, L. P., Cao, J., Zou, M. R., Sayegh, J. & Yan, Q. Epigenetic regulation by lysine demethylase 5 (KDM5) enzymes in cancer. **Cancers**. 2011;3:1383–1404.

Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Lopez-Corella. Comparative expression of syndecan-1 and Ki-67 in peripheral and desmoplastic ameloblastomas and ameloblastic carcinoma. **Pathol. Int.** 2009;(59):229–233.

28-Bonfante, G M S; Machado, C J; Souza, P E A; Andrade, E I G; Acurcio, F A.; Cherchiglia, M L. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. **Cad. Saúde Pública** , v.30, n.5, p.383-997, 2014.

29-Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. **Cell**. 2006;127(7):1361-73.

30-Bouckaert M M, Raubenheimer E J, Jacobs F J. Calcifying epithelial odontogenic tumor with intracranial extension: report of a case and review of literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2000;90:656–62.

31-Brandwein M, Said-Al-Naief N, Gordon R. Clear cell odontogenic carcinoma: report of a case and analysis of the literature. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002;128(9):1089-95.

32-Brannon, R B. Adenoid ameloblastoma with dentinoid, Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology. **ROPCOM**. 1994;1-94.

33-Bridle C, Visram K, Piper K, Ali N. Maxillary calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor presenting with abnormal eye signs: case report and literature review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2006;102:e12-15.

34-Brieher WM, Yap AS. Cadherin junctions and their cytoskeleton(s) **Curr Opin Cell Biol**. 2013;(25):39–46.

35-Brinck U, Gunawan B, Schulten H J, Pinzon W, Fischer U, Füzesi L. Clear-cell odontogenic carcinoma with pulmonary metastases resembling pulmonary meningothelial-like nodules. **Virchows Arch.** 2001;438:412-7.

Brockdorff N. Noncoding RNA and polycomb recruitment. **RNA.** 2013;19:429-42

36-Brown NA, Betz BL. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. **Biomark Cancer.** 2015;7(2):19-24.

37-Brown NA, Rolland D, McHugh JB, et al. Activating FGFR2-RAS- BRAF mutations in ameloblastoma. **Clin Cancer Res.** 2014;20(21):5517–26.

38-Bueno JM, Bueno SM, Romero JP, Atín MSB, Redecilla PH, Martin GR. Mandibular ameloblastoma. Reconstruction with iliac crest graft and implants. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 2007;12:e73-75.

39-Bulut. An adenomatoid odontogenic tumor with unusual clinical features. **J Oral Sci.** 2001;43(4):283—86.

40-C.A. Mizzen, C.D. Allis. Linking histone acetylation to transcriptional regulation, Cellular and Molecular. **Life Sciences.** 1998(54):6–20.

41-Calestagne-Morelli A & Ausio J. Long-range histone acetylation: biological significance, structural implications, and mechanisms. **Biochem Cell Biol.** 2006;84:518–27.

42-Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer.** 2006;6: 857–66.

43-carcinoma with features of ghost cell odontogenic carcinoma in a patient with suspected Gardner syndrome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** 2015;119(4):e241-5.

44-Carreón-Burciaga R G, González-González R, Molina-Frechero N, Bologna-Molina R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in Ameloblastoma and Ameloblastic Carcinoma and Their Correlations with Clinical and Histopathological Patterns. **Dis Markers**. 2015;2015:683087.

45-Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Côté J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends Genet**. 2003;19(6):321-9.

46-Casaroto A R, Toledo G L, Filho J L, Soares C T, Capelari M M, Lara V S. Ameloblastic carcinoma, primary type: case report, immunohistochemical analysis and literature review. **Anticancer Res**. 2012;32(4):1515-25

47-Castle JT, Arendt DM. Aggressive (malignant) epithelial odontogenic ghost cell tumor. **Ann Diagn Pathol**. 1999;3:243-8.

48-Cerutti, J.A.H & Casas-Mollano, Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects. **Epigenetics**. 2009;4:71-5.

49-Chadee DN, Hendzel MJ, Tylliński CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR: Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogenstimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. **J Biol Chem**. 1999;274(35):24914-20.

50-Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. **Am J Pathol**. 2016;186(7):1724-35.

51-Chapelle KAOM, Stoelinga PJW, de Wilde PCM, Brouns JJA, Voorsmit RACA. Rational approach to diagnosis and treatment of ameloblastomas and odontogenic keratocysts. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2004;42:381-90.

52-Chen K, Zhang S, Ke X, Qi H, Shao J, Shen J. Biphasic reduction of histone H3 phosphorylation in response to N-nitroso compounds induced DNA damage. **Biochim Biophys Acta**. 2016;1860(9):1836-44.

53-Chen YW, Kao SY, Wang HJ, Yang MH. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**. 2013;15(24):4259-67.

54-Chera B S, Villaret D B, Orlando C A, Mendenhall W M. Clear cell odontogenic carcinoma of the maxilla: a case report and literature review. **Am J Otolaryngol**. 2008;29(4):284-90.

55-Chervona, Y; Costa, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? **Am J Cancer Res**, 2012;2(5):589-97.

56-Chindasombatjaroen J, Poomsawat S, Kakimoto N, Shimamoto H. Calcifying cystic odontogenic tumor and adenomatoid odontogenic tumor: radiographic evaluation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2012;114(6):796-803.

57-Choi HS, Choi BY, Cho YY, Mizuno H, Kang BS, Bode AM, Dong Z: Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is indispensable for neoplastic cell transformation. **Cancer Res**. 2005, 65(13):5818-27.

58-Choi JK, Howe LJ. Histone acetylation: truth of consequences? **Biochem Cell Biol**. 2009; 87:139–50.

59-Cobb J, Cargile B, Handel MA: Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. **Dev Biol**. 1999;205:49–64.

60-Cotran, R S; Kumar, V; Collins, T. Neoplasia. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 233-241.

61-Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. **Mol Cell Biol**. 2002;22(3):874-85.

62-Datta R, Winston J S, Diaz-Reyes G, Loree T R, Myers L, Kuriakose M A, et al. Ameloblastic carcinoma: report of an aggressive case with multiple bony metastases. **Am J Otolaryngol**. 2003;24(1):64-9.

63-Dawson, M A; Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**. 2012;150(1):12-27.

64-Dayi E, Gurbuz G, Bilge OM, Ciftcioglu MA. Adenomatoid odontogenic tumour (adenoameloblastoma). Case report and review of the literature. **Aust Dent J**. 1997;42:315-8.

65-De Aguiar M C F, Gomez R S, Silva E C, De Araujo V C. Clear cell ameloblastoma (clear cell odontogenic carcinoma). Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1996;81:79-83.

66-de Matos FR, Nonaka CF, Pinto LP. Adenomatoid odontogenic tumor: retrospective study of 15 cases with emphasis on histopathologic features. **Head Neck Pathol**. 2012;6:430-37.

67-Deepti G, Sangeeta P, Shetty V P, Anju B. Adenomatoid odontogenic tumor – hamartoma or true neoplasm: A case report. **J Oral Sci**. 2009;51:155-9.

68-DeManno, D A, Cottom, J E, Kline, M P, Peters, C A, Maizels, E T and Hunzicker-Dunn, M. Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. **Mol. Endocrinol**. 1999;13:91-105.

69-Denis H, Ndlovu MN & Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO**. 2011;12:647-56.

70-Desai H, Sood R, Shah R, Cawda J, Pandya H. Desmoplastic ameloblastoma: report of a unique case and review of literature. **Indian J Dent Res**. 2006;17:45-9.

71-Ellis GL, Shmookler BM. Aggressive (malignant?) epithelial odontogenic ghost cell tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1986;61:471–78.

72-Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer Res.** 2009;69(9):3802-9.

73-Espino PS, Pritchard S, Heng HH, Davie JR: Genomic instability and histone H3 phosphorylation induction by the Ras-mitogen activated protein kinase pathway in pancreatic cancer cells. **Int J Cancer.** 2009;124(3):562-67.

74-Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2005;45:629–56.

75-Evans, B L; Carr, R F; Phillippe, L J. Adenoid ameloblastoma with dentinoid: a case report. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics.** 2004;98:583-88.

76-Fan J, Kubota E, Imamura H. Clear cell odontogenic carcinoma. A case report with massive invasion of neighboring organs and lymph node metastasis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1992;74(6):768-75.

77-Fejerskov O, Krogh J. The calcifying ghost cell odontogenic tumour or the calcifying odontogenic cyst. **J Oral Pathol.** 1972;1:237–87.

78-Felsenfeld, G, Groudine, M. Controlling the double helix. **Nature.** 2003;421:448–53.

79-Ficara G; Hansen LS. Peripheral ameloblastoma: A case report. **J Cranio-Maxillofac Surg.** 1987;15:110–2

80-Figueiredo NR, Meena M, Dinkar AD, Malik S, Khorate M. Unicystic Ameloblastoma Presenting as a Multilocular Radiolucency in the Anterior

Mandible: A Case Report. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.** 2015;9(3):199-204.

81-Fischle, W, Tseng, B S, Dormann, H L, Ueberheide, B M, Garcia, B A, Shabanowitz, J, et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature.** 2005;438: 1116-22.

82-Fischle, W. Talk is cheap-cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. **Gene Dev.** 2008;22:3375-82.

83-Fitzpatrick S G, Hirsch S A, Listinsky C M, Lyu D J, Baur D A. Ameloblastic Fonseca F P, De Almeida O P, Vargas P A, Gonçalves F Júnior, Corrêa Pontes F S, Rebelo Pontes H A. Ameloblastic carcinoma (secondary type) with extensive squamous differentiation areas and dedifferentiated regions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** 2016; 121(6):e154-e161.

84-Fontebasso A M, Schwartzenruber J, Khuong-Quang D A, Liu X Y, Sturm D, Korshunov A, et al. Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. **Acta Neuropathol.** 2013;125(5):659-69.

85-Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat Genet.** 2005;37,391-400.

86-Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, et al: Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2010;39:145.

87-Gandy S R, Keller E E; Unni K K: Ameloblastic carcinoma, report of two cases. **J Oral Maxillofac Surg.** 1992;50:1097-02.

88-Gardner DG. Peripheral ameloblastoma: a study of 21 cases, including 5 reported as basal cell carcinoma of the gingiva. **Cancer.**1977;39:1625-33.

89-Gardner DG. Some current concepts on the pathology of ameloblastomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1996;82:660-9.

90-Gardner, D G; Heikinheimo, K; Shear, M; Philipsen, H P; Coleman, H. Ameloblastoma, in: Barnes, L; Eveson, J W; Reichart, P; Sidransky, D (Eds.), World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, IARC Press, Lyon, p. 296-300, 2005.

91-Garg D, Palaskar S, Shetty V P, Bhushan A. Adenomatoid odontogenic tumor-hamartoma or true neoplasm: A case report. **J Oral Sci.** 2009;51:155-9.

92-Ghasemi-Moridani, S, Yazdi, I. Adenoid ameloblastoma with dentinoid: a case report. **Archives Iran Medicine.** 2008;11:110-2.

93-Gilbert J, Gore S, Herman J. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. **Clin Cancer Res.** 2004;10:4589-96.

94-Ginat DT, Villaflor V, Cipriani NA. Oral Cavity Clear Cell Odontogenic Carcinoma. **Head Neck Pathol.** 2016;10(2):217-20.

95-Goldenberg D, Sciubba J, Koch W, Tufano RP. Malignant odontogenic tumors: a 22-year experience. **Laryngoscope.** 2004;114:1770-4.

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

97-Gopalakrishnan R, Simonton S, Rohrer M D, Koutlas I G. Cystic variant of calcifying epithelial odontogenic tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006;102:773-7.

98-Gorlin RJ, Pindborg JJ, 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;15:1235–43.

99-Graber MW, Schweinfest CW, Reed CE, Papas TS, Baron PL: Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus. **Ann Surg Oncol.** 1996;3(2):192-97.

100-Grodjesk JE, Dolinsky HB, Schneider LC. Odontogenic ghost cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1987;63:576–81.

101-Guo R, Zheng L, Park JW, Lv R, Chen H, Jiao F, et al. BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3.3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing. **Mol Cell.** 2014;56(2):298-310.

102-Gupta N, Saxena S, Rathod VC, Aggarwal P. Unicystic ameloblastoma of the mandible. **J Oral Maxillo Pathol.** 2011;15:228-31.

103-Gurley L R, D'Anna J A, Barham SS, Deaven L L, Tobey RA. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. **Eur J Biochem.** 1978; 84:1-15

104-Gutierrez, R M. and Hnilica, L S. Tissue specificity of histone phosphorylation. **Science.** 1967;157:1324-25.

105-Hall J M, Weathers D R; Unni K K: Ameloblastic carcinoma: An analysis of 14 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007;103:799-807.

106-Handscher J G, Depprich R A, Zimmermann A C, Braunstein S, Kubler N R. Adenomatoid odontogenic tumor of the mandible: Review of the literature and report of a rare case. **Head Face Med.** 2005;1:3.

107-Hansen, L S; Eversole, L R; Green, T L; Powell, N B. Clear cell odontogenic tumor—a new histologic variant with aggressive potential, **Head Neck Surgery**. 1985;8:115-23.

108-Hauptman N, Glavac D. Long non-coding RNA in cancer. **Int J Mol Sci**. 2013;14:4655-69

109-Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H: Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. **J Cell Biol**. 2009;187:781–90.

110-Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**. 1997;106:348-60.

111-Henriques ACG, Cazal C, Fonseca DDD, Bello DMA, Araújo NC, Castro, JFL. Considerations regarding The Epithelial Odontogenic Tumor Classification and Biological behavior: a Literature Review. **Rev Bras Cancerol**. 2009; 55(2):175-84.

112-Herceg Z. Epigenetic Mechanisms as an Interface Between the Environment and Genome. **Adv Exp Med Biol**. 2016;903:3-15.

113-Hertog D, Van der Waal I. Ameloblastoma of the jaws: a critical reappraisal based on a 40-years single institution experience. **Oral Oncol**. 2010;46:61–4.

114-Hicks M J, Flaitz C M, Wong M E K, McDaniel R K, Cagle P T. Clear cell variant of calcifying epithelial odontogenic tumour: case report and review of the literature. **Head Neck Surg**. 1994;16:272–7.

115-Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters J-M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. **Nature**. 2005;438:1176-80.

116-Ho TH, Kapur P, Joseph RW, Serie DJ, Eckel-Passow JE, Tong P, et al. Loss of histone H3 lysine 36 trimethylation is associated with an increased risk of renal cell carcinoma-specific death. **Mod Pathol**. 2016;29(1):34-42.

117-Hong SP, Ellis GL, Hartman KS. Calcifying odontogenic cyst. A review of ninety-two cases with re-evaluation of their nature as cysts or neoplasms, the nature of ghost cells and subclassification. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1991;72:56-64.

118-Houben A, Wako T, Furushima-Shimogawara R, Presting G, Kunzel G, Schubert I I, Fukui K. Short communication: the cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **Plant J**. 1999;18(6):675-9.

119-Hu M; Sun XJ; Zhang YL; Kuang Y; Hu CQ; Wu WL, et al. Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2010;107(7):2956-61.

120-I H, Ko E, Kim Y, Cho EY, Han J, Park J, Kim K, Kim DH, Shim YM. Association of global levels of histone modifications with recurrence-free survival in stage IIB and III esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2010;19(2):566-73.

121-Jensen A D, Ecker S, Ellerbrock M, Nikoghosyan A, Debus J; Munter M W: Carbon ion therapy for ameloblastic carcinoma. **Radiat Oncol**. 2011;6: 1-5.

122-Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. **Anat Rec (Hoboken)**. 2013 Mar;296(3):378-81.

123-Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. **Science**. 2001;293:1074–80

124-Jeschke J, Collignon E, Fuks F. DNA methylome profiling beyond promoters - taking an epigenetic snapshot of the breast tumor microenvironment. **FEBS J**. 2015;282(9):1801-14.

125-Johnson L, Cao X, Jacobsen S. Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. **Curr Biol**. 2002;12:1360–7.

126-Jones, P A; Baylin, S B. The epigenomics of cancer. **Cell**. 2007;128(4):683-92.

127-Jordan RCK, Speight PM. Current concepts of odontogenic tumours. **Diagn Histopathol** 2009;15(6):303–10

128-Juliano CN, Izetti P, Pereira MP, Dos Santos AP, Bravosi CP, Abujamra AL, et al. H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 2016;24(5):337-44.

129-Kalebic, T. Epigenetic changes potential therapeutic targets. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2003;983:278–85.

130-Kamal M, Kaur P, Gupta R, et al. Mandibular plamacytoma of jaw: a case report. **J Clin Diagn Res**. 2014;8:20–1

131-Kamijo R, Miyaoka K, Tachikawa T. Odontogenic ghost cell carcinoma: Report of a case. **J Oral Maxillofac Surg**. 1999;57:1266–70.

132-Kaplan I, Buchner A, Calderon S, Kaffe I. Radiological and clinical features of calcifying epithelial odontogenic tumour. **Dentomaxillofac Radiol**. 2001;30:22-8.

133-Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. *Oral Oncol.* 2004;40:985–91

134-Kar, I B; Subramanyam, R V; Mishra, N.; Singh, A K. Ameloblastic carcinoma: A clinicopathologic dilemma - Report of two cases with total review of literature from 1984 to 2012. **Annals Maxillofacial Surgery.** 2014;4:70-7.

135-Karakida K, Aoki T, Sakamoto H, Takahashi M, Akamatsu T, Ogura G, et al. Ameloblastic carcinoma, secondary type: a case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2010;110:33-7.

136-Kaushal, S R; Mathur, M; Vijay; Rustagi. Calcifying epithelial odontogenic tumor (Pindborg tumor) without calcification: a rare entity. **Jour Oral Maxillofacial Pathology.** 2012;16(1):110–12.

137-Kim HG, Lee KW, Cho YY, Kang NJ, Oh SM, Bode AM, Dong Z: Mitogenand stress-activated kinase 1-mediated histone H3 phosphorylation is crucial for cell transformation. **Cancer Res.** 2008;68(7):2538-47.

138-Kim HJ, Choi SK, Lee CJ, et al. Aggressive epithelial odontogenic ghost cell tumor in the mandible: CT and MR imaging findings. **AJNR Am J Neuroradiol.** 2001;22:175–79.

139-Kim J, Lee EH, Yook JI, Han JY, Yoon JH, Ellis GL. Odontogenic ghost cell carcinoma: a case report with reference to the relation between apoptosis and ghost cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2000;90:630–35.

140-Kim M, Cho E, Kim J Y, Kim H S, Nam W. Clear cell odontogenic carcinoma mimicking a cystic lesion: a case of misdiagnosis. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.** 2014;40(4):199-203.

141-Kim S; Kim H; Fong N; Erickson B. & Bentley D. L. Pre-mRNA splicing is a determinant of histone H3K36 methylation. **Proc. Natl Acad. Sci.** 2011;108:13564–69.

142-Kim SR, Kim KB, Chae YC, Park JW, Seo SB. H3S10 phosphorylation-mediated transcriptional regulation by Aurora kinase A. **Biochem Biophys Res Commun.** 2016 469(1):22-8.

143-Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. **J Hum Genet.** 2013;58(7):439-45.

144-Kishore M, Panat S R, Aggarwal A, Upadhyay N, Agarwal N. Ameloblastic Carcinoma: A Case Report. **J Clin Diagn Res.** 2015;9(7):ZD27-8

145-Kizer KO, Phatnani HP, Shibata Y, Hall H, Greenleaf AL, Strahl BD. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3K36 methylation with transcript elongation. **Mol Cell Biol.** 2005;25:3305–16

146-Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS, Ahringer J. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. **Nat Genet.** 2009;41(3):376-81.

147-Konkel MK & Batzer MA. A mobile threat to genome stability: the impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome. **Semin Cancer Biol.** 2010;20:211–21.

148-Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. **Cell.** 2007;128:693–705

149-Kramer I R H, Pindborg J J, Shear M. **Histological Classification of Odontogenic Tumours.** In: Histological Typing of Odontogenic Tumours. Springer Berlin Heidelberg, 1992:7-9.

150-Kramer I R H, Pindborg J J, Torloni H. **Histological typing of odontogenic tumors, jaw cysts and allied lesions**. World Health Organization, Geneva, 1971;pp 28–35

151-Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Calcifying odontogenic cyst. In: Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. **Histological typing of odontogenic tumours, WHO international histological classification of tumours**. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag: 1992; p.20-6.

152-Kruse A L, Zwahlen R A, Gratz K W. New classification of maxillary ameloblastic carcinoma based on an evidencebased literature review over the last 60 years. **Head Neck Oncol.** 2009;1:31.

153-Krutovskikh VA, Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. **Bioessays**. 2010;32:894–904.

154-Kudithipudi S, Jeltsch A. Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2014;1846:366–79.

155-Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**. 2004;(33):292–9.

156-Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Detection of cell cycle-related factors in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**. 2001;30(5):309-15.

157-Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**. 2004;(33):185–90

158-Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med.** 2005;(34):401–6

159-Kumar M, Fasanmade A, Barrett A W, Mack G, Newman L, Hyde NC. Metastasising clear cell odontogenic carcinoma: a case report and review of the literature. **Oral Oncol.** 2003;39:190-4.

160-Kurdistani SK & Grunstein M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2003;4:276–84.

161-Kurita H, Schnekenburger M, Ovesen JL, Xia Y, Puga A. The Ah receptor recruits IKK $\alpha$  to its target binding motifs to phosphorylate serine-10 in histone H3 required for transcriptional activation. **Toxicol Sci.** 2014;139(1):121-32

162-Lamichhane N, Liu Q, Sun H, Zhang W. A case report on desmoplastic ameloblastoma of anterior mandible. **BMC Res Notes.** 2016;9(1):171.

163-Langan, T A. Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3 $\prime$ ,5 $\prime$ -monophosphate. **Science.** 1968;162:579-80.

164-Laue K, Daujat S, Crump JG, Plaster N, Roehl HH; Tübingen 2000 Screen Consortium., Kimmel CB, Schneider R, Hammerschmidt M. The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. **Development.** 2008;135(11):1935-46.

165-Ledesma-Montes C, Gorlin R J, Shear M, Praetorius F, Mosqueda-Taylor A, Altini M. International collaborative study on ghost cell odontogenic tumours: Calcifying cystic odontogenic tumour, dentinogenic ghost cell tumour and ghost cell odontogenic carcinoma. **J Oral Pathol Med.** 2007;37:302-08.

166-Lee CC, Lin YH, Chang WH, Lin PC, Wu YC, Chang JG. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. **BMC Cancer**. 2011;8:11:58.

167-Lee, J.S. & Shilatifard, A. **Mutat. Res.** 2007;618:130–134

168-Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. **Adv Cancer Res.** 2002;86:41-65.

169-Li BB, Xie XY, Jia SN. Adenomatoid odontogenic tumor with fibro-osseous reaction in the surrounding tissue. **J Craniofac Surg.** 2013;24:e100-101.

170-Li F, Mao G, Tong D, et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSalpha. **Cell**. 2013;153:590–600.

171-Li J, Du H, Li P, Zhang J, Tian W, Tang W. Ameloblastic carcinoma: An analysis of 12 cases with a review of the literature. **Oncol Lett.** 2014;8(2):914-20.

172-Li J, Zhu S, Ke XX, Cui H. Role of several histone lysine methyltransferases in tumor development. **Biomed Rep.** 2016;4(3):293-99. Epub 2016 Jan 21.

173-Li TJ, Yu SF. Clinicopathologic spectrum of the so-called calcifying odontogenic cysts: a study of 21 intraosseous cases with reconsideration of the terminology and classification. **Am J Surg Pathol**. 2003;27:372-84.

174-Liang, Shoudan. Genome-wide analysis of epigenetic modifications. **J. Comput. Sci. Technol.** 2010;25(1):35–41.

175-Limongelli WA, Anilesh K, Pulse CL, et al. Surgical treatment of central epithelial ghost cell tumor. **NY State Dent J.** 1997;63:42–6.

176-Lin C, Chen C, Lin L, Chen Y, Wright J M, Kessler H P. Calcifying odontogenic cyst with ameloblastic fibroma. Report of three cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 2004;98:451–60

177-Liu Y, Wang DL, Chang JF, Chen S, Sun FL, Long YH, Wang SQ, Li YF, Liu YK, Zhang JH. WITHDRAWN: WSTF Phosphorylation Specifically Links H3K9ac with H4K16ac through PCAF/WSTF/MOF Complex. **J Biol Chem.** 2015;2.

178-Loyola AM, Cardoso SV, de Faria PR, Servato JP, Eisenberg AL, Dias FL, et al. Ameloblastic carcinoma: a Brazilian collaborative study of 17 cases. **Histopathology.** 2016;69(4):687-701.

179-Loyola, A M.; Cardoso, S V.; De Faria, P R.; Servato J P; Barbosa de Paulo L F; Eisenberg A L, et al. Clear cell odontogenic carcinoma: report of seven new cases and systematic review of the current knowledge. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol.** 2015;120:483-96.

180-Loyola, A M; Cardoso, S V; De Faria, P R; Servato J P; Eisenberg, A L; Dias FL, et al. Adenoid ameloblastoma: clinico-pathological features of five cases and systematic review of the current knowledge. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 2015;120:368-77.

181-Lu Y, Mock D, Takata T. Odontogenic ghost cell carcinoma: Report of four new cases and review of the literature. **J Oral Pathol Med.** 1999;28:323–29.

182-Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M. & Misteli, T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. **Science.** 2010;327:996–1000.

183-Lutz L, Fitzner IC, Ahrens T, Geißler AL, Makowiec F, Hopt UT, Bogatyreva L, Hauschke D, Werner M, Lassmann S. Histone modifiers and marks define heterogeneous groups of colorectal carcinomas and affect responses to HDAC inhibitors in vitro. **Am J Cancer Res.** 2016;6(3):664-76.

184-Macdonald D G, Browne R M. **Tumours of odontogenic epithelium.** In: Anthony PA, Macsween RNM, Lowe DG, editors. Recent advances in histopathology. Edinburgh: Churchill- Livingstone, 1997. p. 139–66.

185-Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, Dawson NA, Tze S, Cheung-Lau G, et al. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704. **J Clin Oncol.** 2010; 28(8):1358-65.

186-Manzanero S, Arana P, Puertas MJ, Houben A. Chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma.** 2000;109:308–17.

187-Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, Neuberg DS, Sinha AU, Sallan SE, Silverman LB, Kung AL, Lo Nigro L, Ebert BL, Armstrong SA. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Commun.** 2014;24(5):3469.

188-Marango J, Shimoyama M, Nishio H, Meyer JA, Min DJ, Sirulnik A, Martinez-Martinez Y, Chesi M, Bergsagel PL, Zhou MM, Waxman S, Leibovitch BA, Walsh MJ, Licht JD. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. **Blood.** 2008;111(6):3145-54.

189-Martos-Fernández M, Alberola-Ferranti M, Hueto-Madrid JA, Bescós-Atín C. Ghost cell odontogenic carcinoma: A rare case report and review of literature. **J Clin Exp Dent.** 2014;6(5):e602-6.

190-Marx RE, Stern D. Oral and maxillofacial pathology: a rationale for diagnosis and treatment. Chicago, Ill, USA: **Quintessence Publishing Company**; 2003.

191-Masthan KM, Anitha N, Krupaa J, Manikkam S. Ameloblastoma. **J Pharm BioalliedSci.** 2015;7(1):S167-70.

192-Miller RT, Kubier P, Reynolds B, Turnbow H. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **Applies Immunohistochemistry & Molecular Morphology**. 199;(1):63-5.

193-Milman T, Ying GS, Pan W, LiVolsi V. Ameloblastoma: 25 Year Experience at al. Single Institution. **Head Neck Pathol**. 2016;10(4):513-20.

194-Moleri A B, Moreira L C, Carvalho J J. Comparative morphology of 7 new cases of calcifying odontogenic cyst. **J Oral Maxillofac Surg**. 2002;60:689-96.

195-Mori M, Kasai T, Nakai M, et al. Dentinogenic ghost cell tumor: histologic aspects, immunohistochemistry, lectin binding profiles, and biophysical studies. **Oral Oncol**. 2000;36:134-43.

196-Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla\_Robertson J, Ruiz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in Mexico: A collaborative retrospective study of 349 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod**. 1997;84(6):672-5.

197-Motamed M, Shafeie H A, Azizi T. Salvage of an impacted canine associated with an adenomatoid odontogenic tumour: A case report. **Br Dent J**. 2005;199:89-90.

198-Mujib, P G; Kulkarni, A. Lingappa,A. Jahagirdar; Soman C. An atypical presentation of Pindborg tumor in anterior maxilla. **Dental Research Journal**. 2012;9(4): 495-98.

199-Nagi R, Sahu S, Rakesh N. Molecular and genetic aspects in the etiopathogenesis of ameloblastoma: An update. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2016; 20(3):497-504. Review.

200-Nai G A & Grosso R N: Fine-needle aspiration biopsy of ameloblastic carcinoma of the mandible: a case report. **Braz Dent J.** 2011;22:254-57.

201-Nazaretian SP, Schenberg ME, Simpson I, Slootweg PJ. Ghost cell odontogenic carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2007; 36:455-8.

202-Newbold RF, Mokbel K. Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. **Anticancer Res.** 2010; 30:3309–11.

203-Nightingale KP, O'Neill LP & Turner BM. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. **Curr Opin Genet Dev.** 2006;16:125–36.

204-Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ, Kaneda Y. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. **Nature.** 2009;460(7252):287-91.

205-Nobusawa A, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Ameloblastic carcinoma developing in preexisting ameloblastoma with a mutation of the p53 gene: a case report. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.** 2014;118:e146–e150.

206-Oliveira MT, Rocha FS, de Paulo LF, et al. The approach of ameloblastoma of the mandible: a case treated by hyperbaric oxygen therapy and bone graft reconstruction. **Oral Maxillofac Surg.** 2013;17:311–4.

207-Orsini G, Fioroni M, Rubini C, Piattelli A. Peripheral calcifying odontogenic cyst. **J Clin Periodontol.** 2002;29:83-6.

208-Pal SK, Sakamoto K, Aragaki T, Akashi T, Yamaguchi A. The expression profiles of acidic epithelial keratins in ameloblastoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** 2013;115:523-31.

209-Patino B, Fernandez-Alba J, Garcia-Rozado A, Martin R, Lopez-Cedrun JL, Sanroman B. Calcifying epithelial odontogenic (pindborg) tumor: a series of 4 distinctive cases and a review of the literature. **J Oral Maxillofac Surg** 2005;63:1361-68.

210-Paulson JR, Taylor SS. Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. **J Biol Chem.** 1982; 257:6064-72.

211-Pekiner FH, Ozbayrak S, Sener BC. Peripheral ameloblastoma: a case report. **Dentomaxillofac Radiol.** 2007;36:183-6.

212-Pereira O H, De Carvalho L P, Lacerda; Brasileiro Jr. V, De Figueiredo C R. Calcifying epithelial odontogenic tumor. **Case Rep Pathol.** 2013;2013:725380. Epub 2013 Nov 27.

213-Peters, A H F M, Kubicek, S, Mechtler, K, O'Sullivan, R J, Derijck, A A H A, Perez-Burgos, L. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. **Mol. Cell.** 2003;12:1577-89.

214-Philipsen H P, Reichart P A. Calcifying epithelial odontogenic tumor: Biological profile based on 181 cases from the literature. **Oral Oncol.** 2000;36:17-26.

215-Philipsen H P, Reichart P A; Siar C H, N G K H, Lau S H, Zhang X, et al. An updated clinical and epidemiological profile of the adenomatoid odontogenic tumour: A collaborative retrospective study collaborative retrospective study. **J Oral Pathol Med** 2007;36:383-93.

216-Philipsen HP and Nikai H: Adenomatoid odontogenic tumour. In: **Pathology and Genetics of Head and Neck tumors.** In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P and Sidransky D (ed.). Lyon, France: IARC Press, pp. 304-305, 2005.

217-Philipsen HP and Reichart PA: Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. **Oral Oncol.** 1998;34: 317-25.

218-Philipsen HP, Reichart PA, Nikai H, Takata T, Kudo Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. **Oral Oncol.** 2001;37:17-27.

219-Philipsen HP, Reichart PA, Siar CH, Ng KH, Lau SH, Zhang X, et al. An updated clinical and epidemiological profile of the adenomatoid odontogenic tumour: a collaborative retrospective study. **J Oral Pathol Med.** 2007;36:383-93.

220-Pindborg J .J, Kramer I R; Torloni H. Histological Typing of Odontogenic Tumours, Jaw Cysts and Allied Lesions. **International Histological Classification of Tumours.** World Health Organization, pp. 24-28, 1971.

221-Pizer ME, Page DG, Svirsky JA. Thirteen-year follow-up of large recurrent unicystic ameloblastoma of the mandible in a 15-year-old-boy. **J Oral Maxillofac Surg.** 2002; 60:211-5.

222-Pradeepa, M. M., Sutherland, H. G., Ule, J., Grimes, G. R. & Bickmore, W. A. Psip1/ Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. **PLoS Genet.** 2012;8:e1002717.

223-Praetorius F, Hjorting-Hansen HE, Gorlin RJ, Vickers RA. Calcifying odontogenic cyst. Range, variations and neoplastic potential. **Acta Odontol Scand.** 1981;39:227–40.

224-Prætorius F, Ledesma-Montes C. Calcifying cystic odontogenic tumour. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. World Health Organization classification of tumours. **Pathology and genetics of head and neck tumours.** Lyon: IARC Press, 2005:313-14.

225-Prigent C, Dimitrov S: Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **J Cell Sci** 2003;116:3677–85.

226-Pundir S, Saxena S, Rathod V; Aggrawal P: Ameloblastic carcinoma: Secondary dedifferentiated carcinoma of the mandible - Report of a rare entity with a brief review. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2011;15:201-4.

227-Puppin C, Passon N, Lavarone E, Di Loreto C, Frasca F, Vella V, Vigneri R, Damante G. Levels of histone acetylation in thyroid tumors. **Biochem Biophys Res Commun**. 2011;411(4):679-83.

228-Reichart P A, Philipsen H P. Calcifying epithelial odontogenic tumors. In: Reichart PA, Philipsen HP, editors. **Odontogenic Tumors and Allied Lesions**. London: Quintessence Publishing; 2004. p. 93-104.

229-Reichart P A, Phillipsen H P. Odontogenic tumours and allied lesions. **Quintessence**,2004.

230-Reichart PA and Jundt G: Benigne epitheliale odontogene Tumoren. **Der Pathologe**. 2008;29:175-88.

231-Reyes D, Villanueva J, Espinisa S, Cornejo M. Odontogenic calcificant cystic tumor: a report of two clinical cases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2007;12(2):E126-9. Review.

232-Rick GM. Adenomatoid odontogenic tumor. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. 2004;16:333-54.

233-Rine J, Strathern JN, Hicks JB & Herskowitz I. A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. **Genetics**. 1979;93:877–901.

234-Roach H I; Bronner, F; Oreffo, R O C **Epigenetic Aspects of Chronic Diseases**. 1 ed. Londres: Springer-Verlag London Limited, 2011. p.1-20.

235-Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostic distinct entity. **Cancer**. 1977;40:2278-85.

236-Rodrigues E, Ramôa F, Quezada D, Shih M, Agustin P, Paes De Almeida O. Calcifying odontogenic cyst: clinicopathological features and immuno-histochemical profile of 10 cases. **J Oral Pathol Med**. 2003;32:163-70.

237-Ross JP, Rand KN & Molloy PL. Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer. **Epigenomics**. 2010;2:245-69.

238-Roth SY, Denu JM & Allis CD. Histone acetyltransferases. **Annu Rev Biochem**. 2001;70, 81–120.

239-Rushton V E, Horner K. Calcifying odontogenic cyst – a characteristic CT finding. **Br J of Oral and Maxillofac Surg**. 1997;35:196-8.

240-Sahni, M. T; Nayak, A; Singhvi; J Sharma. Clear cell calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor involving maxillary sinus: a case report and review of literature. **Journal of Oral Surg; Oral Med; Oral Pathol**. 2012;16(3):454–59.

241-Sano K, Yoshimura H, Tobita T. Spontaneous eruption of involvedsecond molar in unicystic ameloblastoma of the mandible after marsupi-alization followed by enucleation: a case report. **J Oral Maxillofac Surg**. 2013;71:66–71.

242-Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP, editors. **Contemporary oral and maxillofacial pathology**. 2nd ed. St Louis (MO): Mosby; 2004. p. 136-43.

243-Sapp PJ, Eversole RL, Wysocki PG, eds. **Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea**. Madrid: Ediciones Harcourt; 1998. p. 138-9.

244-Sauvé DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M: Phosphorylation-induced rearrangement of histone H3 NH<sub>2</sub>-terminal domain during mitotic chromosome condensation. **J Cell Biol**. 1999;145:225–35.

245-Saxena, K.; Jose, M.; Chatra, L. K.; Sequiera, J. Adenoid ameloblastoma with dentinoid. **Journal Oral Maxillofacial Pathology**. 2012;16:272-76.

246-Schluter, C; Duchrow, M; Wohlenberg, C; Becker, M H G; Key, G; Flad, H.-D; Schwarzer, D. Chemical tools in chromatin research. **J. Pept. Sci.** 2010;16: 530-37.

247-Schmidt-Westhausen A, Philipsen HP, Reichart PA. Clear cell calcifying epithelial odontogenic tumour. A case report. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1992;21:47-9.

248-Schmitt, A, Gutierrez, G J, Lenart, P, Ellenberg, J; Nebreda, A R. Histone H3 phosphorylation during *Xenopus* oocyte maturation: regulation by the MAP kinase/p90Rsk pathway and uncoupling from DNA condensation. **FEBS Lett.** 2002;518: 23-8.

249-Schones, D.E., Zhao, K., 2008. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat. Rev. Genet.* 9, 179–191. Selker, E.U., 1998. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1998;95:9430–35.

250-Sciubba, J J.; Eversole, L R.; Slootweg, P J. Ameloblastic carcinoma, in: Barnes, L.; Eveson, J W.; Reichart, P; Sidransky, D (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, IARC Press, Lyon, p. 287-9, 2005.

251-Segundo AVL, Falcão MFL, Filho RCL, et al. Multiple Myeloma with primary manifestation in the mandible: a case report. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 2008;13:232–34

252-Serrano L; Martinez-Redondo P; Marazuela-Duque A; Vazquez BN; Dooley SJ; Voigt P; et al. The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression

and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. **Genes Dev.** 2013;27:639–53.

253-Servato, J P; Prieto-Oliveira, P; De Faria P R; Loyola, A M; Cardoso, S V. Odontogenic tumours: 240 cases diagnosed over 31 years at a Brazilian university and a review of international literature. **Int Jour Oral Maxillofacial Surg.** 2013;42:288-93.

254-Shafer WG. **A textbook of oral pathology.** 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1974.

255-Shahbazian, M.D; Grunstein. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. **Annu. Rev. Biochem.** 2007;76:75–100.

256-Sharifi-Sistani N, Zartab H, Babakoohi S. Immunohistochemical comparison of the expression of p53 and MDM2 proteins in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. **J Craniofac Surg.** 2011;22:1652-56.

257-Shear M, Speight P. **Cysts of the oral and maxillofacial regions.** 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2007. p. 2

258-Shekarkhan M J, Tabei S Z, Kumar P V, Hashemi S B. Cytologic findings in calcifying epithelial odontogenic tumor. A case report. **Acta Cytol.** 2005;49:533-6.

259-Shetty K. Peripheral ameloblastoma: an etiology from surface epithelium? Case report and review of literature. **Oral Oncol Extra.** 2005;41:211–5

260-Shoemaker, C B & Chalkley, R. An H3 histone-specific kinase isolated from bovine thymus chromatin. **J. Biol. Chem.** 1978;252:5802-07.

261-Simko EJ, Brannon RB; Eibling DE: Ameloblastic carcinoma of the mandible. **Head Neck.** 1998;20:654-59.

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

263-Slabbert H, Altini M, Crooks J, Uys P. Ameloblastoma with dentinoid induction: dentinoameloblastoma. **J Oral Pathol Med.** 1992;21:46-8.

264-Slootweg P J, Muller H: Malignant ameloblastoma or ameloblastic carcinoma. **Oral Surg.** 1984;57:168.

265-Slootweg P. Odontogenic tumors an update. **Curr Diagnost Pathol.** 2006;12:54-65

266-Slootweg, P. J. Lesions of the jaws. **Histopathology.** 2009;54:401-18.

267-Snowden AW, Gregory PD, Case CC, Pabo CO. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression in vivo. **Curr Biol.** 2002;12:2159–66.

268-Song JS, Kim YS, Kim DK, Park SI, Jang SJ. Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. **Pathol Int.** 2012;62(3):182-90.

269-Sonone A, Hande A, Chaudhary M, Bonde R, Sheorain A, Agni N. Adenoid ameloblastoma with dentinoid and ghost cells. A composite odontogenic tumour: a rare case report and review of the literature. **Oral Surg.** 2011;4:77-81.

270-Sotero-Caio CG, de Souza MJ, Cabral-de-Mello DC, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M. Phosphorylation of histone H3S10 in animal chromosomes: is there a uniform pattern? **Cytogenet Genome Res.** 2011;135(2):111-7.

271-Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. **Nature.** 2000;403: 41–5

272-Suomalainen A, Hietanen J, Robinson S; Peltola J S: Ameloblastic carcinoma of the mandible resembling odontogenic cyst in a panoramic radiograph. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006;101:638-42.

273-Swan R H, Houston G D, Moore SP. Peripheral calcifying odontogenic cyst (gorlin cyst). **J Periodontol.** 1985;56:340-3.

274-Sweeney RT; McClary AC; Myers BR. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nat Genet.** 2014;46(7):722-25.

275-Taby, R; Issa, J P. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin.** 2010;60(6):376-92.

276-Tahsinoglu M. Odontogenic tumors. **Dis Hek Fak Derg.** 1980;14:91-9.

277-Takata T & Ishikawa F. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003;301:250-57.

278-Takata T, Lu Y. Ghost cell odontogenic carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart HP, Sidransky D, eds. World Health Organization classification of tumours. **Pathology and genetics of head and neck tumours.** Lyon: IARC Press, 2005; 293.

279-Tang, Z.-G; Hui, X.-L; Cui, R; Garg, M B; Kastan, B Xu. A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. **Mol Cell Biol.** 2008;28(2008):2559-66.

280-Taylor, S S. The in vitro phosphorylation of chromatin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.** 1982;257:6056-63.

281-Teperek-Tkacz M, Meglicki M, Pasternak M, Kubiak JZ, Borsuk E. Phosphorylation of histone H3 serine 10 in early mouse embryos: active phosphorylation at late S phase and differential effects of ZM447439 on first two embryonic mitoses. **Cell Cycle**. 2010;9(23):4674-87.

282-Thoma K H, Goldman H M. Odontogenic tumors: classification based on observations of the epithelial, mesenchymal, and mixed varieties. **Am J Pathol**. 1946;22:433-71. PubMed PMID: 21028226.

283-Toida M. So-called calcifying odontogenic cyst: review, discussion on the terminology, classification. **J Oral Pathol Med**. 1998;27(2):49–52

284-Tsuta K, Liu DC, Kalhor N, Wistuba II, Moran CA. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. **Am J Clin Pathol**. 2011;136(2):252-9.

285-Tzao C, Tung HJ, Jin JS, Sun GH, Hsu HS, Chen BH, Yu CP, Lee SC. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mod Pathol**. 2009;22(2):252-60.

286-Unal T; Cetingul E; Gunbay T: Peripheral adenomatoid odontogenic tumor: Birth of a term. **J Clin Pediatr Dent**. 1995;19(2):139-42.  
van Holde, K. **Chromatin**. 1988

287-Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA: Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. **J Cell Sci**. 1998;111:3497–506..

288-Vaquero A, Loyola A; Reinberg D. The constantly changing face of chromatin. **Sci Aging Knowledge Environ**. 2003;2003:RE4.

289-Venkateswarlu M, Geetha P, Lakshmi Kavitha N. CT imaging findings of a calcifying epithelial odontogenic tumour. **Br J Radiol**. 2012;85:e14-16.

290-Veras E, Malpica A, Deavers MT, Silva EG. Mitosis-specific marker phospho-histone H3 in the assessment of mitotic index in uterine smooth muscle tumors: a pilot study. **Int J Gynecol Pathol.** 2009;28(4):316-21.

291-Vermeulen M; Eberl HC; Matarese F; Marks H; Denissov S; Butter F, et al (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. **Cell.** 142:967–80.

292-Vickers RA, Gorlin RJ. Ameloblastoma: delineation of early histopathologic features of neoplasia. **Cancer.** 1970;26:699-710.

293-Vignali M, Dj Sterger, Neely K, et al. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. **Embo J.** 2000;(19):2629-40.

294-Vuletin JC, Solomon MP, Pertschuk LP. Peripheral odontogenic tumor with ghost cell keratinization. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1978;45:406–15.

295-Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. **Hum Mol Genet.** 2001;10(7):693-8.

296-Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2012;23;13(2):115-26.

297-Waldron CA. Odontogenic cysts and tumors. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, et al, editors. **Oral and maxillofacial pathology.** 2nd ed. Philadelphia (PA): WB Saunders; 2002. p. 511-20.

298-Waldron, C A; Small, I A; Silverman, H. Clear cell ameloblastoma—an odontogenic carcinoma. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.43, p.707-717, 1985.

299-Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD: Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. **Cell**. 1999;97: 99–109.

300-Werle H; Blake F A; Reichelt U. Clear-cell odontogenic carcinoma: a new case and long-term follow-up of an old case, and review of the literature. **J Oral Maxillofac Surg**. 2009;67:1342Y1348

301-White and M. J. Pharoah, **Oral Radiology: Principles and Interpretation**, Mosby, St. Louis, Mo, USA, 5th edition, 2004.

302-Whitt, B; Barker, J Rokos; C. Dunlap. Calcifying epithelial odontogenic tumor: report of a series of ten cases. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol**. 2012;114(5):68–9.

303-Wilson AS, Power BE, Molloy PL: DNA hypomethylation and human diseases. **Biochim Biophys Acta**. 2007;1775:138e162

304-Wolffe AP & Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. **Science**. 1999;286:481–86

305-Wood NK, Goaz PW. Differential diagnosis of oral and maxillofacial lesions. In: Wood NK, Goaz PW, Kallal RH, eds. **Multilocular Radiolucencies**. 5th edn. Elsevier Publishing, 2007:333–55.

306-Yancoskie, A E; Sreekantaiah, C.; Jacob, J.; Rosenberg, A.; Edelman, M.; Antonescu, C, et al. EWSR1 and ATF1 rearrangements in clear cell odontogenic carcinoma: presentation of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2014;118:115-e18.

307-Yang XJ & Seto E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. **Mol Cell**. 2008;31:449–61.

308-Yang, X. J. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. **Nucleic Acids Res.** 2004;32(3):959-76.

309-Yazici N, Karagöz B, Varan A, Yilmaz T, Oztürk A, Usubütün A, Büyükpamukçu M. Maxillary ameloblastic carcinoma in a child. **Pediatr Blood Cancer.** 2008;50(1):175–76.

310-Yoon H J, Hong S P, Lee J I, Lee SS and Hong SD: Ameloblastic carcinoma: an analysis of 6 cases with review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2009;108:904- 13.

311-Yoshida I, Ibuki Y. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. **Mutat Res.** 2014;770:9-18.

312-Youngson, R M. Collins Dictionary of Human Biology. Glasgow: **Harper Collins**, 2006.

313-Zhang K, Sridhar VV, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One.** 2007;2:e1210

314-Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. **EMBO Rep.** 2015;16(11):1467-81.

315-Zhao Q, Caballero OL, Levy S, Stevenson BJ, Iseli C, de Souza SJ, et al. Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009;106(6):1886-91.

316-Zhen L, Gui-lan L, Ping Y, Jin H, Ya-li W. The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance. **Int J Gynecol Cancer.** 2010;20(1):82-6.

<sup>1</sup>De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise das alterações genéticas, epigenéticas e de expressão gênica associadas a carcinogênese humana na região bucomaxilofacial

**Pesquisador:** ADRIANO MOTA LOYOLA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 52906815.7.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.516.159

#### Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores: "O câncer bucal é o sexto câncer com maior prevalência em todo o mundo, e o quinto no Brasil (JACOBS, 1987). Dos cânceres de cavidade oral, o carcinoma epidermóide (CEC), é o mais comumente encontrado, representando aproximadamente 90% das neoplasias malignas da cavidade bucal e cerca de 38% dos tumores de cabeça e pescoço (GOUVEA, et al, 2010). Até o estabelecimento do carcinoma epidermóide oral (CEC), observa-se uma série de alterações morfológicas nas células da mucosa oral, até que essas alterações resultem em lesões clinicamente detectáveis (WRIGHT e WRIGHT, 1988).

Dessa forma, antes do estabelecimento do CEC, haverá a formação de lesões denominadas "pré-malignas", cuja característica histo/citológica principal é apresentar algum grau de displasia epitelial (DOREY, et al, 1984)."

"Quanto a etiologia, assim como as lesões pré-malignas, acredita-se que esteja associado ao consumo crônico de tabaco e álcool, exposição prolongada à radiação ultravioleta (CEC de lábio), infecções virais (principalmente pelo papilomavírus humano - HPV), deficiências nutricionais e hereditariedade (DANIEL, et al, 2006). É uma lesão que apesar do progresso em seu diagnóstico e tratamento, apresenta um baixo índice de sobrevivência (MEHROTRA et al, 2006).

Atualmente, sabe-se que o câncer é uma doença genética cuja iniciação e progressão envolve

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.516.159

processos nos quais o DNA acumula uma série de danos. Desta forma, acredita-se que a oncogênese seja resultante de alterações estruturais e/ou funcionais de alguns genes, cuja função é controlar o crescimento normal e a diferenciação das células que compõem o organismo (SILVA, 2004)."

Estudos objetivando o mapeamento das características estruturais e das funções de genes supressores de tumores são convenientes e necessários na tentativa de explicar a etiopatogenia, e detectar possíveis influências destas alterações no comportamento, de lesões neoplásicas, no sentido de segregar casos morfológicamente semelhantes que possam apresentar características de comportamentos diferentes (PHILIPSEN et al, 2005; GARDNER et al, 2005; SLOOTWEG et al, 2009; SERVATO et al, 2013).

Dessa forma, um estudo mais aprofundado, com um maior número de genes, poderá de fato proporcionar uma compreensão ainda maior nesse sentido, contribuindo de forma significante para a criação de métodos diagnósticos mais sensíveis, além de terapêuticas mais específicas para essas lesões.

Segundo os autores: " O presente estudo caracteriza-se por ser observacional descritivo de alterações gênicas observáveis em um grupo de tumores incidentes em cabeça e pescoço, baseado na avaliação da expressão gênica a partir de um painel de 160 genes considerados mais frequentemente relacionados com a carcinogênese humana.

Sobre os participantes da pesquisa:

"Dessa forma, serão considerados na composição da amostra tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica). Todos os casos incluídos nesse estudo serão coletados retrospectivamente a partir de 1978 (início do arquivamento das amostras cirúrgicas do Laboratório de patologia bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia), e prospectivamente a partir de 2016. A coleta dos casos em ambas

Universidade Federal de Uberlândia), e prospectivamente a partir de 2016. A coleta dos casos em ambas situações se fará até 2021, período limite do desenvolvimento do estudo."

As amostras incluídas nesse estudo serão de dois tipos a saber: amostras frescas, não fixadas coletadas do paciente, no momento da intervenção de coleta de material para a realização do diagnóstico cito e/ou histopatológico da doença e de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina constantes dos arquivos do Laboratório de patologia bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Em relação as amostras frescas, o fragmento utilizado para o experimento será obtido preferencialmente do material coletado para biopsia, ou

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1 516 159

seja, material coletado para biopsia será seccionado em duas partes, sendo uma destinada ao exame anatomo-patológico e outra ao estudo. Caso seja necessário, sempre com conhecimento e autorização prévia do paciente uma amostra complementar será obtida. Este procedimento será realizado considerando, também, a dimensão da lesão. Com a finalidade de atender tecnicamente os procedimentos experimentais, coletaremos do paciente amostras de tecido não tumoral, que poderão incluir, exclusivamente, amostras teciduais perilesionais e amostras de sangue.

Os critérios de inclusão serão: pacientes diagnosticados com tumores benignos e malignos de glândula salivar salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica), no período de 1978 à 2021 260 participantes. As amostras incluídas nesse estudo serão de dois tipos a saber: amostras frescas, não fixadas coletadas do paciente, no momento da intervenção de coleta de material para a realização do diagnóstico cito e/ou histopatológico da doença e de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina constantes dos arquivos do Laboratório de patologia bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Em relação as amostras frescas, o fragmento utilizado para o experimento será obtido preferencialmente do material coletado para biopsia, ou seja, material coletado para biopsia será seccionado em duas partes. sendo uma destinada ao exame anatomo-patológico

e outra ao estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: " Avaliar o papel das alterações genéticas, epigenéticas, transpcionais e pós-traducionais relacionadas com a expressão gênica de cerca de 160 genes considerados mais frequentemente relacionados com a carcinogênese humana, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica). Objetivo Secundário: A- Mapear as mutações gênicas a partir de um painel de 160 genes considerados mais frequentemente relacionados com a carcinogênese humana, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);B Avaliar citogeneticamente a composição e integridade do cromossomo 17 em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

**Bairro:** Santa Mônica

**CEP:** 38.408-144

**UF:** MG

**Município:** UBERLÂNDIA

**Telefone:** (34)3239-4131

**Fax:** (34)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.516.159

tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);C- Avaliar citogeneticamente a composição, integridade, bem como o número de cópias do locus TP53 em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);D- Avaliar a metilação gênica das ilhas CpG da região promotora de TP53 em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);E- Avaliar a presença de miRNA relacionados ao TP53 em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);F- Quantificar por PCR em tempo real, o número de cópias de mRNA de p53 em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilita actínica);G- Quantificar por Western Blotting, a presença da proteína p53 "selvagem" e "mutada" em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de

malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica);I – Realizar estudo clínicopatológico dos grupos de lesões estudadas, considerando, quando pertinente, a possibilidade de estudar casos isolados ou pequenas serie de casos, especialmente quando os casos trouxerem informações inusitadas em relação ao que é conhecido pela literatura;J- Correlacionar os achados genéticos, epigenéticos, citogenéticos e imunohistoquímicos com as características clínico achados genéticos, epigenéticos, citogenéticos e imunohistoquímicos com as características clínico histológicas e com o comportamento biológico esperado para estas lesões."

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Os participantes incluídos na pesquisa serão submetidos a riscos considerados mínimos, que consistem em incômodo ou desconforto no momento da coleta do material e sangue, ou

Endereço:	Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro:	Santa Mônica
UF:	MG
Telefone:	(34)3239-4131
Município:	UBERLANDIA
CEP:	38.408-144
Fax:	(34)3239-4335
E-mail:	cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.516.159

hematoma no local da punção. Os mesmos serão coletados após a retirada cirúrgica, quaconteceria, independentemente da realização desta pesquisa. Essa coleta será realizada por profissional experiente das clínicas de estomatologia e cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. O risco de identificação do participante da pesquisa será minimizado através da aplicação das seguintes medidas: a privacidade do participante da pesquisa será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do nome do participante, cada participante será identificado por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa.

Benefícios: Quanto aos benefícios, o projeto pretende proporcionar um melhor entendimento acerca da patogenia dessas lesões. Entendemos que, a depender dos resultados obtidos, o conhecimento gerado por este estudo poderá somar-se a outros já presentes na literatura ou motivar sua expansão para que, oportunamente, possamos vislumbrar o surgimento de técnicas terapêuticas no combate a essas neoplasias, de forma menos invasiva e mais eficiente, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes tratados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo observacional descritivo das alterações gênicas observáveis em um grupo de tumores incidentes em cabeça e pescoço.

Projeto relevante para o melhor entendimento do comportamento genético dessa doença.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Declarações de Instituição Co-participantes (Genética e Odonto), Termo de compromisso da equipe executora, Folha rosto, Folha de informações básicas, Projeto completo, link do Currículo Lattes dos pesquisadores e TCLE estão adequados

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.479.851, de 31 de Março de 2016, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela

Endereço:	Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro:	Santa Mônica
UF:	MG
Município:	UBERLÂNDIA
Telefone:	(34)3239-4131
Fax:	(34)3239-4335
E-mail:	cep@propp.ufu.br
CEP:	38.408-144



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.516.159

aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2017.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2018.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2019.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Setembro de 2021.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144

UF: MG Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.516.159

adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

• Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_609123.pdf	11/04/2016 09:12:53		Aceito
Outros	Carta_Resposta_as_pendencias.pdf	11/04/2016 09:12:08	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCL.pdf	11/04/2016 09:04:01	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	11/04/2016 09:03:10	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	INGEB.pdf	02/02/2016 13:39:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	HO.pdf	02/02/2016 13:38:38	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	21/01/2016 20:53:58	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Lattes.pdf	19/01/2016 20:59:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	19/01/2016 20:58:41	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	INGEBUFU_Solicitacao_do_pesquisador_para_instituicao.pdf	19/01/2016 20:54:07	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	HOUFU_Solicitacao_do_pesquisador_para_instituicao.pdf	19/01/2016 20:53:25	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	FOUFU_Solicitacao_do_pesquisador_para_instituicao.pdf	19/01/2016 20:52:55	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_de_protocolos.pdf	19/01/2016 20:44:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.516.159

Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_da_equipe_executora.pdf	19/01/2016 20:42:16	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
-----------------------------	--	---------------------	---------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLÂNDIA, 20 de Abril de 2016

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
**(Coordenador)**

## ANEXO 2

Antígenos	IOD	Área
H3K36me3	50130.50	92406.73
H3K9ac	33796.02	53311.20
H4K12ac	33794.67	53311.20
H3S10ph	36390.65	54908.93

Valores obtidos para os controles de cada um dos antígenos avaliados, para IOD (Índice de absorbância) e Área total de marcação